

Оценка эффективности противоопухолевого воздействия и индукции апоптоза в клетках карциномы почки человека биологически активными добавками, содержащими ресвератрол, индол-3-карбинол и кордицепин, флуоресцентными методами визуализации

© Н.В. Полуконова¹, Д.С. Исаев¹, А.М. Мильников¹, А.Б. Бучарская^{1,¶},
А.В. Полуконова¹, Д.А. Мудрак¹, Н.А. Наволокин¹

¹ ФГБОУ ВО „Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского“,
410012 Саратов, Россия

¶ e-mail: allaalla_72@mail.ru

Поступила в редакцию 02.01.2021 г.

В окончательной редакции 25.01.2021 г.

Принята к публикации 26.02.2021 г.

С использованием флуоресцентных методов визуализации апоптоза и некроза в опухолевых клетках человека *in vitro* выполнено сравнение эффективности противоопухолевого воздействия и индукции апоптоза на клетки карциномы почки человека A498 экстрактов растительного сырья крестоцветных (индол-3-карбинол), китайского гриба (кордицепин), французского красного вина (ресвератрол) в низких концентрациях через 24 и 48 h. В качестве красителей использовали йодистый пропидий и акридиновый оранжевый в тесте „живые и мертвые“, что позволило выявить количество погибших клеток и клеток, в которых запустился апоптоз. Установлено, что индол-3-карбинол в низких концентрациях (0.0288 и 0.1152 mg/ml) обладает выраженной цитотоксической и цитостатической активностью в отношении клеток рака почки человека, значительно превышая действия ресвератрола при тех же концентрациях. В то же время кордицепин при данных концентрациях не обладает цитотоксической и цитостатической активностью. Наиболее выражена апоптотическая активность также у индол-3-карбинола при концентрациях 0.0144–0.1152 mg/ml, через 48 h количество клеток рака почки в апоптозе возрастает в 6.8–10 раз по сравнению с контролем. Сделан вывод о том, что индол-3-карбинол является перспективным противоопухолевым средством для применения в комплексной терапии больных с раком почки.

Ключевые слова: флуоресцентные методы визуализации, апоптоз, противоопухолевая активность, карцинома почки, цитостатическая активность, индол-3-карбинол, кордицепин, ресвератрол.

DOI: 10.21883/OS.2021.06.50983.3k-21

Введение

Развитие злокачественных новообразований издавна является актуальной проблемой для специалистов различного профиля, поскольку даже на данный момент разработанные концепции в их лечении не являются совершенными. Почечно-клеточная карцинома составляет около 90% всех злокачественных новообразований почки и соответствует 13 месту в общей структуре онкозаболеваемости [1]. Заболеваемость раком почки имеет значительную географическую вариабельность и может отличаться у мужчин более чем в 25 раз и более чем в 15 раз у женщин в различных странах и регионах [2].

Базисной терапией большинства опухолей является применение препаратов цитостатического действия. Однако, несмотря на их широкое применение, существует большое количество побочных эффектов, связанных с отсутствием целевой точки приложения. Так, механизмы противоопухолевой активности алкалоидов основаны на их способности связываться с нитями веретена деления на стадии метафазы или разрушать топоизомеразу во

время репликации ДНК, притом не только опухолевых клеток, но и любых пролиферирующих, что приводит к остановке клеточного цикла и гибели клеток путем некроза [3].

В настоящее время известно, что перспективными противоопухолевыми средствами являются лекарственные средства, содержащие биофлавоноиды, обладающие широким спектром биологической активности, в том числе и способностью активировать апоптоз. Так, катехин (галлат эпигаллокатехин) экстракта зеленого чая обладает тремя основными механизмами противоопухолевой активности: антипролиферативным механизмом, торможением фазы G1 подготовки клетки к делению, механизмом индукции апоптоза [4–6]. Экстракт аврана лекарственного, полученный способом, позволяющим снижать токсичность и повышать выход флавоноидов из растительного сырья, обладает противоопухолевым, антикахетическим и иммуномодулирующим действиями. При этом были описаны механизмы воздействия на опухоль и опухолевые клетки экстракта аврана, остановка клеточного цикла на стадии G0, запуск апоптоза, инду-

цированного геном p53, и подавление цитопротекторной аутофагии [7–15].

Апоптоз раковых клеток через каспазу 2 может активировать и полифенол красного вина (ресвератрол), что было показано в экспериментах *in vitro* [16]. На различных культурах опухолевых клеток человека было показано, что воздействие ресвератрола значительно зависит от типа клеточной культуры. Значительное цитотоксическое действие ресвератрола было отмечено в лейкемических клетках U937 и MOLT-4, клетках рака молочной железы MCF-7, печени HepG2 и легкого A549. В то же время влияние ресвератрола на жизнеспособность клеток рака толстой кишки Caco-2, HCT116 и SW480 было незначительным [17]. При пероральном применении эффективность данного препарата не доказана, что, возможно, обусловлено его низкой биодоступностью, поэтому ресвератрол чаще используется для профилактики опухолевых заболеваний [18,19].

Действующим веществом экстракта китайского гриба является кордицепин, который также обладает противоопухолевыми свойствами: во-первых, его сходство с аденозином позволяет нарушать репликацию ДНК, во-вторых, он способствует активации апоптоза в опухолевых клетках. Известно также, что кордицепин в небольших дозах подавляет процесс неконтролируемого роста и деления клеток, а в больших концентрациях не дает клеткам срастаться, что также подавляет рост опухоли [20]. В работе [10] было показано, что кордицепин подавляет экспрессию генов, обуславливающих рост опухоли и ее метастазирование. В исследованиях ряда авторов была показана способность кордицепина вызывать апоптоз в опухолевых клетках [10–13].

Перспективным противоопухолевым агентом является ароматическое соединение индол-3-карбинол, выделенный из сырья растений семейства крестоцветных. На различных клеточных культурах была показана его противоопухолевая активность за счет остановки пролиферации опухолевых клеток и индукции в них апоптоза [14,15].

Среди механизмов клеточной гибели апоптоз является более предпочтительным, поскольку не оказывает воздействия на клеточное микроокружение и на соседние клетки. Его исходом является дегидратация, пикноз и формирование апоптотических телец. Для некроза, в свою очередь, характерно токсическое влияние продуктов клеточного метаболизма на окружающие клетки, поскольку происходит разрушение клеточной мембраны с последующим выходом цитоплазмы с содержащимися в ней ферментами, внутриклеточными органеллами и продуктами внутриклеточного обмена веществ [7].

Применение флуоресцентных способов окраски с использованием двойного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием в тесте „живые и мертвые“ позволяет выявлять общее количество клеток, погибших как путем некроза (окрашенные в красный цвет), так и путем апоптоза (зеленый цвет), а также клеток, в которых запущен апоптоз: апоптотические

тельца, пикноз ядра. Следовательно, двойное окрашивание может служить методом скрининговой оценки эффективности препаратов, относящихся к классу противоопухолевой терапии.

Цель исследования

С использованием флуоресцентных методов визуализации апоптоза и некроза в опухолевых клетках человека *in vitro* предполагалось сравнить эффективность противоопухолевого воздействия на клетки карциномы почки человека A498 следующих экстрактов (в низких концентрациях через 24 и 48 h): сырья растений семейства крестоцветных (действующее вещество индол-3-карбинол), флавоноидов французского красного вина (ресвератрол), китайского гриба (кордицепин).

Материалы и методы

Объектом исследования послужили клетки карциномы почки A498, полученные из банка опухолевых культур Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Исследование было проведено на базе лаборатории клеточных технологий СГМУ им. В.И. Разумовского.

В исследовании использованы биологически активные добавки (БАД) с предполагаемой противоопухолевой активностью — экстракты растений семейства крестоцветных (индол-3-карбинол), французского красного вина (ресвератрол, полифенолы, включая антоцианы, флавоноиды), китайского гриба (кордицепин) в низких концентрациях (mg/ml) 0.0018, 0.0036, 0.0072, 0.0144, 0.0288, 0.0576, 0.1152 [12]. Выбор низких концентраций для исследования противоопухолевой активности БАД обусловлен их сравнительно низкой биодоступностью при пероральном применении, в результате чего к точке приложения могут доходить только низкие концентрации.

Культивирование проводили в пластиковых флаконах в среде RPMI 4 (Roswell Park Memorial Institute), содержащей 10% эмбриональной сыворотки, ампициллин, пируват натрия, глутамин. Культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 и 48 h, 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.

Для визуализации клеток использовали микроскоп Nikon (Токио, Япония). Захват и анализ изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры Nikon (Токио, Япония). Для подсчета клеток использовали программное обеспечение Fiji ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health USA) и NIS-ElementsBR 4.60 (Токио, Япония).

Цитотоксическую активность оценивали по количеству мертвых клеток в поле зрения. Цитостатическую

Таблица 1. Сравнение цитотоксической, цитостатической и апоптотической активности БАД, содержащих индол-3-карбинол, кордицепин и ресвератрол, через 24 h воздействия на клеточную культуру A498

Оценка воздействия	Группа							
	Контроль Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0018 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0036 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0072 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0144 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0288 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0576 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.1152 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ресвератрол								
Количество клеток в поле зрения	133 (112-143.5) [112-148]	172* (164.5-189.25) [157-190]	140 (126.25-156.5) [124-191]	162.5* (140-228) [123-187]	146 (119.75-168) [119-171]	180.5* (169.25-216.5) [167-227]	132 (112.75-148.25) [109-161]	134.5 (123-158.25) [120-168]
Количество мертвых клеток в поле зрения	2 (0.75-4.25) [0-5]	12* (5.5-13.25) [4-14]	6.5* (4.25-11.25) [2-15]	13* (6-22) [1-4]	8* (6.75-8.5) [6-10]	9.5* (7.25-10.25) [5-11]	9.5* (8-12.25) [5-13]	12.5* (3.75-16.25) [3-17]
Количество живых клеток в поле зрения	130.5 (108.75-130.5) [108-148]	159 (116-183.5) [29-186]	128.5 (123.5-148.75) [119-184]	149.5 (130-206) [119-185]	138.5 (112.75-159.5) [112-161]	170 (161.5-207.75) [160-219]	121 (104-138.5) [104-149]	121 (116.75-146.5) [116-151]
Количество клеток с серпами	2 (1.75-4.25) [1-5]	8* (5.75-9.25) [2-10]	6* (5-7.25) [5-8]	15.5* (13.25-18) [11-21]	9.5* (8.5-11.75) [7-14]	15* (13.25-16) [11-16]	5* (3.75-12.5) [3-14]	6* (4.75-7.75) [4-13]
Количество клеток с пикнозом ядра	2.5 (0.75-4) [0-4]	5.5* (4-6.75) [1-9]	3 (2.75-5.25) [2-6]	3 (1.75-6) [1-9]	4.5 (2.75-5.5) [2-7]	5.5* (4-7.25) [4-8]	4.5 (3-6) [0-6]	3.5 (2-6.5) [2-8]
Количество клеток в апоптозе	1 (0-3.5) [0-8]	6* (2.5-8.75) [1-11]	0 (0-0) [0-0]	1 (0-2.75) [0-5]	0 (0-0) [0-0]	0 (0-0) [0-0]	0 (0-0) [0-0]	0.5 (0-1.25) [0-2]
Кордицепин								
Количество клеток в поле зрения	118.5 (114-145.75) [108-202]	163 (151.75-176.25) [148-183]	110.5 (98.5-125) [79-134]	98 (77.25-119.75) [69-140]	110 (93.25-158.75) [85-173]	137 (83.5-173) [76-176]	112 (91.75-118.75) [82-121]	113 (106-132.75) [100-135]
Количество мертвых клеток в поле зрения	4.5 (3-6.25) [3-7]	3.5 (2-5.5) [2-7]	5 (3.5-8.5) [2-13]	5 (3-6.25) [3-7]	5.5 (2.75-6.25) [2-7]	7.5 (2.5-10.5) [1-12]	7.5 (4.75-14.75) [4-17]	7 (3.75-12.25) [3-13]
Количество живых клеток в поле зрения	118 (111.5-141.5) [101-197]	160.5 (147.5-171.5) [146-176]	104 (92-118.75) [74-130]	93 (74.25-113.5) [66-133]	106 (87-154.25) [78-170]	132.5 (73-169) [64-169]	96.5* (84-114) [75-117]	102 (95.75-129.5) [95-131]
Количество клеток с серпами	1.5 (0-3) [0-3]	6* (4.75-8.25) [4-9]	5* (2.75-9.5) [2-17]	9* (4.75-13.25) [4-17]	7.5* (4.75-9.25) [4-10]	8.5* (6.5-19.5) [5-21]	7* (5.75-8.25) [5-9]	9.5* (7.5-13) [6-16]
Количество клеток с пикнозом ядра	3 (3-4.75) [3-7]	2.5 (1.75-3.25) [1-4]	3 (3.75-7.75) [3-10]	5 (3.75-6.5) [3-8]	5.5 (3.75-6.25) [3-7]	5 (3-6.75) [3-9]	4.5 (3.5-5.25) [2-6]	10 (5.75-11.25) [2-12]
Количество клеток в апоптозе	3.5 (1.5-4.25) [0-5]	0* (0-1.5) [0-3]	5 (0.75-7.25) [0-11]	3 (1-5.25) [1-6]	2 (1-3.5) [1-5]	6 (1.75-7.25) [1-8]	2.5 (1.75-4) [1-4]	4.5 (2-9.5) [2-17]

Таблица 1 (продолжение).

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Индол-3-карбинол								
Количество клеток в поле зрения	118.5 (114-145.75) [108-202]	160* (144.75-178.25) [144-185]	120.5 (105-176.5) [96-181]	117.5 (110.25-134.75) [102-137]	101* (97.25-107.25) [92-108]	99.5* (95.25-105.25) [90-109]	75.5* (63-97.75) [63-106]	68* (41-73.5) [35-78]
Количество мертвых клеток в поле зрения	4.5 (3-6.25) [3-7]	5.5 (2.75-11) [2-14]	4.5 (3.25-9.75) [1-21]	3 (2-6.25) [2-7]	32* (5.25-65) [3-83]	11.5* (7.5-14) [6-14]	18.5* (13.25-28.5) [8-36]	43.5* (24.25-47) [16-47]
Количество живых клеток в поле зрения	114 (110-141.5) [101-197]	154 (141.25-170.25) [139-171]	113 (95.5-171) [91-177]	113.5 (107.5-128.75) [100-134]	71* (29-100.25) [17-101]	89.5* (85.75-92) [82-95]	59.5* (34.5-86.25) [27-87]	23.5* (18.25-28) [16-31]
Количество клеток с серпами	1.5 (0-3) [0-3]	7.5* (5.75-10.25) [5-11]	5 (2.25-6.25) [0-10]	4 (3.25-4.5) [1-6]	2 (0.75-3.25) [0-4]	3.5 (1.75-4.25) [1-5]	2 (0.75-3.25) [0-4]	4.5* (3.75-11) [3-14]
Количество клеток с пикнозом ядра	3 (3-4.75) [3-7]	3 (2-3.25) [2-4]	3.5 (2.75-4) [2-4]	2.5 (1.75-5) [1-5]	2 (0.75-3) [0-3]	1.5* (0.75-2) [0-2]	1 (0-4) [0-4]	1.5* (0-2.25) [0-3]
Количество клеток в апоптозе	3.5 (1.5-5.25) [0-5]	1 (0-2) [0-2]	0 (0-0.25) [0-1]	0.5 (0-1.25) [0-2]	17* (0-40.5) [0-54]	1 (0-2) [0-2]	3.5 (0.75-7) [0-7]	18.5* (11.5-24.5) [10-29]

Примечание. * Достоверность различий между контрольной и экспериментальной группами рассчитывалась с помощью критерия Манна–Уитни, $p < 0.05$.

активность оценивали по общему количеству клеток в поле зрения и количеству живых клеток, активность фиксировали при понижении хотя бы одного из этих показателей. Апоптотическую активность оценивали по количеству клеток, распавшихся на апоптотические тельца, а также по количеству клеток с ядрами в пикнозе или в виде серпа. Активность наблюдали при повышении хотя бы одного из этих показателей.

Статистическую обработку проводили в программе SPSS Statistics 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. В группах определяли медиану, квартили 0.25 и 0.75, максимальное и минимальное значения. О достоверности отличий судили при $p < 0.05$.

Результаты

Клетки карциномы почки человека A498 в контрольной группе были прикреплены к подложке и имели овальную форму, что характерно для интактных клеток (рисунок).

В ходе проведения флуоресцентной микроскопии через 24 h установлено, что под действием ресвератрола количество мертвых клеток рака почки A498 в поле зрения увеличивалось в 3.25 и 6.25 раз по сравнению с контролем при концентрациях соответственно 0.0036 и 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2, рисунок), что свидетельствует о наличии у ресвератрола цитотоксической активности в отношении клеток рака почки. При этом цитотоксическая активность ресвератрола заметно снижалась через 48 h воздействия. В то время как цитостатический эффект ресвератрола, наоборот, проявился только через 48 h. Так, через 48 h отмечено уменьшение количества живых клеток рака почки в 2.5 и 7.75 раза по сравнению с контролем при концентрациях соответственно 0.0576 и 0.0072 mg/ml (табл. 1, 2). Ни через 24 h, ни через 48 h воздействия клеток рака почки в апоптозе не выявлено, однако выявлены клетки, находящиеся в стадии, предшествующей апоптозу, а именно с ядрами в виде серпа и с пикнозом ядра. Через 24 h количество клеток с серпами увеличивалось в 1.43 раза по сравнению с контролем при концентрации 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2), а количество клеток с пикнозом ядра — в 2.2 раза при концентрациях 0.0018 и 0.0288 mg/ml (табл. 1, 2). Полученные данные свидетельствуют о наличии слабой и медленной апоптотических реакций ресвератрола в

Таблица 2. Сравнение цитотоксической, цитостатической и апоптотической активности БАД, содержащих индол-3-карбинол, кордицепин и ресвератрол, через 48 h воздействия на клеточную культуру A498

Оценка воздействия	Группа							
	Контроль Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0018 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0036 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0072 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0144 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0288 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.0576 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]	0.1152 mg/ml Ме (кв25–кв75) [min-max]
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ресвератрол								
Количество клеток в поле зрения	155.5 (137.5-167.5) [133-169]	136 (114.75-151.75) [114-154]	124* (115.25-134.5) [110-148]	89* (82.5-164) [72-124]	108.5* (97.75-128.25) [97-129]	128* (108.75-145) [108-151]	117* (109.25-129) [107-147]	122.5* (117-132) [114-144]
Количество мертвых клеток в поле зрения	5.5 (3.5-6.75) [2-9]	8 (5.75-11.5) [5-13]	14.5* (10-19.75) [7-22]	4.5 (3.75-6.5) [3-8]	6 (4.5-8.25) [3-9]	7.5 (5.57-13.5) [5-21]	6.5 (3.75-10.5) [3-12]	7.5* (4.5-9.5) [3-11]
Количество живых клеток в поле зрения	149.5 (136.25-165) [128-165]	127 (104.75-146) [101-149]	113.5* (107.75-120.75) [98-126]	100 (78-157) [69-166]	103 (92.5-120) [91-123]	119.5 (97.75-139.25) [88-143]	109 (102.25-125) [97-140]	116 (108.25-123.75) [106-141]
Количество клеток с серпами	7 (4.75-8.5) [4-10]	2.5* (1.75-5.75) [1-8]	5 (3.5-5.5) [2-7]	3* (2-4) [2-4]	4 (2.5-5.5) [1-7]	8.5 (6.75-10.5) [6-12]	4 (3-10.25) [3-11]	10* (8.25-11.5) [6-13]
Количество клеток с пикнозом ядра	4 (2.75-10.25) [2-11]	4.5 (3.75-6) [3-6]	3.5 (1.75-5.25) [1-6]	3 (2.75-4.25) [2-5]	6.5* (4.5-9) [3-9]	3.5 (2-5.25) [2-6]	1.5* (1-3) [1-3]	4.5* (3.75-7.5) [3-9]
Количество клеток в апоптозе	4.5 (1.75-7.5) [1-9]	0* (0-1.75) [0-4]	1* (0.75-2.25) [0-2]	0* (0-0) [0-0]	0* (0-0) [0-0]	0* (0-0.25) [0-1]	0* (0-0) [0-0]	0* (0-0) [0-0]
Кордицепин								
Количество клеток в поле зрения	143 (129-151) [129-154]	194* (190.5-199) [189-202]	148.5 (124.25-165.75) [122-180]	145 (129-154.75) [126-172]	155* (126.75-229.25) [123-239]	156* (149-165.75) [143-168]	156.5 (121.5-183.25) [120-196]	146 (129.25-156.5) [124-158]
Количество мертвых клеток в поле зрения	18 (3.75-85.5) [3-93]	6.5 (3.75-14.5) [3-25]	6 (5-7) [2-7]	5.5 (4.75-11.75) [4-17]	7 (5.5-17.25) [4-18]	5 (4.5-6.5) [3-8]	9.5 (7-13.5) [7-15]	12.5 (9.5-33) [8-39]
Количество живых клеток в поле зрения	116.5 (54.25-146.25) [46-150]	189* (179.75-191.75) [164-194]	142* (117.5-162.75) [116-174]	140.5* (115.25-149) [113-167]	149* (119.75-211.5) [119-222]	150.5* (144.75-160.75) [135-163]	142.5 (113.5-175.5) [109-189]	125 (111-141) [102-141]
Количество клеток с серпами	6 (1.5-9) [0-12]	14.5* (11.75-16.25) [11-17]	10 (8.75-11.25) [8-12]	1.5* (9.5-12.25) [8-13]	13.5* (7.75-22.75) [7-37]	14* (10.5-17.25) [9-21]	10.5* (8.75-15.25) [8-16]	5.5 (4-6.25) [4-7]
Количество клеток с пикнозом ядра	1.5 (0-3) [0-3]	3.5* (2.75-4.25) [2-5]	2 (1-3.25) [1-4]	1 (0.75-2.25) [0-3]	2 (0.75-2.25) [0-3]	2.5 (1-3.5) [1-5]	1 (0.75-2.25) [0-3]	1 (0.75-3) [0-3]
Количество клеток в апоптозе	2.5 (2-5.75) [2-11]	0* (0-0.25) [0-1]	0* (0-1) [0-1]	0* (0-0.25) [0-1]	0* (0-1) [0-1]	0* (0-0.25) [0-1]	0.5* (0-1) [0-1]	0* (0-1.25) [0-2]

Таблица 2 (продолжение).

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Индол-3-карбинол								
Количество клеток в поле зрения	143 (129-151) [129-154]	141 (109.5-166.75) [105-175]	166* (151.25-171.5) [146-179]	136 (125.5-147) [115-153]	54.5* (40.5-69.5) [33-77]	17.5* (8-24.75) [8-27]	35.5* (28.75-42.5) [28-50]	28* (18.25-33.25) [16-34]
Количество мертвых клеток в поле зрения	18 (3.75-85.5) [3-93]	9.5 (6-14.25) [6-18]	7.5 (6.75-9.25) [6-10]	21 (16-25.5) [10-30]	43.5 (29.25-55.25) [24-68]	9 (4.75-20) [4-20]	30 (26-37.75) [23-49]	24.5 (15.5-29.5) [14-31]
Количество живых клеток в поле зрения	116.5 (54.25-144.75) [46-150]	131.5 (97.5-158.5) [87-169]	158* (142.75-163.75) [139-172]	113.5 (105-124.25) [93-143]	12.5* (7-16.5) [1-18]	4* (2.5-8) [1-20]	3* (1.75-6.5) [1-11]	3* (1.75-4.5) [1-6]
Количество клеток с серпами	6 (1.5-9) [0-12]	5 (2-6.5) [2-8]	4.5 (3-5.25) [3-6]	5.5 (4.75-7) [4-10]	2.5 (0.75-4.5) [0-6]	0.5 (0-2.25) [0-3]	1.5* (0-3.75) [0-6]	0.5* (0-2) [0-2]
Количество клеток с пикнозом ядра	1.5 (0-3) [0-3]	1 (0-2) [0-2]	2.5 (1.75-3.5) [1-5]	1.5 (0-2) [0-2]	0 (0-0.25) [0-1]	0 (0-1.25) [0-2]	0* (0-2.25) [0-3]	0* (0-1) [0-1]
Количество клеток в апоптозе	2.5 (2-5.75) [2-11]	0* (0-1) [0-1]	0* (0-1) [0-1]	9.5 (5.25-11.25) [3-12]	22.5* (16-28.75) [13-34]	3* (0-6.25) [0-7]	17* (6.75-19.25) [6-23]	1* (0-5) [0-5]

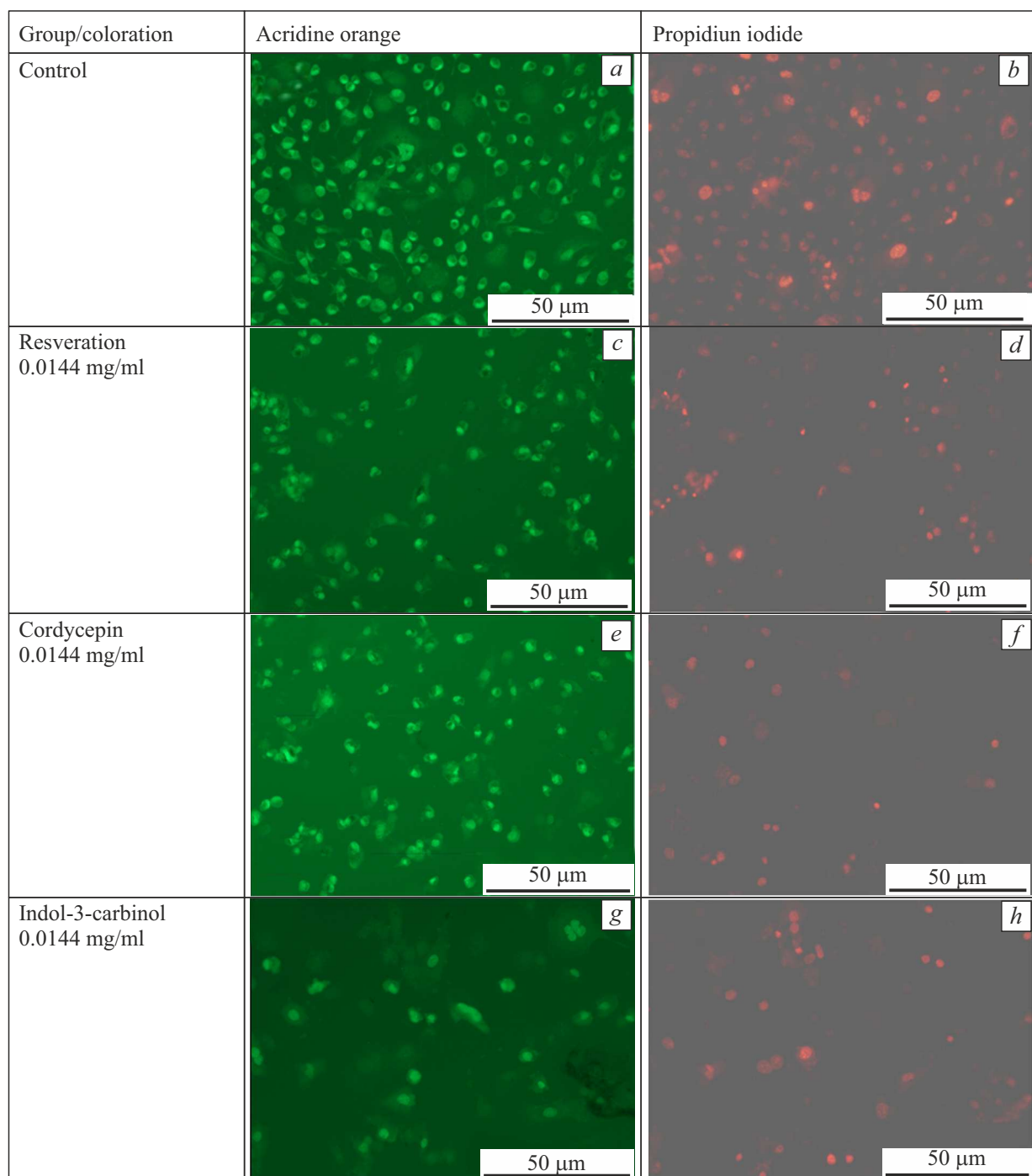
Примечание. * Достоверность различий между контрольной и экспериментальной группами рассчитывалась с помощью критерия Манна–Уитни, $p < 0.05$.

отношении клеток рака почки человека в исследованном диапазоне низких концентраций.

Кордицепин не проявил цитотоксической активности ни через 24 h, ни через 48 h воздействия на клетки рака почки человека в исследованных низких концентрациях, что следует из отсутствия различий количества мертвых клеток в поле зрения по сравнению с контролем (табл. 1, 2, рисунок). Через 24 h воздействия кордицепина количество живых клеток рака почки уменьшилось в 1.22 раза по сравнению с контролем только при концентрации 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2), что свидетельствует о наличии у кордицепина слабой цитостатической активности. Как через 24 h, так и через 48 h воздействия кордицепином клеток рака почки в апоптозе не выявлено, однако выявлены клетки, находящиеся в стадии, предшествующей апоптозу, а именно с ядрами в виде серпа. Через 24 h количество клеток с серпами увеличилось в 3.3 и 6.33 раза по сравнению с контролем при концентрациях соответственно 0.0036 и 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2). Полученные данные свидетельствуют о наличии слабой и медленной апоптотической реакции кордицепина в отношении клеток рака почки человека в исследованном диапазоне низких концентраций.

Через 24 h воздействия индол-3-карбинолом установлено, что количество мертвых клеток рака почки A498 в поле зрения увеличивалось в 2.56 и 9.67 раза по

сравнению с контролем при концентрациях соответственно 0.0288 и 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2, рис. 1), что свидетельствует о наличии у индол-3-карбинола высокой цитотоксической активности в отношении клеток рака почки. При этом цитотоксическая активность индол-3-карбинола, так же как и у ресвератрола, проявлялась через 24 h воздействия. В то время как цитостатический эффект индол-3-карбинола, так же как и у ресвератрола, наоборот, возрастал только через 48 h — наблюдалось уменьшение количества живых клеток рака почки в 9.32 и 38 раза по сравнению с контролем при концентрациях соответственно 0.0144 и 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2). Через 24 h воздействия индол-3-карбинолом резко возрастает количество клеток рака почки в апоптозе — в 5 раз по сравнению с контролем при концентрациях от 0.0144 до 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2). Это свидетельствует о наличии у индол-3-карбинола высокой апоптотической активности, которая даже возрастает через 48 h воздействия. Через 48 h количество клеток рака почки в апоптозе возрастает в 6.8–10 раз по сравнению с контролем при концентрациях от 0.0144 до 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2). Кроме того, через 24 h воздействия наблюдается увеличение количества клеток с серпами в 3 раза по сравнению с контролем при концентрации 0.1152 mg/ml (табл. 1, 2). Полученные данные свидетельствуют о наличии выраженной апоптотической



Клетки культуры A498 через 24 h после воздействия экстрактами: *a, c, e, g* — окраска акридиновым оранжевым хроматина ядер живых клеток; *b, d, f, h* — окраска мертвых клеток йодистым пропидием. Объектив $\times 20$.

активности в отношении клеток рака почки, позволяющей клеткам переходить в стадию апоптоза уже в течение первых суток воздействия.

Обсуждение

Ранее в экспериментах *in vitro* для ресвератрола было показано, что он способен активировать апоптоз

опухолевых клеток через каспазу 2 [16], однако при пероральном применении эффективность данного препарата не доказана [19]. Как показали наши исследования, при низких концентрациях у ресвератрола наблюдалась низкая апоптотическая активность в отношении клеток рака почки человека, что вполне согласуется с данными исследования Takashina M. et al. [18], в котором была показано более выраженное слабое противоопухолевое

действие ресвератрола в отношении культур лейкемических клеток по сравнению с культурами клеток солидных опухолей.

Для кордицепина ранее было показано, что за счет его сходства с аденозином он способен нарушать репликацию ДНК и подавлять процесс неконтролируемого роста и деления опухолевых клеток [8,9]. Однако в проведенном нами исследовании кордицепин совсем не обладал цитотоксической и цитостатической активностями в отношении клеток рака почки в диапазоне исследуемых нами концентраций, что может быть связано с использованием нами слишком низких концентраций. В то же время наблюдалась апоптотическая активность кордицепина в отношении клеток рака почки, что согласуется с данными ряда авторов

Наиболее выраженная противоопухолевая активность в отношении клеток рака почки человека была выявлена нами у индол-3-карбинола, которая проявилась как в цитотоксическом, цитостатическом, так и апоптотическом эффектах. Так, под действием индол-3-карбинола через 48 h количество клеток рака почки в апоптозе возрастало в 6.8–10 раз по сравнению с контролем. Противоопухолевая активность в отношении клеток рака почки индол-3-карбинола сходна с воздействием экстракта аврана лекарственного [6], однако даже превосходит его по силе воздействия. Полученные нами данные вполне согласуются с известными ранее для индол-3-карбинола в том, что он обладает противоопухолевой активностью за счет остановки пролиферации опухолевых клеток и индукции в них апоптоза [14,15,21]. Учитывая выраженную противоопухолевую активность индол-3-карбинола даже при низких концентрациях, он может быть весьма перспективен в комплексной терапии больных с раком почки.

Выводы

Таким образом, использование флуоресцентных методов в тесте „живые и мертвые“ позволило визуализировать и сравнить цитотоксическую, цитостатическую и апоптотическую активности растительных БАД в отношении клеток карциномы почки человека A498. Наиболее перспективным противоопухолевым средством является индол-3-карбинол, который при концентрациях 0.0288 и 0.1152 mg/ml показал выраженную цитотоксическую и цитостатическую активности в отношении клеток рака почки человека, значительно превышающую эффекты ресвератрола при тех же концентрациях. Наиболее выраженная апоптотическая активность была обнаружена также у индол-3-карбинола при концентрациях 0.0144–0.1152 mg/ml — при его воздействии через 48 h количество клеток рака почки в апоптозе возрастало в 6.8–10 раз по сравнению с контролем. Изучение механизмов индукции апоптоза в опухолевых клетках под воздействием индол-3-карбинола является

перспективным для его клинического применения в комплексной терапии больных с раком почки.

Соблюдение этических стандартов

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

Финансирование работы

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта № SSMU-2021-003 „Оценка эффективности противоопухолевого воздействия и индукции апоптоза в опухолевых клетках растительными экстрактами и БАД в низких концентрациях“.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Ferlay J., Shin H.R., Bray F. // *Int. J. Cancer*. 2010. V. 15. P. 2893–2917.
- [2] Ljungberg B., Campbell S.C., Choi H.Y. // *J Eur. Urol*. 2011. V. 60. N 4. P. 615–621.
- [3] Kharkevich D.A. *Pharmacology: Textbook*. 10th ed. M.: GEOTAR-Media, 2008. 750 p.; Харкевич Д.А. *Фармакология: Учебник*. 10-е изд., перераб., доп. и испр. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 750 с.
- [4] 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.
- [5] Du G.J., Zhang Z., Wen X.D. // *Nutrients*. 2012. V. 4. N 11. P. 1679–1691.
- [6] Myl'nikov A.M., Polukonova N.V., Isaev D.S., Doroshenko A.A., Verkhovskii R.A., Nikolaeva N.A., Mudrak D.A., Navolokin N.A. // *Opt. Spectrosc*. 2020. V. 128. N 7. P. 972–979.
- [7] Navolokin N.A., Polukonova N.V., Mudrak D.A. // *Opt. Spectrosc*. 2019. V. 126. N 6. P. 773–782.
- [8] Baik J.S., Kwon H.Y., Kim K.S. // *Indian J. Biochem. Biophys*. 2012. V. 49. N 2. P. 86–91.
- [9] Wong Y.Y., Moon A., Duffin R. // *J. Biological Chemistry*. 2009. V. 285. N 4. P. 2610–2621.
- [10] Ren Z., Cui J., Huo Z., Xue J., Cui H., Luo B. // *Int Immunopharmacol*. 2012. V. 14. P. 698–703.
- [11] Park S.E., Yoo H.S., Jin C.Y., Hong S.H., Lee Y.W., Kim B.W., Lee S.H., Kim W.J., Cho C.K., Choi Y.H. // *Food Chem Toxicol*. 2009. V. 47. N 7. P. 1667–75.
- [12] Hwang I.-H., Oh S.Y., Jang H.-J., Jo E., Joo J.C., Lee K.-B., Yoo H.-S., Lee M.Y., Park S.J., Jang I.-S. // *PLoS One*. 2017. V. 12. N 10. P. 0186489.
- [13] Jo E., Jang H.-J., Yang K.E., Jang M.S., Huh Y.H., Yoo H.-S., Park J.S., Jang I.-S., Park S.J. // *BMC Complement Med. Ther*. 2020. V. 20. P. 1.
- [14] Megna B.W., Carney P.R., Nukaya M. // *J. Surg. Res*. 2016. V. 204. N 1. P. 47–54.
- [15] Lee C.M., Lee J., Nam M.J., Park S.H. // *Biomed. Res. Int*. 2018. V. 29. P. 7970618.

- [16] Mohan J., Gandhi A.A., Bhavya B.C., Rashmi R., Karunakaran D., Indu R., Santhoshkumar T.R. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. N 26. P. 17599–611.
- [17] Takashina M., Inoue S., Tomihara K., Tomita K., Hattori K., Zhao Q-L., Suzuki T., Noguchi M., Ohashi W., Hattori Y. // Int. J. Oncol. 2017. V. 50. N 3. P. 787–797.
- [18] Carter L.G., D'Orazio J.A., Pearson K.J. // Endocr. Relat. Cancer. 2014. V. 21. P. 209–225.
- [19] Monteillier A., Voisin A., Furrer P. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 2045–2322.
- [20] Jeong J.W., Jin C.Y., Park C. // Toxicol. In Vitro. 2011. V. 25. N 4. P. 817–824.
- [21] Lee C.M., Park S-H., Nam M.J. // Hum. Exp. Toxicol. 2019. V. 38. N 1. P. 136–147.