

Наволокин Никита Александрович

**ПАТОМОРФОЗ И МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В
КУЛЬТУРАХ И ПЕРЕВИТЫХ ОПУХОЛЯХ ПОД ВЛИЯНИЕМ
ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ**

14.03.02 – патологическая анатомия,
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Волгоград - 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Маслякова Галина Никифоровна**

доктор биологических наук, профессор **Полуконова Наталья Владимировна**

Официальные оппоненты:

Доросевич Александр Евдокимович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Полякова Валентина Сергеевна

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__»_____2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.008.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной научной библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; <https://www.volgmed.ru/ru/dsovet/thesis/921/>).

Автореферат разослан «__»_____2020 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук

Григорьева Наталья Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Онкологические заболевания занимают второе место в структуре смертности во всем мире. В период с 2005 по 2015 гг. количество выявленных случаев онкологических заболеваний в мире увеличилось на 33%. Международное агентство по изучению рака (МАИРК) и эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2017 г. спрогнозировали к 2030 г. увеличение смертности от рака на 70% (с 8,2 до 13 миллионов человек, умерших в год). В 2017 г. в России впервые выявлено почти 541 тыс. пациентов с онкозаболеваниями (Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2018 г.).

В лечении онкологических больных остается много нерешенных проблем: выраженная токсичность многокурсовой химиотерапии (Харкевич Д.А., 2008; Agrawa A., 2008; Корман Д.Б. и др., 2014); формирование множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – приобретение опухолевыми клетками перекрестной резистентности к цитостатикам с разными механизмами действия и внутриклеточными мишенями (Ставровская А.А., 2000; Zhang L. et al, 2019).

Высокая биологическая и токсическая активность современных противоопухолевых средств обусловлена их повреждающим действием не только на опухолевые, но и здоровые клетки (Хабриев Р.У., 2005; Корман Д.Б., 2014). Механизм их действия хорошо изучен: они или действуют на клетку на стадии метафазы, или разрушают топоизомеразу во время репликации ДНК, после чего клетка гибнет путем некроза. Побочным эффектом механизма действия таких препаратов является развитие интоксикации. Поэтому актуален поиск противоопухолевых средств нового поколения, позволяющих избегать некроза и вызывать иной путь программированной гибели опухолевой клетки (Xu T. et al, 2019; Hseu YC. et al, 2019).

Потенциальным средством нового поколения могут стать биофлавоноиды с доказанным широким спектром действия, которые вполне могли бы претендовать на роль новых безопасных самостоятельных противоопухолевых средств, так как установлена их способность усиливать эффективность цитостатической терапии за счет ослабления её токсического действия на здоровые клетки, а также способность активации апоптоза в опухолевых клетках (Polier et al., 2011). Однако глубокого исследования морфологических изменений опухолевых клеток и патоморфоза опухоли, а также степени повреждающего действия на нормальные клетки и ткани человека и животных под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов ранее не проводили. Не изучены и механизмы развития клеточной гибели в опухолевой ткани. С нашей точки зрения, такие исследования открыли бы не только перспективу дальнейшего активного скрининга биофлавоноидов как потенциальных противоопухолевых средств, но и новые аспекты фундаментальных исследований механизмов гибели опухолевых клеток.

Степень разработанности темы исследования. На сегодняшний момент в доступной нам литературе имеются единичные работы по морфологическим изменениям в клетках и тканях при воздействии флавоноидов. Так, исследование Даировой Л.М. (1974) было посвящено гистологическим и гистохимическим изменениям в перевитых опухолях

крыс при действии препаратов из группы флавоноидов. Однако в данной работе не были изучены пролиферативная активность клеток и способность активировать апоптоз или аутофагию в опухолевых клетках, что необходимо для установления механизма гибели опухолевых клеток под действием биофлавоноидов.

Еще две работы в данной области были выполнены в 2005 г. Башмаковой Т.В. и в 2006 г. Войцицким Е.В. и посвящены патоморфологии лимфатического аппарата матки, тонкой и толстой кишки при действии цитостатических препаратов и коррекции биофлавоноидами. Установлено, что флавоноиды ускоряют процессы восстановления эпителиальных клеток ЖКТ и защищают клетки лимфоидного аппарата при лечении цитостатиками. Однако влияние экстракта на основные органы детоксикации (печень, почки), миокард, головной мозг, органы репродуктивной системы и непосредственно на гибель опухолевых клеток не изучалось.

Цель исследования

Выявить особенности патоморфоза опухолей различного гистогенеза, установить возможные механизмы гибели и резистентности опухолевых клеток в экспериментах на клеточных культурах опухолей человека (*in vitro*) и перевитых опухолях у животных (*in vivo*) под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов (аврана, бессмертника и кукурузы).

Задачи исследования

1. Оценить характер морфологических изменений в культурах неопухолевых (на примере культуры SPEV) и опухолевых клеток (на примере культуры HeLa) в экспериментах *in vitro* под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов.

2. Определить информативные морфологические показатели для оценки патоморфоза опухолевых клеток *in vitro* под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов.

3. Описать морфологические изменения и выявить возможные пути гибели опухолевых клеток на клеточных культурах опухолей человека (аденокарцинома матки HeLa, Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карцинома легкого A549, карцинома простаты PC-3, карцинома толстой кишки HCT-116, карцинома почки A498) под действием флавоноидсодержащих экстрактов.

4. Провести анализ частоты развития апоптоза на клеточных культурах опухолей человека (аденокарцинома матки HeLa, Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карцинома легкого A549, карцинома простаты PC-3, карцинома толстой кишки HCT-116, карцинома почки A498) при воздействии флавоноидсодержащих экстрактов.

5. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установить механизмы развития апоптоза в опухолевых клетках человека (на примере Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat), и перевиваемых опухолей (рака почки РА, печени PC-1 и саркомы 45) под действием флавоноидсодержащего экстракта аврана.

6. Установить роль аутофагии в развитии резистентности и гибели опухолевых клеток человека *in vitro* (на примере культуры рака шейки матки HeLa и карциномы почки A498) и перевитых опухолей *in vivo* (рака почки РА, рак печени PC-1 и саркомы 45) при

воздействии флавоноидсодержащего экстракта аврана, а также исследовать *in vitro* возможность преодоления ее развития.

7. Оценить особенности патоморфоза перевитых опухолей различного гистогенеза (рака почки РА, рак печени РС-1 и саркомы 45) у животных, а также изменения степени выраженности пролиферации, ангиогенеза, апоптоза и аутофагии опухолевых клеток под влиянием экстракта аврана с помощью иммуногистохимических маркеров Ki67, EGFR, VEGF, p53, Bax, Bcl-2, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B.

8. Провести анализ морфологических изменений во внутренних органах лабораторных животных в условиях моделирования опухолевого процесса (рака почки РА, рак печени РС-1 и саркомы 45) в группах с введением экстракта аврана и без его применения.

Научная новизна исследования

Установлено, что морфологические признаки повреждения в виде вакуолизации цитоплазмы, округления формы клеток, кариорексиса, а также гибель $0,6 \pm 0,5\%$ неопухолевых клеток почки эмбриона свиньи SPEV развиваются при действии экстракта аврана в концентрации 1,5 мг/мл., в отличие от опухолевой культуры HeLa, в которой при той же концентрации описанные морфологические изменения и гибель клеток наблюдаются в $41,5 \pm 5\%$.

Впервые в экспериментах на клеточных культурах опухолей человека (Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарцином молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, карцином почки A498, Сакі-1, Sn12с, рака шейки матки HeLa) установлено, что снижение количества опухолевых клеток, их гибель путем некроза или апоптоза, а также появление или блокирование образования аутофагосом зависят от концентрации флавоноидсодержащего экстракта аврана (Патент РФ № 2018105419).

Установлено, что апоптоз в опухолевых клетках Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов бессмертника и аврана реализуется через механизм активации каспаз (каспаза-3).

Выявлены особенности морфологии и экспрессии маркеров ангиогенеза, пролиферации, аутофагии и апоптоза (EGFR, VEGF, Ki67, Bax, Bcl-2, p53, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B) в клетках и тканях перевитых опухолей животных (рака почки РА, рака печени РС-1 и саркомы 45) в экспериментах *in vivo* без воздействия и после введения экстракта аврана.

Впервые определено, что в основе развития патоморфоза перевиваемых опухолей 2-3 степени (рака почки РА, печени РС-1 и саркомы 45) в 80% наблюдений лежит апоптоз опухолевых клеток, развивающийся под влиянием экстракта аврана (Патент РФ №2519769). Особенностью патоморфоза опухоли мезенхимального происхождения саркомы 45 является разрастание стромы опухоли без признаков предшествующего некроза, а опухоли эпителиального происхождения (рака почки РА) – появление гигантских клеток.

Установлено, что патоморфоз 2-3 степени, развивающийся в перевитых опухолях при применении экстракта аврана, не сопровождается развитием выраженных дистрофических и некротических процессов в паренхиме внутренних органов и веществе головного мозга (Патент РФ № 2578440).

Выявлено, что у самцов белых беспородных крыс с перевитыми опухолями (рака почки РА, печени РС-1 и саркомы 45) под действием экстракта аврана к концу эксперимента в 80% случаев происходит увеличение массы тела в среднем на 25% и размеров иммунокомпетентных органов (селезёнки, перибронхиальных и мезентериальных лимфатических узлов) в отличие от группы сравнения.

Определено, что морфологическим критерием и предиктором развития резистентности клеток опухоли (культур рака шейки матки HeLa и карциномы почки A498 и перевитых опухолей рака почки РА, рака печени РС-1 и саркомы 45) к воздействию флавоноидсодержащего экстракта аврана является экспрессия белка LC3B – маркера аутофагии. Также установлено, что аутофагосомы в опухолевых клетках рака шейки матки HeLa и аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 не образуются при адресной доставке экстракта аврана в клетку за счет его микрокапсулирования.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установленный факт торможения пролиферации опухолевых клеток за счет их перехода в период покоя G0, блокирование цитопротекторной аутофагии и одновременно активации механизмов апоптотической гибели объясняет противоопухолевое действие флавоноидсодержащих экстрактов, которое существенно отличается от известного ранее действия противоопухолевых средств, содержащих алкалоиды.

Для определения выраженности патоморфоза в экспериментальной морфологии могут использоваться установленные информативные показатели чувствительности опухолевых клеток к воздействию флавоноидсодержащих экстрактов: активность роста клеток в культуре (соотношение среднего количества клеток в поле зрения при воздействии экстракта к этому же показателю в контроле); доля клеток в состоянии аутофагии от общего числа живых клеток в культуре, а также корреляция процента клеток в аутофагии от общего числа жизнеспособных клеток и доля мертвых клеток от общего числа клеток; индекс пролиферации (соотношение среднего количества живых клеток в поле зрения при воздействии к этому же показателю в контроле), доля клеток на стадии мета-, ана- и телофазы митоза от числа живых клеток; впервые предложенный нами показатель апоптотической константы (AC50) – концентрации экстракта, при которой, по сравнению с контролем, за сутки определяется половина клеток с признаками апоптоза, а также среднелетальная концентрация (LC50), при которой наблюдается 50% гибель клеток от числа клеток в контроле.

Критерием низкой чувствительности опухолей к воздействию флавоноидсодержащих экстрактов является появление в опухолевых клетках аутофагосом; одним из путей предупреждения развития цитопротекторной аутофагии является адресная доставка экстракта в клетку за счет его микрокапсулирования.

Применение иммуногистохимического маркера аутофагии LC3B при оценке патоморфоза опухоли позволяет выявить случаи с началом развития резистентности и провести адекватную оценку ответа опухоли на лечение.

Примененный в работе комплексный подход с использованием широкого набора морфологических методов исследования позволяет выявить особенности лечебного патоморфоза опухолей различного гистогенеза в экспериментах *in vivo* под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов.

Методология и методы исследования

Методология работы построена на совокупности экспериментальных и аналитических методов и на системном и комплексном анализе имеющихся и полученных данных. Методы, использованные в работе: культуральный метод, флуоресцентные методы окраски, методы проточной цитофлуориметрии, электронной микроскопии, морфологические, морфометрические методы, включая гистохимические (Pas-reaction, WGA, окраска ОКГ, окраска ДНК и РНК по Браше) и иммуногистохимические маркеры: Ki67, EGFR, VEGF, p53, Bax, Bcl-2, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B, статистическая обработка результатов.

Связь с планом научных исследований

Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы кафедры патологической анатомии и кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России «Поиск, разработка и доклинические испытания *in vivo* и *in vitro* фармацевтических биологически активных композиций, содержащих биофлавоноиды», номер гос. регистрации И131114161615, а также при финансовой поддержке программы «Умник», в рамках госзадания Минздрава РФ на тему: «Разработка препаратов на основе флавоноидсодержащих экстрактов лекарственных растений», стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2016-2018 годы, при финансовой поддержке РФФИ (2018, 2019 год) и мегагранта Правительства РФ №075-15-2019-1885 (2019, 2020 год).

Положения, выносимые на защиту

1. Замедление темпов роста перевитых опухолей разного гистогенеза (рак печени РС-1, рак почки РА и саркома 45) и развитие патоморфоза опухоли 2-3-й степени, снижение пролиферации за счет перехода клеток в период G0, снижение ангиогенеза, блокирование аутофагии и активация апоптоза в клетках опухолей животных, подтвержденное иммуногистохимическими методами исследования с маркерами EGFR, Ki67, VEGF, Bax, Bcl-2, p53, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B, обусловлены реализацией противоопухолевого эффекта экстракта аврана.

2. Активация апоптоза в опухолевых клетках перевитых опухолей животных (рака печени РС-1, почки РА и саркомы 45) под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов происходит как за счет внешнего, так и митохондриального путей, а реализация – через активацию каспазы-3.

3. Аутофагия, развивающаяся в опухолевых клетках культур рака шейки матки человека HeLa, рака почки человека A498 и перевитых опухолей животных: рака печени РС-1, почки РА и саркомы 45 под действием флавоноидсодержащих экстракта аврана, имеет цитопротекторный характер и в данном случае не является механизмом клеточной гибели.

4. Полученные с помощью цитологических, морфологических и молекулярно-генетических методов исследования результаты позволяют считать появление аутофагосом в опухолевых клетках культур рака шейки матки человека HeLa, рака почки человека A498 и перевитых опухолей животных: рака печени РС-1, почки РА и саркомы 45 морфологическим маркером проявления резистентности опухоли на воздействие экстракта аврана, обладающего противоопухолевым эффектом.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность описанных результатов в диссертационном исследовании, сделанных выводов, обсуждений и заключения подтверждается:

1. Соответствием выполненной работы биоэтическим требованиям при работе с лабораторными животными, корректно проведенным обоснованием объема опытных и контрольных групп.

2. Объемом использованного в работе материала: 220 лабораторных крыс, 11 штаммов клеточных культур, 3 штамма перевитых опухолей различного гистогенеза, гистологические блоки – 2154 шт., гистологические микропрепараты – 3558 шт., микрофотографии гистологических препаратов – 583 шт., микрофотографии клеточных культур – 4123 шт., электронограммы – 25 шт.

3. Высоким научно-методическим уровнем с применением традиционных и современных гистологических, морфометрических, иммуногистохимических и культуральных методов исследования с использованием современного научного оборудования исследовательского класса (проточный цитофлуориметр, флуоресцентный, конфокальный и электронный микроскопы, микровизор медицинский).

4. Применением адекватных в каждом случае статистических методов (параметрических и непараметрических).

Результаты исследований докладывались и обсуждались на следующих конференциях: International Conference «Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Pharmacology, Medicine» (Санкт-Петербург, 2011); VIII Всероссийской Бурденковской студенческой научной конференции (Воронеж, 2012); I-III Всероссийских неделях науки с международным участием (Саратов, 2012-2014); VII и VIII Саратовских салонах изобретений, инноваций и инвестиций «Модернизация, инновации, инвестиции» (Саратов, 2012, 2013); VII-XI Международных (XVI- XX Всероссийских) Пироговских научных медицинских конференциях студентов и молодых ученых (Москва, 2012-2017); X, XII и XIII Всероссийских научно-практических конференциях «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 2013; Москва, 2015, 2016); VIII и IX Съездах онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, 2014; Минск, 2016); Всероссийской конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования в онкологии» (Ростов-на-

Дону, 2015); Общероссийских научно-практических мероприятиях «Эстафета вузовской науки» (Москва, 2014, 2015); «Saratov Fall Meeting - 2014, 2015»: International Symposium Optics and Biophotonics-III (Saratov, 2014, 2015); Всероссийских инновационных конвентах (Москва, 2013, 2015); The 43rd Annual meeting of the international society on oxygen transport to tissue «ISOTT-2015» (Wuhan, China, 2015); In Vitro to In Vivo Extrapolation for High Throughput Prioritization and Decision Making (North Carolina, USA, 2016); XXI Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2017 г.); конференции «Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно-технологического развития страны» (Самара, 2017); Российско-Китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (XX Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2017 г.); International Symposium Optics and Biophotonics-V 21st International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics (Saratov, 2017 г.); XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017 г.); Конференции «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017 г.); Сеченовском международном биомедицинском саммите (Москва, 2017); Всероссийской молодежной медицинской конференции с международным участием «Алмазовские чтения – 2018» (Санкт-Петербург, 2018 г.); X Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Сочи, 2018 г.); XXII Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2018 г.); International conference biomembranes (Moscow, 2018 г.); 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research (Tomsk, 2018), VII Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2019).

Личный вклад автора

Автор лично участвовал на всех этапах исследования: от постановки задач до обсуждения результатов. Автором непосредственно выполнены эксперименты *in vitro* и *in vivo*, а также произведен забор аутопсийного материала; выполнен комплексный анализ полученных результатов гистологического, морфометрического и иммуногистохимического методов исследования. Осуществлен подбор и анализ наиболее подходящих цитологических характеристики клеток как в экспериментах *in vitro*, так и в ткани перевитых опухолей, внутренних органах, выполнен аналитический и статистический анализ полученных результатов; сформулированы научное обоснование и выводы. Автором лично были написаны и оформлены тезисы, статьи и патенты к публикации.

Приношу свою благодарность за консультативную помощь в трактовке результатов по клеточным культурам сотрудникам ИБФРМ РАН д.б.н. В.А. Богатыреву, к.б.н., А.А. Широкову и сотрудникам НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина д.м.н., проф. А.Ю. Барышникову, к. фарм. н., М.А. Барышниковой, к.б.н., Д.А. Хоченкову, д.м.н., Е.В. Степановой, а также за создание адресных способов доставки экстрактов и их испытания сотрудникам Лаборатории дистанционно управляемых систем для тераностики СГУ им

Н.Г. Чернышевского д.ф.-м.н., Г.Б. Сухорукову; д.х.н., Д.А. Горину, к.ф.-м.н., М.В. Ломовой.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры патологической анатомии, научную работу Центра коллективного пользования ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И. Разумовского, а также в учебный процесс кафедры патологии животных СГАУ им. Н.И. Вавилова, Международного научно-образовательного центра оптических технологий в промышленности и медицине «Фотоника» ФГБОУ ВО СГУ им. Н.Г. Чернышевского и Центра коллективного пользования ФГБУН ИБФРМ РАН.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 58 публикаций, в том числе 26 работ, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, по научным специальностям и соответствующим им отраслям науки; 16 публикаций в зарубежных изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science; получено 6 патентов на изобретение и подана 1 заявка на изобретение. Опубликована глава в зарубежной монографии издательства Elsevier. Общий объем публикаций составляет 20,14 печатных листов.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Материал изложен на 268 страницах печатного текста, содержит 34 таблицы и иллюстрирован 120 рисунками, содержащими 234 микрофотографии, 4 электронограммы и 55 графиков. Указатель литературы содержит 355 источников, из них 88 отечественных и 267 зарубежных публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен **литературный обзор**, в котором рассматриваются особенности патоморфоза опухолей, программируемая клеточная гибель, как механизм действия противоопухолевых препаратов нового поколения.

Глава 2 посвящена описанию **материала и методов исследования**.

Объектами исследований *in vitro* стали культуры клеток: SPEV – культура эпителиальных клеток почки эмбриона свиньи; HeLa – рак шейки матки; SK-BR-3, MCF-7 – аденокарцинома молочной железы; Jurkat – Т-клеточный лимфобластный лейкоз; A549 – карцинома легкого; PC-3 – карцинома простаты; HCT-116 – карцинома толстой кишки; A498, Caki и Sn12c – карциномы почки;

Для оценки морфологических изменений клеток, апоптоза и аутофагии использовали флуоресцентные красители: акридиновый оранжевый, йодистый пропидий, ядерный краситель Хёкст. Анализ образцов проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon 80i (Япония) при 435-485 нм. Определение апоптоза проводили на проточном

цитофлуориметре (FACSCantoII (BecktonDickenson, USA.) методом двойного окрашивания аннексином (Invitrogen, Life Technologies, USA) и йодистым пропидием. Каспазо-зависимый апоптоз (активация каспазы-3) был исследован на проточном цитофлуориметре с помощью кита с anti-caspase-3-FITC (BD) на клеточной линии Jurkat.

Оценку индукции аутофагии выполняли на клеточном анализаторе Muse с реагентами Muse Autophagy LC3-Antibody Based Kit (Abcam, USA).

Электронную микроскопию проводили на электронном микроскопе LIBRA 120 «Carl Zeiss» (Германия) на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Оценку уровня экспрессии генов, ассоциированных с путями клеточной гибели в клетках карциномы почки человека (линия A498) выполняли методом *in silico*. Были использованы базы данных SRA (Sequence Read Archive; NCBI), содержащей архивы «сырых» результатов высокопроизводительного секвенирования.

Эксперименты *in vivo* выполнены на 220 белых половозрелых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 150±20 гр. Исследование с лабораторными животными проводили в соответствии с протоколом исследований, которые не противоречили Хельсинкской декларации 2000 г. о гуманном отношении к животным. Протоколы исследования и дизайны экспериментов были заслушаны и одобрены этической комиссией ГБОУ ВПО СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол №13 от 3 мая 2011 г.). При разработке дизайна экспериментов использовали «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н., 2012).

Во всех группах животным подкожно вводили в области лопатки по 0,5 мл 25% взвеси опухолевых клеток рака почки РА, рака печени РС-1 или саркомы SA. После аутопсии забирали и взвешивали внутренние органы. Рассчитывали индекс массы органов «К», по формуле: Индекс К=М органа/М животного x100. Индекс торможения роста опухоли (ИТРО)=[(Мконтр – Мопыт)/Мконтр]*100%, где Мконтр – средняя масса опухоли в группе контроля, а Мопыт – масса опухоли опытной группы. Гистологические методы исследования проводили стандартными методами и с применением гистохимических методик окраски: окраска метиловым зеленым пиронином по Браше, PAS- реакция, окраска на лектин WGA, ОКГ.

Иммуногистохимическое исследование образцов опухоли проводили на парафиновых срезах. Использовали систему детекции REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System (Amsbio, UK) с антителами (ABCAM, UK) в разведении от 1:50 до 1:100. Использовали следующую панель моно- и поликлональных антител: маркеры апоптоза (p53 (clone PAb 1801, ab28), Bax (clone 100/D5, ab692), bcl-2 (ab54829), Fas-receptor (ab15285), Fas-ligand (ab82419) для установки возможного пути его реализации, аутофагии LC3b (ab48394), маркер пролиферации Ki67 (clone SP6, ab16667) и ангиогенеза VEGF (clone JH121, ab28775). При окраске с иммуногистохимическими маркерами использовали положительный и отрицательный контроль. Подсчитывали средний процент клеток с экспрессией в 30 полях зрения. Степень выраженности экспрессии оценивали полуколичественным методом: слабая (+), умеренная (++), выраженная (+++).

Морфометрию с микросъемкой проводили с помощью Микровизора проходящего света μ Vizo-103 (ЛОМО, Россия), измерения клеток выполняли в 10 полях зрения каждого гистологического препарата, при увеличениях 246,4 и 774.

Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel. Нормальность распределения показателей определяли критерием Шапиро-Уилка. Для сравнения показателей, полученных в исследовании при их параметрическом распределении, но без равенства дисперсий, был использован критерий Крамера-Уэлча (T). Данный метод позволяет и допускает множественные сравнения в группах (Welch B.L., 1951; Гржибовский А.М., 2008). При непараметрическом распределении данные проверяли на возможность множественных сравнений критерием Краскела-Уоллиса, а значимость различий между конкретными группами определяли при помощи критерия Манна-Уитни (U/Z-критерий). Отличия считали на уровне значимости при $p < 0,05$ (Гланц С., 1998). Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовали для выявления и оценки корреляционных связей (Гланц С., 1998).

В главах 3,4,5,6,7 представлены результаты собственных исследований.

В экспериментах *in vitro* проводили сравнительный анализ влияния экстрактов на опухолевую культуру HeLa и неопуховую культуру SPEV для оценки избирательности действия экстрактов именно на раковые клетки. Наибольшее число клеток в апоптозе, снижение общего числа опухолевых клеток и клеток в митозе отмечали при воздействии экстракта аврана, обращало на себя внимание тот факт, что концентрация LC50 экстракта аврана для опухолевых клеток была в 7 раз ниже, чем для неопуховых.

При оценке морфологических изменений опухолевых клеток в динамике через 24, 48 и 72 часа после воздействия экстрактами было установлено, что наиболее наибольшее количество клеток в апоптозе образуется под действием экстракта аврана во всех исследованных культур опухолевых клеток уже через 24 часа после воздействия.

Опухолевые культуры имели разную чувствительность к экстракту. Так, в культуре клеток HeLa выявлено 40% апоптоза опухолевых клеток уже при минимальной концентрации экстракта аврана (0,035 мг/мл), а в культуре клеток карциномы молочной железы – только 2%. При более высокой концентрации 0,9 мг/мл более 70% апоптоза обнаружили в культурах клеток HeLa, Sn12си SKBR-3, а Сакі-1 – только 19%. Через 48 часов и 72 часа тенденция сохранялась. С помощью проточной цитофлуометрии была оценена чувствительность 7 штаммов опухолей человека. Установлено, что наибольшее количество клеток с признаками апоптоза выявлялись при воздействии экстрактом аврана в концентрации 0,9 мг/мл: от 69,5% погибших через апоптоз на линии карциномы простаты PC-3 до 97,8% на линии аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 (Рисунок 1).

Проведенный тест с anti-caspase-3-FITC (BD) показал, что под действием экстракта бессмертника и аврана в опухолевой линии Jurkat развивается каспазо-зависимый апоптоз, и его индукция осуществляется через каспазу-3. Таким образом, была подтверждена апоптотическая активность и установлен механизм запуска апоптоза под действием

флавоноидов, что не противоречит имеющимся данным в литературе (Wang I.K., 2009; Polier G., 2011).

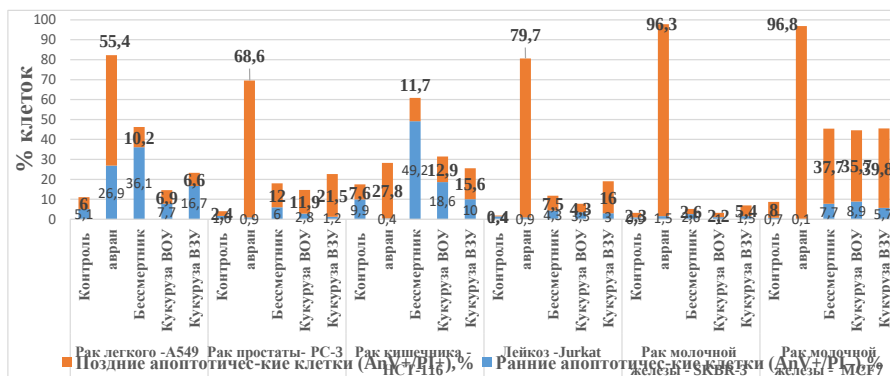


Рисунок 1. Результаты проточной цитофлуориметрии по воздействию экстрактов авраана лекарственного, бессмертника песчаного и антоциановой кукурузы в концентрации 0,9 мг/мл в отношении опухолевых клеток человека: Jurkat - Т-клеточного лимфобластного лейкоза, MCF-7 - аденокарциномы молочной железы, A549 - карциномы легкого, PC-3 - карциномы простаты, HCT-116 - карциномы толстой кишки, A498 - карциномы почки, SK-BR-3 - карциномы молочной железы.

Установлено, что при малых концентрациях экстракта авраана в опухолевых клетках выявлялись аутофагосомы. При увеличении концентрации экстракта до 0,75 мг/мл процесс образования аутофагосом блокировался, и развивалась гибель клеток. В результате корреляционного анализа в культуре Hela была выявлена обратная двусторонняя взаимосвязь средней силы ($r=-0,56$, $p=0,004$) между концентрацией и долей клеток с аутофагосомами и обратная двусторонняя взаимосвязь средней силы ($r=-0,41$, $p=0,0036$) между количеством клеток с аутофагосомами и процентом погибших клеток, а также прямая двусторонняя взаимосвязь средней силы ($r=0,57$, $p=0,004$) между концентрацией и долей погибших клеток.

Для подтверждения факта активации аутофагии в опухолевых клетках на проточном цитофлуориметре с использованием окраски Muse Autophagy LC3-Antibody BasedKit было установлено, что под действием экстракта авраана выявлялась аутофагия в клетках рака почки A498. Процент клеток с аутофагосомами зависел от концентрации экстракта авраана. Число клеток с экспрессией LC3B повышалось при концентрациях от 0,004 до 0,056 мг/мл, а при концентрации от 0,113 до 3,6 мг/мл число клеток с LC3B снижалось (Рисунок 2).

Максимальное количество аутофаголизосом в клетках карциномы почки наблюдалось при концентрации экстракта авраана 0,056 мг/мл. Кроме того, *in silico* методом картирования массива сырых ридов на референс (оригинальный алгоритм Geneious), в качестве которого выступали транскрипты 82 генов ПГК, было установлено, что в неподверженной к внешним воздействиям клеточной культуре карциномы почки человека сравнительно больших показателей достигает экспрессия генов, ассоциированных именно с аутофагией (APP, CTSB, IGF1, SQSTM1 и др.).

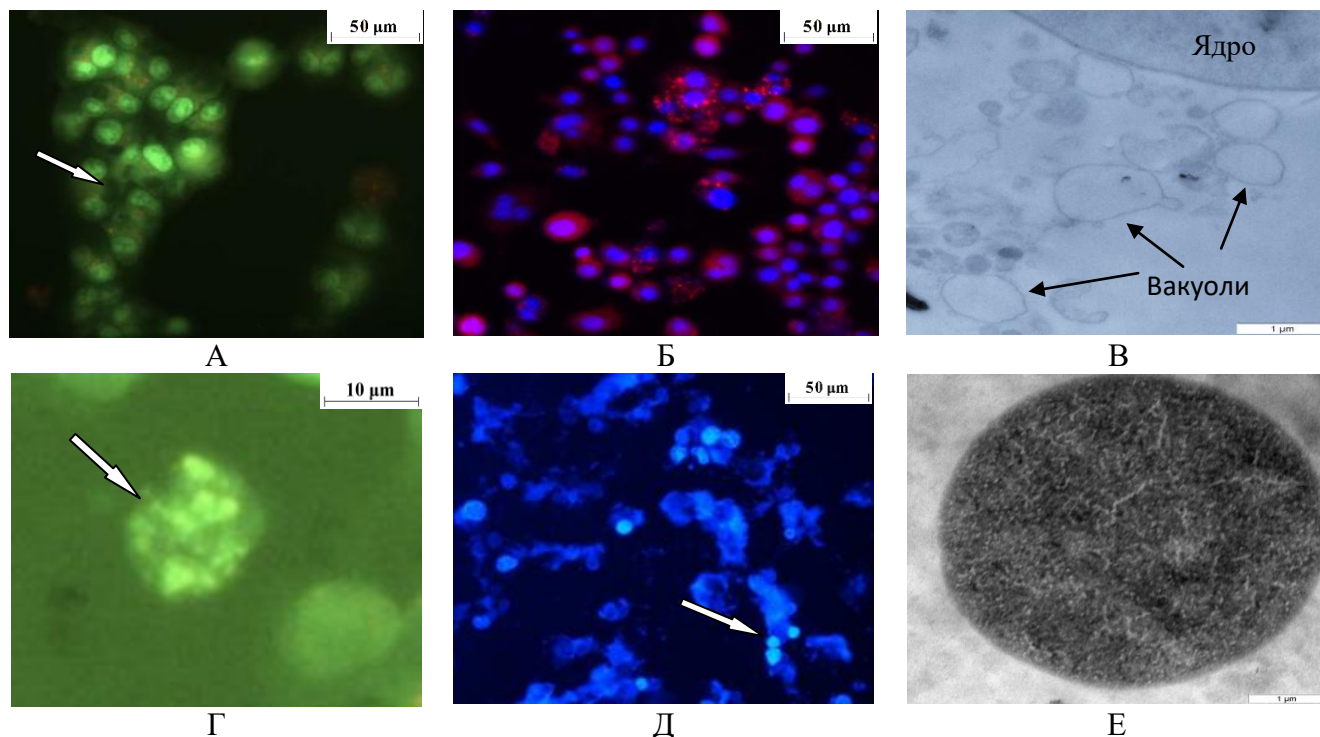


Рисунок 2. А - Клетки культуры HeLa через 72 часа после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0,18 мг/мл: образование аутофаголизосом; Б - Аутофагия в клетках карциномы почки человека A498 при концентрации экстракта аврана 0,056 mg/ml (Muse Autophagy LC3-Antibody BasedKit (Millipore Sigma) – красное свечение); В – Вакуоли (аутофагосомы) на электронограмме в клетках HeLa через 24 часа после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0,4 мг/мл; Г – Пикноз ядра клетки в культуре HeLa через 24 часа после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0,8 мг/мл (окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием); Д – Апоптотические тельца (обозначены стрелкой) и пикноз ядер в клетках линии Saki под действием экстракта аврана через 24 часа при концентрации 0,9 мг/мл (окраска красителем Хехст 33258); Е - Конденсация ядерного хроматина (пикноз) на электронограмме в клетке культуры HeLa через 24 часа после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 3 mg/ml.

Таким образом, не только экспрессия гена MUC13 отвечает за высокую резистентность рака почки (Zhang L. et al, 2011; Sheng Y. et al, 2017), но и экспрессия генов аутофагии. Можно предположить, что именно аутофагия объясняет обратимость устойчивости рака почки A498 при применении комбинированной терапии в отличие от стандартной.

В литературе нет однозначного мнения о роли аутофагии в опухолевых клетках. Некоторые исследователи считают, что экспрессия LC3B связана с худшим прогнозом течения заболевания (Tang J.Y. et al, 2013; Liu J.L. et al, 2014; Lai K. et al, 2018), отмечая, что аутофагия может развиваться в опухолевых клетках как защитный механизм при лечении (Yamaguchi M. et al, 2017).

Мы разделяем данную точку зрения и считаем, что аутофагия, возникающая под действием флавоноидсодержащих экстрактов, не приводит клетку к гибели, а наоборот, способствует ее выживанию в условиях противоопухолевой терапии. Так, при проведении проточной цитофлуориметрии в экспериментах *in vitro* при воздействии экстрактом аврана на клетки рака почки было установлено, что 95,9% клеток находились в апоптозе, а у 25,8% наблюдалась аутофагия, то есть, как минимум 20% клеток с аутофагией погибали

через апоптоз. Полученные данные свидетельствуют о запуске апоптоза в опухолевой клетке в тот момент, когда в ней начинает блокироваться цитопротекторная аутофагия.

Таким образом, наиболее выраженные изменения в опухолевых клетках развивались под воздействием экстракта аврана, что определило его перспективность для дальнейшего исследования в экспериментах *in vivo*.

В экспериментах *in vivo* дизайн исследования был унифицирован по пути и длительности введения экстракта и его дозировке. Экстракт вводился перорально и внутримышечно в дозировке 110 мг/кг/суток в течение 2-х недель.

Установлено, что экстракт аврана на протяжении всего эксперимента значительно снижал темпы роста всех трех опухолей. Индекс торможения роста опухоли (ИТРО) перевитой саркомы 45 составил 71,6% при внутримышечном введении и 61,7% – при пероральном.

При внутримышечном пути введения ИТРО для рака почки РА составил 73% и 71% – при пероральном введении экстракта аврана. В отношении перевитого рака печени РС-1 ИТРО по массе составил 66% для перорального и 67% – для внутримышечного пути введения экстракта.

Обращало на себя внимание то, что у животных с перевитыми саркомой 45 и раком печени РС-1 экстракт аврана приводил к набору массы тела в среднем на 15%, оказывая стойкий антикахексический эффект. Патоморфоз изучаемых опухолей проявлялся в виде развития дистрофических и некротических изменений в клетках, уменьшения общего количества клеток, размеров ядра и самой клетки. Клетки опухоли приобретали округлую форму и теряли между собой контакты, располагаясь разрозненно, что, по мнению ряда авторов (Guo K., Kang N.X., 2009), служило признаком, отличающим апоптоз от начинающегося некроза.

В ткани саркомы 45 под действием экстракта были обнаружены признаки организации стромы опухоли без развития предшествующего некроза. Возможно, это объясняется изменением под действием экстракта функции опухоль-ассоциированных фибробластов, изучению роли которых в прогрессировании опухолевого роста в настоящее время уделяется большое внимание (Correia A. L., Bissell M.J., 2012; Dittmer J., Leyh B., 2015).

Выраженный патоморфоз ткани всех трех перевитых опухолей под действием экстракта аврана проявлялся развитием атрофических и некробиотических морфологических изменений в ткани опухоли: уменьшением в среднем в 1,5 раза размера клетки и ядра, а также уменьшением, вплоть до полного отсутствия, экспрессии маркера пролиферации Ki67 (индекс Ki67 при обоих путях введения был равен 0, в то время как в группах сравнения в среднем был равен 0,48); отсутствием митозов и уменьшением количества РНК в ядрах, которое оценивали методом Браше. Этот факт указывал на низкую митотическую и транскрипционную активность опухоли и подавление интерфазного периода клеточного цикла в S- и G2 - фазах и их перехода в период покоя G0. А наблюдаемое нами снижение синтеза РНК, как известно (Polier G., Ding J., 2011),

приводит к быстрому уменьшению количества короткоживущих антиапоптотических белков и служит предвестником каспазного пути активации апоптоза.

Мы также отмечали проявления морфологических признаков апоптоза: появление апоптотических телец, уменьшение ядра и клетки и начало конденсации хроматина. Все описанные изменения были в 1,5-2 раза более выражены при внутримышечном пути введения экстракта по сравнению с пероральным.

На следующем этапе работы нами были определены иммуногистохимические профили пролиферации, ангиогенеза, апоптоза и аутофагии для перевитых опухолей: саркомы 45, рака почки РА и печени РС-1 (Таблица 1).

После введения животным экстракта аврана экспрессия изученных маркеров качественно менялась во всех изученных перевитых опухолях: полностью блокировалась экспрессия маркера пролиферации Ki67, маркера EGFR (при раке печени РС-1) и маркера ангиогенеза VEGF, то есть клетки опухоли находились в периоде G0, что подтверждалось отсутствием митозов, которые встречались в группе сравнения до 2-х в поле зрения, что согласуется с ранее полученными в экспериментах *in vitro* данными других авторов о способности флавоноидов влиять на пролиферацию и ангиогенез (Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E., 1997; Chahar M.K., Sharma N., Dobhal M.P., 2011). Экстракт аврана приводил к активации различных путей программированной гибели клеток: апоптоза (p53, Bax, CD95 (Fas/APO-1), FAS-ligand) и аутофагии (LC3B) (Рисунки 3).

Обращало на себя внимание то, что экспрессия маркеров активации апоптоза наблюдалась даже в безъядерных клетках, что позволило предположить, что обширные поля безъядерных клеток, появляющиеся в опухоли под действием экстракта, образованы клетками, погибшими через апоптоз, а не через некроз.

Экспрессия маркера аутофагии LC3B увеличивалась при пероральном пути введения экстракта аврана. При внутримышечном введении экстракта происходило снижение выраженности экспрессии и количества клеток в состоянии аутофагии, что свидетельствует о блокировании протекторной аутофагии. Данные результаты согласуются с полученными данными в экспериментах *in vitro* о концентрационной зависимости развития протекторной аутофагии: при недостаточной концентрации происходит активация протекторной аутофагии, а при увеличении концентрации – блокирование этого процесса (Рисунок 3).

Полученные таким образом в настоящей работе данные по дозозависимой аутофагии опухолевых клеток под действием экстракта аврана позволили затронуть еще одну актуальную проблему в онкологии, а именно развитие резистентности опухолевых клеток к лечению. Исследования показали, что появление факта аутофагии может считаться признаком развития резистентности опухоли к действию препаратов из-за его недостаточной дозировки, и это необходимо учитывать при оценке степени ответа опухоли на проводимое лечение и определения дальнейшей тактики в лечении пациентов. Поэтому становится еще более актуальным вопрос о преодолении цитопротекторной аутофагии путем адресной доставки лекарств.

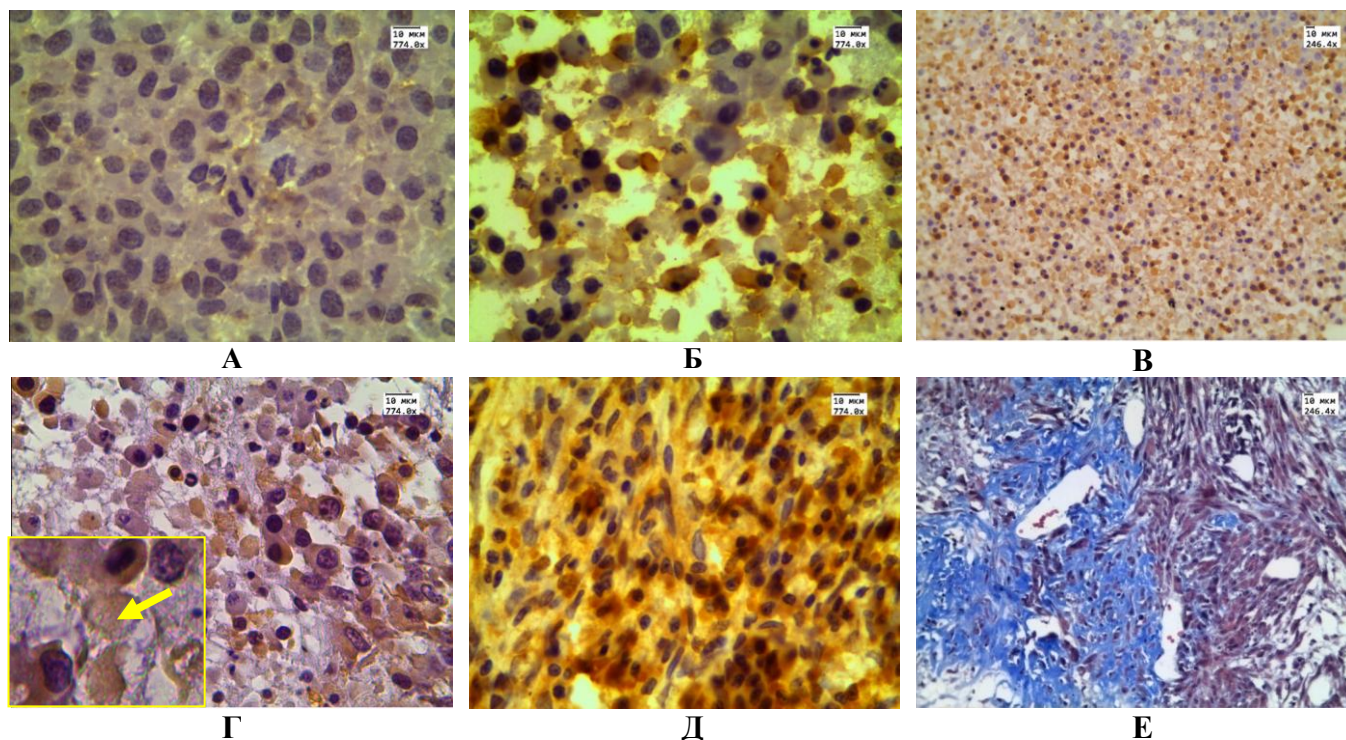


Рисунок 3. Иммуногистохимическое окрашивание ткани рака почки: А) группа сравнения Ув. 774. (p53); Б) экспериментальная группа с внутримышечным введением экстракта аврана Ув. 774. (p53). В) - экспериментальная группа с внутримышечным путем введения экстракта аврана. Ув. 246. (Вах). Г) группа с пероральным путем введения экстракта аврана (LC3В). Ув. 774.

Иммуногистохимическое окрашивание ткани саркомы: Д) на маркер апоптоза CD95 (Fas/APO-1) в группе с внутримышечным введением экстракта аврана Ув. 774; Е) склероз стромы опухоли при пероральном введении экстракта аврана. Окраска ОКГ Ув. 246,4.

Экстракт аврана был закапсулирован, и при действии капсул на опухолевые клетки мы получили их 100% гибель. Полученные результаты позволяют считать микрокапсулирование эффективным способом преодоления протекторной аутофагии, но требует дальнейшего изучения в экспериментах *in vivo*. Было установлено, что в местах введения экстракта аврана развиваются только обратимые патологические процессы в виде кровоизлияний, отека, в единичных случаях – незначительной лейкоцитарной инфильтрации. Во внутренних органах экспериментальных животных введение экстракта аврана уменьшало степень выраженности дистрофических процессов, обусловленных ростом опухоли. Со стороны органов иммунной системы наблюдали увеличение массы и размеров фолликулов селезенки и появление в них четко оформленных светлых центров, а также увеличение перибронхиальных лимфатических узлов.

В главе 8 проведено обсуждение полученных результатов и их сопоставление с данными литературы. В заключении подведены итоги полученных результатов. Таким образом, установлено, что биофлавоноиды, входящие в состав экстракта аврана, не вызывают выраженных морфологических изменений в клетках внутренних органов в отличие от опухолевой ткани, где развивается патоморфоз 2-3 степени, за счет активации апоптоза и блокирования цитопротекторной аутофагии в опухолевых клетках. Установленная роль аутофагии в онкопатологии человека и связь с иммуногистохимическим маркером LC3В может использоваться как морфологический критерий оценки эффективности противоопухолевой терапии.

Таблица 1 - Экспрессия иммуногистохимических маркеров в клетках рака печени РС-1, рака почки РА и саркомы 45 в группе сравнения и экспериментальных группах под действием экстракта аврана. Медиана (% экспресс. клеток); (квартиль 25 - 75); [min-max]

Группы Маркер	Рак печени РС-1						Рак почки РА			Саркома 45		
	Сравнения		В/м		Перорально		Сравнени я	В/м	Перорально	Сравнения	В/м	Перорально
	3 недели	4 недели	3 недели	4 недели	3 недели	4 недели						
Ki67 (проли фе- рация)	98 (98-99) [95-100]	99 (98-99) [96-100]	0 *	0 *	0 *	0 *	48 (43-54) [52-55] ++/+++	0 *	1 (0-1) [0-1]*	56 (47-62) [44-63] +++	1±0,4* (0-2) [0-3] +	9±0,1* (5-15) [3-16] +
EGFR	94 (40-51) [39-53] +++	96 (39-56) [37-61] +++		3,4* (3-5) [2-6] +		5,6* (3-7) [2-9] +	0	0	0	92 (75-96) [70-97] +/++	0*	0*
VEGF (ангио генез)	27 (20-34) [18-37]++	31 (22-37) [19-39]++	0*	0*	0*	0*	70 (43-85) [41-87] +/+++	0*	0*	85 (72-89) [65-92] ++	0*	5 (3-6) [2-11] +
LC3B (аутофа гия)	0	0	0	0	0	5,4* (4-6) [3-8]+++	7,8 (6-10) [4-11] ++	1,2* (0-2) [0-2] +	12,3* (8-15) [7-17] ++	0	0	11 (8-15) [6-19] +
Маркеры активации и блокирования апоптоза												
p53	2 (1-4) [0-6] ++	4 (2-6) [0-9] ++	97,7* (84-98) [81-100] ++/+++	92,3* (83-95) [79-100] ++/+++	91,6* (87-94) [83-99] +++	85,4* (81-92) [75-98] +++	0	60,5* (48-62) [45-68] ++/+++	37,5* (30-42) [29-45] ++/+++	0	67* (51-81) [49-86] +++	36* (32-43) [31-46] +
Bcl-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bax	0	0	7* (3-8) [2-10]++	5* (2-6) [1-10]+	6 * (3-11) [1-12]++	6* (2-8) [0-9]+	0	58,2* (41-63) [38-65] ++	0±0	0	44,7* (40-51) [39-53] ++	41,6* (37-50) [30-52] ++
CD95 (F as/APO- 1)	0	0	31* (28-34) [35-36] ++	28* (25-31) [22-33] +	24* (21-27) [19-31] +	15* (13-18) [0-9]+	0	83,1* (68-95) [65-99] +++	24,6* (11-34) [8-41] +++	0	40,3* (31-42) [30-45] +++	38,7* (31-48) [29-49] +++
FAS- ligand	82 (75-89) [71-93]+		83±11 (78-89) [75-92]++	20* (19-31) [16-35]+	80 (71-90) [69-93]++	16* (14-18) [11-21]+	0	38,4* (32-42) [29-45] +	49,1* (21-65) [18-68] +++	0	67* (51-81) [49-86] +++	36* (32-43) [31-46] +

Примечание: * – при $p < 0,05$ достоверность различий при сравнении значений опытной группы и группы сравнения определяли с помощью критерия Манна-Уитни.

+, ++, +++ - степень выраженности экспрессии (слабая, умеренная и выраженная).

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в неопухолевых клетках почки эмбриона свиньи SPEV и опухолевой культуре HeLa при действии экстракта аврана в концентрации 1,5 мг/мл морфологические признаки повреждения имеют сходный характер и проявляются вакуолизацией цитоплазмы, округлением формы клеток, развитием кариорексиса. Однако в клетках почки эмбриона свиньи SPEV гибель клеток развивается в $0,6 \pm 0,5\%$ случаев, а в опухолевой культуре HeLa – в $41,5 \pm 5\%$ случаев, что в 66 раз больше.

2. Наиболее информативными морфологическими показателями для оценки противоопухолевой эффективности флавоноидсодержащих экстрактов являются: общее количество клеток в поле зрения, а также количество клеток в поле зрения живых, мертвых, с аутофагосомами, фигурами митоза и признаками апоптоза. Полученные данные позволяют вычислить показатели LC50 и AC50, отражающие цитотоксическую и апоптотическую активности в нормальных и опухолевых клетках в экспериментах *in vitro*.

3. Анализ частоты развития апоптоза в опухолевых клетках человека (HeLa; SK-BR-3, MCF-7; Jurkat; A549; PC-3; HCT-116; A498, Caki) методом проточной цитофлуориметрии с окраской аннексином V и йодистым пропидием показал, что апоптоз развивается во всех изученных опухолевых культурах только под воздействием экстракта аврана, причем самые высокие показатели частоты развития апоптоза: $96,3 \pm 2,7\%$, $96,8 \pm 5,5\%$ и $89,5 \pm 3,3\%$ наблюдаются в культурах SK-BR-3, MCF-7 и A498, соответственно.

4. Морфологические изменения, развивающиеся в изученных опухолевых клетках человека *in vitro* под действием флавоноидсодержащего экстракта аврана, зависят от его концентрации. Установлена прямая корреляционная связь между концентрацией экстракта и количеством погибших клеток и обратная корреляционная связь между концентрацией экстракта и количеством клеток с аутофагосомами, а также между количеством клеток с аутофагосомами и количеством погибших клеток. Так, при концентрации от 0,09 мг/мл до 0,2 мг/мл происходит активация цитопротекторной аутофагии; от 0,2 мг/мл до 0,8 мг/мл – подавление цитопротекторной аутофагии; от 0,375 мг/мл до 1,5 мг/мл – гибель клеток через апоптоз, а начиная с концентрации 3 мг/мл – гибель клеток через некроз.

5. Активация апоптоза в перевитых опухолях под действием экстракта аврана происходит как митохондриальным (p53, Bax), так и сигнальным путем (Fas/APO-1 и Fas-ligand), а реализация его осуществляется через активацию каспазы-3.

6. Аутофагия, развивающаяся в опухолевых клетках, имеет цитопротекторный характер и завершается либо восстановлением структуры клетки, либо ее гибелью через апоптоз. Выявление признаков аутофагии в изученных культурах опухолевых клеток человека и в перевитых опухолях с помощью маркера LC3B (иммунофлуоресцентным и иммуногистохимическим методами) является морфологическим критерием развивающейся резистентности опухоли к воздействию экстракта аврана с противоопухолевым эффектом.

7. Вне зависимости от гистогенеза перевитой опухоли животных (рак печени PC-1, рак почки PA, саркома 45) при введении экстракта аврана в опухоли развивается патоморфоз 2-3 степени: снижается транскрипционная и пролиферативная активность (Ki67; EGFR), происходит остановка клеточного цикла и переход клеток в период G0 (Ki67), блокируется ангиогенез (VEGF) и активируется апоптоз (p53, Bax, CD95 (Fas/APO-

1), Fas-ligand), блокируется протекторная аутофагия (LC3B). Особенности патоморфоза в перевитой саркоме 45 является замещение опухолевой ткани фиброзной, а в раке почки РА – развитие гигантоклеточного патоморфоза.

8. В паренхиме внутренних органов лабораторных животных с перевитыми опухолями наблюдалось развитие дистрофических и некротических процессов, отека, кровоизлияний, выраженного полнокровия. После введения экстракта аврана отмечалось уменьшение морфологических признаков повреждения и нарушения кровообращения в органах, увеличение истинной массы тела животных в среднем на 15%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для объективной оценки развивающихся морфологических изменений в клетках опухолевых культур под действием растительных экстрактов, содержащих флавоноиды, рекомендуется использовать тест «живые и мертвые» при одновременной окраске йодистым пропидием и акридиновым оранжевым и применять наиболее информативные показатели: среднее количество клеток в поле зрения; долю клеток с аутофагосомами; активность роста – соотношение среднего количества клеток при воздействии к среднему количеству клеток в контроле. При использовании витальных красителей (Хехст и др.) следует учитывать такие показатели, как: среднее количество живых клеток в поле зрения; индекс пролиферации – соотношение среднего количества живых клеток в поле зрения при воздействии экстракта, к среднему количеству живых клеток в поле зрения в контроле; индекс апоптотической активности.

2. Предлагаем считать морфологическими признаками чувствительности клеток культуры опухоли к воздействию экстрактов следующие показатели: снижение среднего количества клеток или среднего количества живых клеток; активности роста или индекса пролиферации; отсутствие фигур митоза; повышение доли мертвых клеток, клеток с пикнозом ядра и ядром в виде серпа от общего количества живых клеток, доли клеток в апоптозе более 11%; отсутствие аутофагосом в клетках опухоли.

3. Для оценки эффективности лечебного патоморфоза в перевитых опухолях животных в эксперименте рекомендуется проводить оценку атрофических изменений (размеры клеток, ядра, количество клеток в поле зрения); пролиферативной активности (количество митозов, окраска на маркеры Ki67 и EGFR); количества РНК и ДНК (с помощью окраски по Браше); степени повреждения поверхностных мембран (окраска лектином зародышей пшеницы WGA и PAS-реакция); выраженности ангиогенеза (экспрессия маркера VEGF), аутофагии (экспрессия маркера LC3B) и апоптоза (p53, Bcl-2, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand).

4. Для оценки морфологических признаков резистентности опухолевых клеток к противоопухолевой терапии рекомендуется использовать иммуногистохимический маркер LC3B, позволяющий установить образование аутофагосом в опухолевых клетках, являющихся предиктором ее развития.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Основные результаты проведённого диссертационного исследования, помимо ответов на вопросы теоретической и практической медицины, открывают и широкие для научного поиска в указанных направлениях. В теоретическом аспекте, безусловно,

актуально проведение исследований, касающихся особенностей механизмов реализации апоптоза и аутофагии и их взаимосвязи, а также значение их генетической детерминированности в опухолевых клетках при действии на них флавоноидов. Несомненно, перспективным направлением является продолжение уточнения роли активации аутофагии в опухолевых клетках в процессе формирования их резистентности к лечению. В практическом аспекте – это поиск наиболее информативных и специфичных иммуногистохимических маркеров аутофагии для конкретных типов опухолей человека и в дальнейшем разработка на их основе критериев морфологической оценки эффективности противоопухолевой терапии или развития резистентности к ней у каждого конкретного пациента.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Navolokin N.A., Polukonova N.V., Kong X.M., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N.** Effect of flavonoids containing extract on the laboratory rats with liver tumors entwined pc-1 // The main conference: «Novel Drugs Based on Plant Substances». – St. Piterburg. – 2011. – P. 290–291.
2. **Наволокин Н.А.,** Андреева А., Рыкалина Е.Б., Байтман Т.П., Полуконова Н.В. К вопросу о механизмах противоопухолевого действия растительных экстрактов // Материалы II Международной научно–практической конференции «Современная медицина и фармацевтика: анализ и перспективы развития». – 2012. – С. 21–23.
3. **Наволокин Н.А.,** Быков А.В. Фармакогностический анализ, ресурсный потенциал аврана лекарственного и исследование его биологической активности // Материалы 73–й студенческой научно–практической конференции в рамках первой Всероссийской недели науки с международным участием, посвященной дню российской науки «Молодые ученые – здравоохранению». – Саратов. – 2012. – С.328–329.
4. **Наволокин Н.А.,** Павлова А.В. История применения препаратов с противоопухолевой активностью из растительного сырья // Материалы 73–й студенческой научно–практической конференции в рамках первой Всероссийской недели науки с международным участием, посвященной дню российской науки «Молодые ученые – здравоохранению». – Саратов. – 2012. – С.335.
5. **Наволокин Н.А.,** Павлова А.В. Морфологические изменения в мышцах у лабораторных крыс и определение токсичности при введении экстракта аврана // Бюллетень медицинских Интернет–конференций. – 2012. – Т.2, № 2. – С. 82–83.
6. **Navolokin N.A., Polukonova N.V., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N.** Morphofunctional changes in laboratory rats with transplanted liver cancer PC-1 after prolonged per-oral administration of flavonoid containing extracts // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2012. – Вып. 1. – С. 277–278.
7. **Наволокин Н.А.,** Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Биологические эффекты и патоморфоз перевитого рака печени РС-I у лабораторных крыс при многократном пероральном введении экстракта аврана лекарственного (*gratiola officinalis*) // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине – 2012 Материалы Всероссийской молодежной конференции, – Саратов: Изд-во Сарат. Ун-та, 2012. – С. 33–36.
8. **Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G. N., Bucharskaya A.B., Durnova N. A.** // Russian Open Medical Journal. – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 0203.
9. **Наволокин Н.А.,** Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Тырнов В.С. Морфологические изменения в органах и опухоли крыс с перевитым раком печени pc-1 при пероральном введении экстракта пурпурной кукурузы (*zeamays*) //

Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Том 11, №2. – С.37.

10. **Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Бибикова О.А.** Цитотоксическая активность in vitro экстракта аврана на культуре клеток почек эмбрионов свиньи, зараженных онковирусом // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 375–375.

11. **Наволокин Н.А., Байтман Т.П.** Влияние экстракта аврана лекарственного на лабораторных животных с перевитой саркомой S-45 // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 374–374.

12. **Наволокин Н.А., Скворцова В.В.** Патоморфоз саркомы S45 при внутримышечном введении флавоноидсодержащего экстракта лабораторным крысам // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 258–258.

13. **Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Маслякова Г. Н., Бучарская А. Б., Дурнова Н. А.** Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени Рс-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea Mays* L.) // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – Т. 9, № 2. – С. 213–220.

14. **Наволокин Н.А., Смирнова А.А., Полуконова Н.В., Тырнов В.С.** Фармакогностическое и фармакологическое исследование сырья кукурузы, содержащей биофлавоноиды, и перспективы использования лекарственных средств на его основе // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: материалы I Международной научной конференции (21–22 мая 2013 г., г. Новосибирск). — Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013. – С. 408–411.

15. **Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Скворцова В.В., Байтман Т.П., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А.** Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 59–59.

16. **Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г.** Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) // Химия растительного сырья. – 2013. – №4. – С. 165–173.

17. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Корчаков Н.В., Тычина С.А.** Динамика роста перевиваемого рака почки у лабораторных крыс при длительном введении экстракта аврана лекарственного // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2014. – № 2. – С.213–214.

18. **Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Бибикова О.А., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.** Цитоморфологические изменения клеток почки эмбриона свиньи в культуре (SPEV-2) при воздействии экстракта аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) // Фундаментальные исследования. – 2014. – №10, ч. 7. – С. 1369–1374.

19. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б.** Патоморфоз перевитого рака почки у лабораторных крыс при внутримышечном введении экстракта аврана лекарственного // Евразийский онкологический журнал. – 2014. – 3 (03). – С.109.

20. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б.** Лейкоцитарная формула крови у лабораторных крыс с перевитым раком почки при разных методах введения флавоноидсодержащих экстрактов // «Использование молекулярно-генетических методов для изучения экосистем и защиты здоровья человека» Материалы VII научно-практической школы для молодых учёных, аспирантов и студентов по проблемам молекулярной экологии и эволюции г. Борок, 16 – 26 октября 2014 г. – Борок. – 2014. – С. 109–113.

21. **Наволокин Н.А., Байтман Т.П., Полуконова Н.В.** Динамика роста перевиваемой саркомы и изменение состояния лабораторных животных под действием экстракта аврана лекарственного // «Использование молекулярно–генетических методов для изучения экосистем и защиты здоровья человека» МАТЕРИАЛЫ VII научно–практической школы для молодых учёных, аспирантов и студентов по проблемам молекулярной экологии и эволюции г. Борок, 16 – 26 октября 2014 г. – Борок. – 2014. – С.130–134.
22. **Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.** Динамика цитоморфологических изменений в культуре клеток почки эмбриона свиньи под действием флавоноидсодержащего экстракта // «Использование молекулярно–генетических методов для изучения экосистем и защиты здоровья человека» МАТЕРИАЛЫ VII научно–практической школы для молодых учёных, аспирантов и студентов по проблемам молекулярной экологии и эволюции г. Борок, 16 – 26 октября 2014 г.. – Борок. – 2014. – С. 140–145.
23. **Navolokin N.A., Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A., Maslyakova G.N.** A new extraction method of bioflavonoids from poisonous plant (*Gratiola Officinalis* L.) // *Russian Open Medical Journal*. – 2014. – Vol. 3, № 3. – P. 304.
24. **Navolokin N.A., Polukonova N.V., Pravdin A.B., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Tkachenko N.V., Terentyuk G.S.** The morphological and functional changes in cytoplasmic membranes of rat erythrocytes and SPEV–2 cells under the influence of *Gratiola officinalis* extract // *International Workshop Structure and Functions of Biomembranes*. 29.09.2014–03.10.2014: Book of Abstracts. – Dolgoprudny: MIPT, 2014. – P.86–87.
25. **Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Воронков М.О., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.** Сравнение противоопухолевой активности экстракта аврана лекарственного и входящего в его состав кверцетина при интротуморальном введении // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2015. – Т.14, №1. – С. 111.
26. **Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Барышникова М.А., Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Рябая О.О., Маслякова Г.Н., Барышников А.Ю.** Исследование противоопухолевой активности флавоноидсодержащих растительных экстрактов *in vitro* // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2015. – Т.14, №1. – С.122.
27. **Tkachenko N. ; Pravdin A.; Terentyuk G.; Navolokin N.; Kurchatova M.; Polukonova N..** Inhibiton of photodynamic haemolysis by *Gratiola officinalis* L. Extract // *SPIE Proceedings*. -2015. - Vol. 9448. P.94480
28. **Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Полуконова А.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.** Культура клеток почки эмбриона свиньи, инфицированных онковирусом (SPEV–2) как модельный объект для исследования цитотоксического действия противоопухолевых средств на примере экстракта аврана (*Gratiola officinalis* L.) // *Бюллетень медицинских Интернет*. – 2015. – Т. 5, № 6. – С. 924–926.
29. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В.** Изменение костного мозга и крови лабораторных крыс с перевитой саркомой 45 при пероральном введении экстракта аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis*) // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. – 2015. – № 2. – С. 317.
30. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Матвеева О.В., Тычина С.А., Бучарская А.Б., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н.** Влияние растительных экстрактов, содержащих флавоноиды, на лейкоцитарную формулу и красный костный мозг лабораторных крыс с перевитой саркомой 45 // *Успехи современного естествознания*. – 2015. – №4. – С. 134–140.
31. **Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Курчатова М.Н., Райкова С.В., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А., Маслякова Г.Н., Тырнов В.С.** Биологическая активность экстракта сырья антоциановой формы кукурузы обыкновенной и перспективы его использования для

разработки новых лекарственных препаратов // Материалы четвертой Международной научно–практической интернет–конференции Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям. – Полтава. – 2015. – С. 249–251.

32. **Гринёв В.С., Широков А.А., Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Курчатова М.Н., Дурнова Н.А., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.** Полифенольные соединения новой биологически активной композиции из цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum Arenarium* (L.) Moench.) // Химия растительного сырья. – 2015. – №2. – С. 177–185.

33. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В.** Изменения лейкоцитарной формулы, красного костного мозга и опухоли лабораторных крыс с перевитой саркомой–45 при введении экстрактов аврана лекарственного, бессмертника песчаного, кукурузы антациановой // Саратовский научно–медицинский журнал. – 2015. –Т.11, № 3. – С. 328–332.

34. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Тычина С.А., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.** Оценка противоопухолевой и антикахексической активности экстракта аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) у крыс с перевитой саркомой // Сибирский онкологический журнал. – 2016. –Т.15, № 1. – С. 37–43.

35. **Navolokin N.A., Polukonova N.V., Bucharskaya A.V., Bibikova O.A., Maslyakova G.N.** Culture of Pig Embryo Kidney Cells (SPEV–2) as a Model for Studying the Cytotoxic Effects of Antitumor Agents on the Example of *Gratiola officinalis* // Poster Abstracts: In Vitro to In Vivo Extrapolation for High Throughput Prioritization and Decision Making Workshop, February. – 2016. – P.9.

36. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Полуконова Н.В., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б.** Антикахексическая и противоопухолевая активности флавоноидсодержащего экстракта Аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) на крысах с перевитой саркомой 45 // Бюллетень медицинских Интернет–конференций. – 2016. –Т.6, № 2. – С. 291–295.

37. **Tkachenko N.V., Bykova E.V., Pravdin A. B, Navolokin N.A, Polukonova N.V., Bucharskaya A.V., Mudrak D. A., Prilepskii A. Y.** Comparison of membrane–protective activity of antioxidants quercetine and *Gratiola Officinalis* L. extract under conditions of photodynamic haemolysis // Proc. SPIE. – 2016. – V.9917. – P. 99170L.

38. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В.** Антикахексическая и противоопухолевая активность экстракта бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.)) в эксперименте in vivo // Сборник тезисов I Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – Москва. – 2016. – С. 230–231.

39. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Тычина С.А., Байтман Т. П., Корчаков Н. В., Воронков М. О., Бучарская А. Б., Маслякова Г. Н.** Сравнение противоопухолевой и антикахексической активности флавоноидсодержащих экстрактов в эксперименте на животных с перевитой саркомой // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т.15, № 1. – С.72–73.

40. **Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Мудрак Д.А., Прилепский А.И., Широков А.А., Бучарская А. Б., Маслякова Г. Н.** Исследование цитотоксической активности экстракта аврана лекарственного и кверцетина на клеточной культуре рака шейки матки // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т.15, № 1. – С.88–89.

41. **Grinev V.S., Shirokov A.A., Navolokin N.A., Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Durnova N.A., Bucharskaya A.B., Masliakova G.N.** Polyphenolic Compounds of a New Biologically Active Extract from Immortelle Sandy Flowers (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) // **Russian Journal of Bioorganic Chemistry.** – 2016. – Vol. 42, N. 7. – P. 86–92.

42. **Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б., Тычина С.А.,**

Корчаков Н.В., Маслякова Г.Н. Патоморфоз перевитого рака почки (РА) у лабораторных крыс при введении флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 6. – С. 19–23.

43. Navolokin N.A., Mudrak D.A., Bucharskaya A.B., Matveeva O.V., Tychina S.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N. Effect of flavonoid-containing extracts on the growth of transplanted sarcoma 45, peripheral blood and bone marrow condition after oral and intramuscular administration in rats // **Russian Open Medical Journal**. – 2017. – Vol. 6, № 3. – P. 304.

44. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Влияние экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) на экспрессию маркера пролиферации ki67 и маркера апоптоза p53 в перевиваемом раке почки (РА) лабораторных крыс // **Злокачественные опухоли**. – 2017. – Т.7, № 3. – С. 133–134.

45. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А. Сравнение эффективности перорального и внутримышечного пути введения экстракта аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) на лабораторных крысах с перевитым раком печени рс-1 // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно-технологического развития страны». – 2017. – С.218–219.

46. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Ивлиев А. В., Афанасьева Г. А., Полуконова Н. В., Тычина С. А., Бучарская А. Б., Маслякова Г. Н. Влияние флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) на интенсивность процессов перекисного окисления и содержание витамина Е у крыс с перевитым раком печени РС-1 // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2017. – Т.80, №10. – С. 40 – 43.

47. Navolokin, N.A., Polukonova, A.V., Plastun, I.L., Mudrak, D.A., Bokarev, A.N., Afanasyeva, G.A., Bucharskaya, A.B., Maslyakova, G.N., Polukonova, N.V. Reduction of intoxication in the rats with transplanted tumors under the influence of *Gratiola officinalis* L. extract // **Proc. SPIE**. - 2018. - V. 10716. - P.107160U

48. Наволокин Н.А., Маслякова Г.Н., Полуконова Н.В., Мудрак Д.А., Бучарская А.Б., Тычина С.А., Корчаков Н.В. Морфологические изменения перевитого рака почки у крыс при введении флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного // **Бюллетень медицинских Интернет-конференций**. - 2017.- Том 7, № 2.- С. 577–580.

49. Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Mudrak D.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N. Morphological changes of the transplanted kidney tumors after administration of flavonoid-containing extract *gratiola officinalis* // Сборнике The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research Proceedings of the International Symposium. 2018.- С. -71-73.

50. Polukonova N.V., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Mudrak D.A., Baryshnikova M.A., Stepanova E.V., Solomko E.S., Polukonova A.V., Maslyakova G.N. The apoptotic activity of flavonoid-containing *Gratiola officinalis* extract in cell cultures of human kidney cancer // **Russian Open Medical Journal**.- 2018. -V.7. - P. e0402.

51. Мудрак Д. А., Наволокин Н. А., Бучарская А. Б. Экспрессия маркера пролиферации ki67 и апоптоза p53 в перевиваемой саркоме лабораторных крыс при введении экстракта аврана (*gratiola officinalis*) // **Трансляционная медицина**. - 2018. - Т.5. №3. – С.413.

52. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Влияние экстракта аврана (*Gratiola officinalis* L.) на экспрессию маркера пролиферации Ki67 и апоптоза p53 в перевиваемой саркоме лабораторных крыс // **Евразийский онкологический журнал**. - 2018. – Т. 6, № 1. - С. 92-93.

53. **Наволокин Н.А., Мудрак Д. А., Полуконова Н. В., Мыльников А.С., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н.** Экспрессия маркеров апоптоза и аутофагии в перевиваемом раке почки (РА) под действием флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // **Злокачественные опухоли. -2018. – Т. 8. - №. 3S1- С. 125-126**
54. **Navolokin N.A., Mudrak D.A., Polukonova N.V., Polukonova A.V., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N.** Changes of apoptosis and autophagy markers (membrane and nuclear) in cells of kidney cancer under the influence of *Gratiola officinalis* extract *IN VIVO* // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* - 2018. - P.98.
55. **Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Мудрак Д.А., Мыльников А.М., Барышникова М.А., Хоченков Д.А., Бучарская А.Б., Полуконова А.В., Маслякова Г.Н.** Преимущества и возможности флуоресцентных методов для визуализации апоптоза и аутофагии в опухолевых клетках человека *in vitro* // **Оптика и спектроскопия. - 2019.- Т. 126. - С. 773-782.**
56. **Наволокин Н.А., Маслякова Г.Н., Полуконова Н.В., Мудрак Д.А., Бучарская А.Б.** Экспрессия маркеров апоптоза и аутофагии в перевитом раке почки у крыс при введении флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*GRATIOLA OFFICINALIS* L.) // **Архив патологии. - 2019. – Т.81. - №1.-С. 24-30.**
57. **Наволокин Н.А., Маслякова Г.Н., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Воронина Е.С., Бучарская А.Б.** Экспрессия маркеров апоптоза и аутофагии в перевитой саркоме- 45 у крыс при введении флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*gratiola officinalis* L.) // **Экспериментальная и клиническая морфология. - 2019. - Т29. - №1. - С. 56-62.**
58. **Демин А.Г., Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Полуконова Н.В.** In silico оценка уровня экспрессии генов, ассоциированных с путями клеточной гибели в клетках карциномы почки человека (линия a498) // В книге: VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы Сборник тезисов Международного Конгресса. - 2019. С. 798.

Глава в монографии

In *Advanced Nanomaterials, Nanotechnology and Biosensors*, System Editor(s): Dimitrios P. Nikolelis, Georgia-Paraskevi Nikoleli, // Chapter 6 - Encapsulated Magnetite Nanoparticles: Preparation and Application as Multifunctional Tool for Drug Delivery Systems / О.А. Inozemtseva, S. V. German, **N.A. Navolokin**, A.B. Bucharskaya, G.N. Maslyakova, D.A. Gorin, Elsevier, 2018, p.175-192,

Патенты

1. Патент № 2482863 Российская Федерация, МПК А61К36/80, В01D11/02. Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью / Полуконова Н.В., **Наволокин Н.А.**, Дурнова Н.А., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б.; Полуконова Н.В., Наволокин Н.А. – № 2012105384/15; заявл. 15.02.2012; опубл. 27.05.2013, Бюл. № 15. – 11 с.: ил.
2. Патент № 2519769 Российской Федерации, МПК Средство, обладающее противоопухолевым и иммуномодулирующим действием / Полуконова Н.В., **Наволокин Н.А.**, Дурнова Н.А., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б.; Полуконова Н.В., **Наволокин Н.А.** – № 2013112710; заявл. 21.03.2013; опубл. 20.03.2014, Бюл. № 17. – с. ил. Решение о выдаче патента 08.04.2014
3. Патент №2578440, Российская Федерация, МПК Средство для лечения опухолевой кахексии / **Наволокин Н.А.**, Полуконова Н.В., Тычина С.А., Мудрак Д.А., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Корчаков Н.В. – № 2015113543; заявл. 13.04.2015., опубл. 27.03.2016, Бюл. № 9. –11 с.:ил. Решение о выдаче патента 25.02.2016

4. Патент РФ № 2601406, Российская Федерация МПК «Антикахексическое, противоопухолевое средство, снижающее уровень эндогенной интоксикации» / **Наволокин Н.А., и др.** - №2015149423; заявл. 17.11.2015, опубл., 10.11.2016; Бюл. № 31 - 14 с. ил. **Решение о выдаче патента 24.08.2016**
5. Патент № 2694547 РФ, «Средство, обладающее избирательным действием на опухолевые клетки, активирующее их апоптоз и препятствующее формированию их резистентности» Полуконова Н.В., **Наволокин Н.А.**, Мудрак Д. А., Полуконова А.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н., Заявка № 2018105419, положительное решение о выдаче патента от 15.02.2019, приоритет от. 13.02.18 Оpubл. 16.07.2019 Бюл. № 20, с. 25
6. Патент №2693829 РФ, положительное решение о выдаче патента от 25.04.2019, «Способ определения минимальной эффективной концентрации противоопухолевого лекарственного средства, ингибирующего цитопротекторную аутофагию», Полуконова Н.В., **Наволокин Н.А.**, Мудрак Д. А., Полуконова А.В., Маслякова Г.Н., Заявка № 2018105465, приоритет от. 13.02.18 г.
7. **Заявка на изобретение РФ №2018115319**, «Средство, вызывающее атрофию саркомы и замещение опухолевой ткани соединительной в экспериментах in vivo», Маслякова Г.Н., Полуконова Н.В., **Наволокин Н.А.**, Мудрак Д.А., Полуконова А.В., Бучарская А.Б., приоритет от 25.04.2018, дата публикации заявки: 25.10.2019, Бюл. № 30.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AC50 – концентрация, при которой 50% клеток находятся в апоптозе
LC50 – концентрация, при которой погибает 50% клеток
НК – натуральные киллеры
АФК – активная форма кислорода
БАВ – биологически активные вещества
ВЗУ – кукуруза, выросшая в засушливых условиях
ВОУ – кукуруза, выросшая при обычных условиях увлажнения
ИТРО – индекс торможения роста опухоли
ИФН – интерферон
ЛР – лекарственные растения
ОП – олигомерные проантоцианидины
П.Н.О. – пара олигонуклеотидов
ПКГ – программированная клеточная гибель
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СКЖК – среднее количество живых клеток
СКК – среднее количество клеток в поле зрения
ФНО-α – фактора некроза опухоли альфа
ШАА – Шаперон-ассоциированная аутофагия
ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс