

УДК 576.535:576.385:576.31:612.086:547.972:582.951.6

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПОЧКИ ЭМБРИОНА СВИНЬИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*GRATIOLA OFFICINALIS L.*)

¹Наволокин Н.А., ²Полуконова А.В., ²Бибикова О.А., ¹Полуконова Н.В.,
¹Маслякова Г.Н., ¹Бучарская А.Б.

¹ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, e-mail: navolokin1@rambler.ru;

²Национальный исследовательский Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

Исследована активность раствора сухого экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis L.*) на клетках почки эмбриона свиньи в культуре SPEV-2 с использованием йодистого пропидия (PI). Из исследованных нами концентраций цитостатическим действием на клетки SPEV-2 обладали 32 и 320 мкг/мл, а цитотоксическим – 3,2 и 32 мг/мл. В течение суток экстракт вызывал апоптоз в клетках при концентрациях 32 и 320 мкг/мл. Наложение фотоснимков при разных микроскопических режимах регистрации светорассеяния и флюоресценции позволило нам описать цитоморфологические показатели, маркирующие процесс гибели клеток под действием экстракта, индуцирующего ДНК-повреждения в клетках в условиях *in vitro*: появление темных образований в цитоплазме, нечетких контуров самих клеток и приобретение ими звездчатой формы или сохранение округлой, но с фрагментацией клеточной мембраны и вытеканием содержимого; образование конгломератов погибшими клетками. Снижение интенсивности свечения йодистого пропидия свидетельствует о распаде ДНК ядра. Индекс количества мертвых клеток (КМК) может служить индексом цитотоксичности.

Ключевые слова: экстракт аврана лекарственного, *Gratiola officinalis L.*, флавоноиды, пропидий йодистый, *in vitro*, клетки почек эмбрионов свиньи (SPEV-2), апоптоз

CYTOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE CULTURE OF KIDNEY CELLS PIG EMBRYO (SPEV-2) EXPOSED TO EXTRACT *GRATIOLA OFFICINALIS L.*

¹Navolokin N.A., ²Polukonova A.V., ²Bibikova O.A., ¹Polukonova N.V.,
¹Maslyakova G.N., ¹Bucharskaya A.B.

¹Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: navolokin1@rambler.ru;

²Saratov State University, Saratov

Active dry extract solution *Gratiola officinalis L.* investigated on pigs embryo kidney cells in culture SPEV-2 using propidium iodide (PI). Concentration of 32 and 320 ug/ml had a cytostatic effect on cells SPEV-2. Concentrations of 3,2 and 32 mg/ml had a cytotoxic effect. During the day the extract induced apoptosis in cells at concentrations of 32 and 320 ug/ml. Overlaying still images allowed us to describe in different microscopic scattering and fluorescence registration, cytomorphological parameters under the influence of the extract, marking process of cell death. These indicators reflect the DNA damage in cells under conditions *in vitro*. We described the following indicators: the appearance of dark structures in the cytoplasm, indistinct outlines of the cells themselves and their acquisition of star-shaped or rounded preservation, but the fragmentation of the cell membrane and spillage; formation of conglomerates dead cells. Reducing the emission intensity of propidium iodide indicates the decay of the nucleus DNA. Index numbers of dead cells (CMC) can be used an index of cytotoxicity.

Keywords: extract, *Gratiola officinalis L.*, flavonoids, propidium iodide, *in vitro*, pigs embryo kidney cells, apoptosis

Культура клеток почки эмбриона свиньи несет онковирусы «а» и «с» (SPEV-2), поэтому данную клеточную культуру можно использовать как модель опухолевых клеток млекопитающих *in vitro* [2] для определения цитотоксического и цитостатического эффектов противоопухолевых лекарственных средств [3, 7].

Применение противоопухолевых средств на основе растительного сырья позволяет добиться более выраженного терапевтического эффекта с минимальным токсическим воздействием [6, 11]. Ранее нами [1, 4, 5, 11] на лабораторных животных с переносимыми

опухолями было показано, что водный раствор сухого экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis L.*), наряду со слабой токсичностью, обладает антиоксидантными, противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами. Детальные исследования экстракта аврана в экспериментах *in vitro* на клеточных культурах ранее не проводились.

Цель работы – выявить динамику цитоморфологических изменений в культуре клеток почки эмбриона свиньи, зараженных онковирусами «а» и «с» (SPEV-2), при действии разных концентраций экстракта аврана (*Gratiola officinalis L.*).

Материалы и методы исследования

Использован флавоноидсодержащий экстракт сырья аврана лекарственного. Упаренный экстракт, полученный определенным способом [8, 9, 12], желто-коричневого цвета, смешивается с водой и этиловым спиртом в любых соотношениях. Среднее значение кверцетина, определенное по градуировочному графику со стандартным образцом кверцетина (Sigma, 98%), составляет 0,66%; количество кверцетина в сухом остатке экстрактивных веществ (на 10 г сухого сырья) – 350 мкг [9, 12]. Подлинность экстракта подтверждается качественными реакциями с кристаллическим магнием и реактивом Вагнера – Бушарда, результаты которых свидетельствуют о наличии флавоноидов и отсутствии алкалоидов [9].

Объектом послужила культура клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV-2) из криобанка коллекции клеточных культур лаборатории вирусологии научно-исследовательской ветеринарной станции РАСХН (г. Саратов). Культивирование проводили в среде RPMI 4 (10% эмбриональной сыворотки, гентамицин, ампициллин, амфотерицин) в 6 луночных планшетах (одной контрольной лунки и пяти экспериментальных). Контролем служили клетки в среде без экстракта, выросшие в течение суток. В пять лунок вносили раствор экстракта, разведенный в питательной среде с понижением концентрации в каждой лунке в 10 раз: 3,2; 32; 320; 3,2 и 32 мг/мл. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 часов. В качестве красителя использовали йодистый пропилен, проникающий в клетки за счет разрушения их мембраны и связывающийся с ядерной ДНК [10]. Для визуализации клеток использовали комбинирование нескольких микроскопических режимов регистрации светорассеяния и флуоресценции на микроскопе Leica DM 2500, цифровую видеокамеру Leica DFC 420C с программным обеспечением Leica Application Suite V 3.1.

Для анализа клеток в контрольной и экспериментальной культурах использованы следующие

усредненные показатели (10 полей зрения): общее количество клеток (живых и мертвых) в поле зрения (ОКК), свидетельствующее о пролиферативной активности; количество мертвых клеток в поле зрения, окрашенных пропиленом в оранжевый цвет (КМК), и отношение числа мертвых клеток к общему количеству клеток в поле зрения, умноженное на 100% (индекс КМК), отражающее цитотоксическое действие. Отмечали также цитоморфологические признаки при микроскопии в фазовом контрасте: форма клеток, возникновение характерной внутриклеточной грануляции, состояние клеточной мембраны и др. Появление характерной внутриклеточной грануляции рассматривали, как свидетельство развития некробиотических процессов в клетке, отделения их от подложки и последующей гибели [10]. Распад ядерной ДНК на фрагменты неодинаковой величины (при флуоресцентном режиме) расценивали как признаки апоптоза.

Статистическую обработку результатов проводили в программе «SPSS 13.0», значимость различий при параметрическом распределении определяли при помощи Т-Критерия Стьюдента для независимых выборок.

Результаты исследования и их обсуждение

В контроле (табл. 1, рис. 1, а, б) клетки лежали ровным монослоем, плотно прилегали друг к другу, только единичные клетки не были прикреплены к подложке. Клетки призматической, полигональной, треугольной и округлой формы, встречались единичные клетки по типу синцития или симпласта; с гомогенной цитоплазмой и четко оформленным ядром. Количество клеток в поле зрения (ОКК) – $562,66 \pm 16,02$. Присутствовали отдельные мертвые клетки (КМК) в количестве $8,33 \pm 0,44$.

Таблица 1

Число клеток в культуре SPEV-2 при воздействии концентраций экстракта аврана

Показатель	Контроль	Концентрации раствора экстракта аврана				
		3,2 мкг/мл	32 мкг/мл	320 мкг/мл	3,2 мг/мл	32 мг/мл
КМК	$8,33 \pm 0,44$	$6,16 \pm 0,53$	$9,5 \pm 0,75^{***}$	$17 \pm 0,42$	$300,66 \pm 17,34^{***}$	$316,2 \pm 3,58^{***}$
ОКК	$562,66 \pm 16,02$	$446,5 \pm 12,32^*$	$392,5 \pm 23,16^{***}$	$427 \pm 20,28^{***}$	$301,33 \pm 18,05^{***}$	$316,2 \pm 3,58$
Индекс КМК	$1,47 \pm 0,06$	$1,39 \pm 0,14^{**}$	$3,13 \pm 0,29^{***}$	$4,03 \pm 0,13^{**}$	$100 \pm 0^{***}$	$100 \pm 0^{***}$

Примечание. Различия достоверно отличаются при сравнении значений опытной и контрольной групп при * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

При концентрации раствора экстракта 3,2 мкг/мл клетки преимущественно полигональной, треугольной и округлой формы, незначительно увеличивалось число клеток, не прикрепленных к подложке. Изменений со стороны цитоплазмы и ядра не отмечалось. ОКК достоверно уменьшено на 20% ($446,5 \pm 12,32$) контроля, что свидетельствовало о торможении пролиферативной активности клеток под действием экстракта. Вместе с тем достоверных отличий

с контролем по КМК не выявлено (табл. 1, рис. 1, в, г). Интенсивность свечения ядер мертвых клеток такая же, как и в контроле. Следует отметить, что изменение окраски среды и самих клеток происходило за счет раствора экстракта.

Наложение фотоснимков, полученных при разных микроскопических режимах регистрации светорассеяния и флуоресценции, позволило нам сравнивать цитоморфологические показатели живых и мертвых

клеток. Мертвые клетки с разрушенной мембраной, ДНК которых окрашивалась пропидием, в отличие от живых клеток, были откреплены от подложки. Других цитоморфологических отличий не было выявлено.

При концентрации 32 мкг/мл – отмечалось появление выраженной внутриклеточной грануляции, резкое преобладание клеток округлой формы, преимущественно с неровными контурами мембраны. Клетки лежали менее организованно и в основном не были прикреплены к подложке. Редко встречались единичные гигантские клетки. ОКК достоверно ниже контроля на 30% ($392,5 \pm 23,16$), что свидетельствовало о значительном снижении их пролиферативной активности под действием экстракта. КМК на 14% ($9,5 \pm 0,75$) больше контроля (табл. 1). Интенсивность свечения ядерной ДНК погибших клеток так же, как и при предыдущей концентрации (рис. 1, д), что свидетельствовало о гибели этих единичных клеток в течение суток после добавления экстракта. Кроме того, были обнаружены единичные апоптозные тельца. Интенсивность окрашивания среды и клеток возрастала с возрастанием концентрации раствора экстракта (рис. 1, ж). В результате при данной концентрации наблюдали снижение пролиферативной активности, появление грануляции цитоплазмы, что сопровождалось откреплением клетки от подложки и гибель клетки путем апоптоза.

При концентрации 320 мкг/мл также отмечалось появление внутриклеточной грануляции, снижение плотности и организованности клеток, увеличение их разрозненности. Все клетки были откреплены от подложки и имели округлую форму. Единичные клетки были с фрагментированными ядрами, что служило неспецифическим признаком начала их гибели. ОКК на 24% ($427 \pm 20,28$) меньше контроля (табл. 1, рис. 1, з, е), что свидетельствовало о снижении их пролиферативной активности. КМК, наоборот, достоверно увеличивалось в 2 раза ($17 \pm 0,42$) (табл. 1), что связано с цитотоксическим эффектом экстракта. Интенсивность свечения ядерной ДНК погибших клеток выражена. Присутствовали апоптозные тельца. В результате при данной концентрации сохранялась выявленная ранее тенденция: разрушение мембраны отдельных открепленных клеток с проникновением красителя в ядро и связыванием с ДНК, гибель клетки путем апоптоза.

С увеличением концентрации в 10 раз при линейной зависимости должно было наблюдаться уменьшение числа выросших клеток в несколько раз, однако в эксперименте этого не происходило. Наоборот, при

большей концентрации – 320 мкг/мл число выросших клеток было выше, чем при концентрации 32 мкг/мл (табл. 1). Следовательно, степень пролиферации и концентрации экстракта не имеют линейной зависимости.

При концентрации 3,2 мг/мл отмечали резко выраженную внутриклеточную грануляцию в виде темных образований в цитоплазме. Клетки звездчатой формы или округлые, но с фрагментацией мембраны и вытеканием содержимого; погибшие клетки образовывали конгломераты; появлялись клетки по типу «теней». ОКК на 46,4% ($301,33 \pm 18,05$) достоверно меньше контроля (табл. 1, рис. 1, к, л), что свидетельствовало о выраженном снижении пролиферативной активности. КМК достоверно больше контроля, в 36,5 раз ($300,66 \pm 18,05$) (табл. 1) и значимо отличалось по сравнению с предыдущей концентрацией раствора экстракта. Кроме того, КМК практически идентично ОКК. Интенсивность свечения погибших клеток более выражена, чем в контроле, что свидетельствовало об их гибели непосредственно в ходе эксперимента в течение суток. Апоптозных телец не выявлено, по-видимому, в течение первых суток экстракт в высокой концентрации не способствует включению механизмов апоптоза в клетке, а приводит к массовой их гибели за счет прямого цитотоксического действия.

При концентрации 32 мг/мл отмечали изменение характера внутриклеточных грануляций: количество гранул в цитоплазме и их размеры увеличивались. Ядра клеток не дифференцировались; клетки приобретали звездчатую и реже сохраняли округлую форму (рис. 6). КМК – $316,2 \pm 3,58$ (табл. 1) совпадало с ОКК, что свидетельствовало о 100% их гибели. По сравнению с контролем КМК достоверно увеличилось в 38 раз. Часть клеток находилась в состоянии набухания, по-видимому, за счет поступления раствора экстракта через разрушенную мембрану, в других была выражена фрагментация клеточной мембраны с вытеканием содержимого. Конгломерация погибших клеток более выражена, за счет увеличения их количества в конгломератах по сравнению с предыдущей концентрацией (рис. 6). ОКК достоверно меньше контроля на 43% ($316,2 \pm 3,58$) (табл. 1, рис. 1, м, н). Интенсивность свечения погибших клеток была намного ниже, чем при предыдущей концентрации, что может быть объяснено более плотной средой с высокой концентрацией экстракта. В целом же сохранялась тенденция, выявленная уже при концентрации 3,2 мг/мл: массовая гибель клеток путем некроза, без признаков апоптоза.

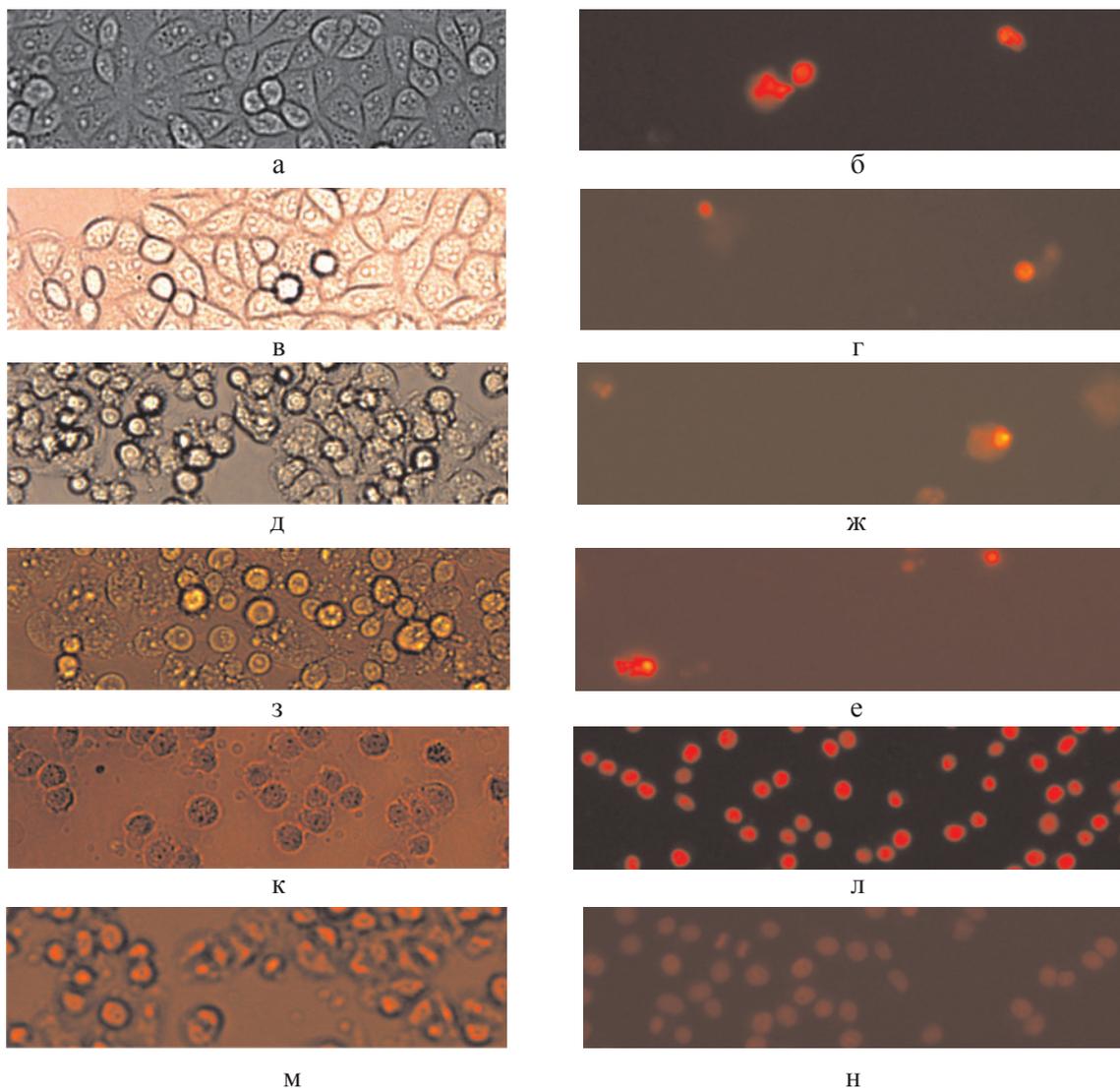


Рис. 1. Форма и характер расположения клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV-2) в контроле (а) и в культуре с добавлением раствора экстракта аврана при разных концентрациях: б – 3,2 мкг/мл; в – 32 мкг/мл; г – 320 мкг/мл; д – 3,2 мг/мл; е – 32 мг/мл

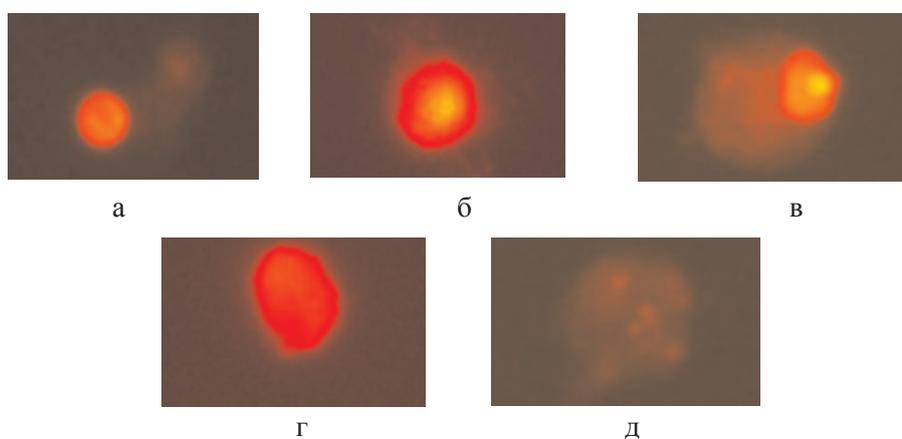


Рис. 2. Стадии повреждения ДНК ядра в зависимости от степени повреждения клетки, связывания красителя с ДНК ядра и времени от начала гибели пропидий-положительной клетки, полученные при флуоресцентной микроскопии: а – при концентрации 3,2 мкг/мл; б – 32 мкг/мл; в – 320 мкг/мл; г – 3,2 мг/мл; д – 32 мг/мл

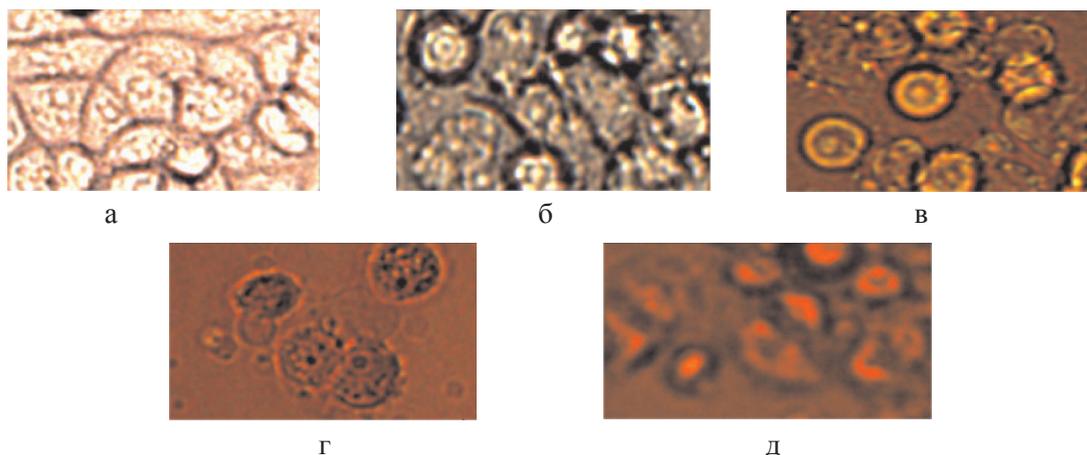


Рис. 3. Стадии повреждения ДНК ядра в зависимости от степени повреждения клетки, связывания красителя с ДНК ядра и времени от начала гибели клеток, фотография получена при световой микроскопии:
 а – при концентрации 3,2 мкг/мл; б – 32 мкг/мл; в – 320 мкг/мл; г – 3,2 мг/мл; д – 32 мг/мл

Заключение

Анализ цитоморфологических изменений в культуре клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV-2), зараженных онковирусом, проведенный нами параллельно с определением количества погибших клеток, позволил выявить особенности взаимодействия композиции биологически активных веществ экстракта аврана при разных концентрациях и определить влияние этих концентраций на морфофизиологические параметры клеток.

Все исследованные нами концентрации экстракта аврана оказывали цитостатическое действие, подавляя пролиферативную активность клеток. При этом линейной зависимости уменьшения ОКК от увеличения концентрации не установлено. Минимальной концентрацией раствора сухого экстракта, достоверно оказывающей цитотоксическое действие на клетки SPEV-2 в культуре, является 32 мкг/мл; а максимальной цитотоксичностью обладает раствор экстракта в концентрации 3,2 мг/мл.

Установлено, что апоптотической активностью обладали такие концентрации, как 32 и 320 мкг/мл. В то время как высокие концентрации (3,2 и 32 мг/мл) вызывали некроз клеток. При сравнительно невысоких концентрациях (32 и 320 мкг/мл) выявлена следующая последовательность событий: клетки открепляются от подложки, происходит грануляция их содержимого (рис. 2), что, согласно Фрешни [10], свидетельствует об ухудшении их состояния в целом. Затем в отдельных клетках происходит включение механизмов апоптоза.

Особенностью погибших в результате некроза клеток при микроскопии в фазовом контрасте служит появление темных образований в цитоплазме, нечеткие контуры самих клеток и приобретение ими звездчатой формы или сохранение округлой, но с фрагментацией клеточной мембраны и вытеканием содержимого. При высоких концентрациях экстракта погибшие клетки образуют конгломераты, происходит набухание клеток. Снижение интенсивности свечения йодистого пропидия свидетельствует о распаде ДНК ядра (рис. 2, 3). Индекс КМК можно рассматривать в качестве показателя цитотоксичности.

Благодарности. Работа выполнена с привлечением оборудования центра коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику ИБФРМ РАН, доктору биологических наук Богатыреву В.А., за методическую помощь в проведении микроскопических исследований.

Список литературы

1. Байтман Т.П., Наволокин Н.А. // Бюллетень медицинских интернет-конференций. –2013. –Т. 3. № 2. – С. 374.
2. Бибикина О.А., Староверов С.А., Соколов О.И. и др. // Известия Саратовского университета. Серия Физика. – 2011. –Т. 11, вып. 2. – С. 58–61.
3. Мингалеева Р.Н., Соловьева В.В., Блатт Н.Л., Ризванов А.А. // КТТИ. –2013. – Т. VIII. № 2. – С. 20–28.
4. Наволокин Н.А., Павлова А.В. // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. –2012. –Т., Вып. 2. – С. 82–83.
5. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – Т. 9, № 2. – С. 213–220.

6. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Скворцова, Т.П. Байтман, А.Б. Бучарская, Н.А. Дурнова // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12. – № 2. – С. 59–59а.
7. Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Бибикова О.А. // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2013. – Т. 3. № 2. – С. 375.
8. Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Дурнова Н.А. Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью // Патент РФ № 2482863, Бюл. № 15.
9. Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н. Наволокин Н.А. // Химия растительного сырья. – 2013. – № 4. – С. 165–173.
10. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. Пер. с англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2011. – 691 с.
11. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., A.B. Bucharskaya, N. A. Durnova // Russian Open Medical Journal. – 2012. – Т. 1. – № 2. – С. 0203.
12. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Durnova N.A., Maslyakova G.N // Russian Open Medical Journal. – 2014. – Т. 3. – № 3. – С. 304.
6. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N. // Rossijskij bioterapevtičeskij žurnal. 2013. Vol. 12. no 2. pp. 59–59a.
7. Polukonova A.V., Navolokin N.A., Bibikova O.A. // Bjulleten' medicinskih internet-konferencij. 2013. Vol. 3. no. 2. pp. 375.
8. Polukonova N.V., Navolokin N.A., Durnova N.A. Sposob poluchenija suhogo jekstrakta iz rastitel'nogo syr'ja, obladajushhego biologičeskoj aktivnost'ju // Pat RU № 2482863 Bjul. no. 15.
9. Polukonova N.V., Durnova N.A., Kurchatova M.N., Navolokin N.A. // Himija rastitel'nogo syr'ja. 2013. no. 4. pp. 165–173.
10. Freshni R.Ja. Kul'tura zhivotnyh kletok: praktičeskoe rukovodstvo. Per. s angl. izd. M.: BINOM. Laboratorija znanij. 2011. 691 p.
11. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., A.B. Bucharskaya, N. A. Durnova // Russian Open Medical Journal. 2012. Vol. 1. no. 2. pp. 0203.
12. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Durnova N.A., Maslyakova G.N // Russian Open Medical Journal. 2014. Vol. 3. no. 3. pp. 304.

References

1. Bajtman T.P., Navolokin N.A. // Bjulleten' medicinskih internet-konferencij. 2013. Vol. 3. no 2. pp. 374.
2. Bibikova O.A., Staroverov S.A., Sokolov O.I. // Izvestija Saratovskogo universiteta. Serija Fizika. 2011. Vol. 11, no. 2. pp. 58–61.
3. Mingaleeva R.N., Solov'eva V.V., Blatt N.L., Rizvanov A.A. // КТТИ. 2013. Vol. 8. no2. pp. 20–28.
4. Navolokin N.A., Pavlova A.V. // Bjulleten' medicinskih Internet-konferencij. 2012. no 2. pp. 82–83.
5. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N. // Saratovskij nauchno-meditsinskij žurnal. 2013. Vol. 9, no 2. pp. 213–220.

Рецензенты:

Пучиньян Д.М., д.м.н., профессор, заместитель директора по науке, ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава РФ, г. Саратов;

Горин Д.А., д.х.н., профессор, научный руководитель департамента нанотехнологий Образовательно-научного института наноструктур и биосистем, ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 05.12.2014.