

УДК 582 : 612+57.042+57.043+574.24

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *SACTACEAE* JUSS, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ОРАНЖЕРЕИ, (ЭКСПЕРИМЕНТЫ *IN VITRO*)

**А. В. СОРОКА**

кандидат биологических наук, доцент  
МГУ имени А. А. Кулешова

**Н. В. АКУЛИЧ**

кандидат биологических наук, доцент  
МГУ имени А. А. Кулешова

**Н. А. КНЯЗЕВА**

и.о. заведующего гематологическим отделением  
Могилевская областная больница

**В. А. БРУХНОВ**

студент 5-го курса, Витебский государственный медуниверситет

*Лекарственная резистентность опухолевых клеток является важнейшей проблемой клинической онкологии. Процесс привыкания можно до известной степени замедлить путем комбинированного применения препаратов с разной структурой и неодинаковым механизмом действия.*

*Поэтому актуальность представляют исследования, направленные на поиск нового класса веществ, имеющих более сильный фармакологический и низкий токсический эффекты.*

*Мы исследовали противоопухолевый фармакологический потенциал экстрактов растений сем. Sactaceae, выращенных в условиях оранжереи.*

*В ходе проведения исследований установлено, что инкубация крови больных хроническим лимфолейкозом с алкалоидами *Pereskia aculeata* увеличивает интенсивность экспрессии и плотность распределения рецепторов CD95 на мембране лимфоцитов и сопровождается ростом числа лимфоцитов с признаками разрыва ДНК.*

**Ключевые слова:** *Pereskia aculeata*, противоопухолевый фармакологический потенциал, проточная цитомерия.

### Введение

Несмотря на достижения в лечении онкологических заболеваний farmпрепаратами, некоторые из них (за исключением таргетной терапии и применения искусственных комплексов из моноклональных антител) имеют достаточно выраженные побочные эффекты, приводят к резистентности опухолевых клеток к лекарственным средствам. Процесс привыкания можно до известной сте-

© Сорока А. В., 2016

© Акулич Н. В., 2016

© Князева Н. А., 2016

© Брухнов В. А., 2016

пени замедлить путем комбинированного применения препаратов с разной структурой и неодинаковым механизмом действия.

Комбинации лекарственных препаратов, различных по структуре и механизмам действия, используемые при интенсивной химиотерапии, оказывают значительное токсическое действие на организм в целом и приводят к развитию множественной лекарственной устойчивости. Поэтому актуальность представляют исследования, направленные на поиск нового класса веществ, имеющих более сильный фармакологический и низкий токсический эффекты.

Одной из задач современной медицины является поиск принципиально новых лекарственных соединений, созданных на основе сложных композиций, полученных из растительного сырья [1, 2, 3].

Фармакология и фармакогнозия Беларуси при производстве новых субстанций ориентируется по понятным причинам на аборигенные виды лекарственных растений. Вместе с тем, оранжерейные виды – могут содержать уникальные вещества, обладающие выраженным фармакологическим потенциалом. Так, многие представители сем. *Cactaceae* Juss. имеют разнообразные биологически активные вещества и композиции для создания новых лекарственных средств [1, 4]. Их можно использовать в пролонгированном лечении: в амбулаторно-поликлинических условиях, на “межмедикаментозном” реабилитационном этапе. При лечении некоторых заболеваний фитотерапию можно расценивать как поддерживающий метод лечения для предупреждения рецидивов, обострений, для улучшения результатов амбулаторного, стационарного или санаторного лечения.

Преимущество препаратов из лекарственных растений в том, что при их употреблении в организм человека поступает целый комплекс родственных ему биологически активных соединений. Созданные на основе лекарственных растений препараты влияют на организм мягче, чем синтетические, имеют меньше побочных эффектов.

Наибольший интерес для нашего исследования представляют следующие виды семейства *Cactaceae*: *Pereskia aculeata* (Plum.) Mill., *Pereskia grandifolia* Mill., *Coryphantha pectinata* (Engelm.) Britton et Rose. (*C. echinus* (Engelm.), *Hylocereus polyrhizus* Britton et Rose., *Eriocereus martini* (Lab.) Ricc., *Eriocereus quelichii* (Speg.) Backeb., *Trichocereus pachanoi* Britton et Rose, *Trichocereus spachianus* (Lem.). Они произрастают в тропическом и субтропическом климате и применяются при купировании некоторых классов онкологических заболеваний [1]. В Республике Беларусь эти растения произрастают в условиях оранжереи, что может оказать влияние на их лекарственные свойства.

Таким образом, цель исследования: оценить противоопухолевый фармакологический потенциал экстрактов представителей сем. *Cactaceae*, выращенных в условиях оранжереи.

#### Материалы и методы

1. *Ботанико-биохимические методы.* Растения выращивали в оранжерее ГНУ “ЦБС НАНБ” в емкостях 150-500 мл при температуре 20-25°C, относительной влажности воздуха 60–90% и притенении. Почвенный субстрат состоял из смеси верхового торфа и песка в соотношении (1:1), pH 5,7. Частота поли-

ва устанавливалась согласно изменению влажности субстрата, которая колебалась между 100–70%. Растительный материал отбирался в весенний период, после выхода растений с зимнего покоя.

Для выделения алкалоидов стебли и листья растений высушивали при комнатной температуре, хранили в сухом прохладном месте. Высушенный материал (100 г.), гомогенизированный в 200 мл 95% этанола. Спиртовой раствор фильтровали и выпарили спирт. Экстракт растворяли в 60 мл 0.1 МНСІ и 60 мл хлороформа. Водная фаза дважды экстрагировалась хлороформом<sup>1</sup>.

В исследованиях использовался хроматограф Thermo Scientific LTQ ORBITRAP, США с масс-детектором Finnigan DSQ II (Thermo Scientific, США). В качестве матрицы в ВЭЖХ использовался оксид кремния (силикагель). Производитель декларирует чувствительность хромато-масс-спектрометрии на уровне  $10^{-6}$ - $10^{-9}$  г.

## 2. Цитологические методы

Гематологическое исследование проводилось (*in vitro*) на венозной крови пациентов с антикоагулянт (гепарин) 11 доноров-добровольцев (группа 1) и 11 больных с диагнозом С91.1 МКБ 10 пересмотра (группа 2), поскольку большинство опухолевых клеток у пациентов этой группы являются покоящимися лимфоцитами, находящимися в G0-фазе клеточного цикла. Группы пациентов были рандомизированы по возрасту и отсутствию сопутствующих заболеваний.

Забор крови производился у больных, проходивших курс стационарного лечения в учреждении здравоохранения “Могилевская областная больница” при получении информированного согласия на участие в исследовании. В качестве антикоагулянта использовался гепарин 5 Ед/мл, поскольку для индукции апоптоза необходимы ионы  $Ca^{2+}$ . Перед проведением иммунофенотипирования кровь исследовалась на количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу.

Общий анализ крови производили на полуавтоматическом гемоанализаторе “Abacus” (Австрия) и микроскопе AxioImagerA1 (Zeiss) с DIC-системой ( $\times 1000/NA 1.3$ ) и видеокамерой AxioCam MRc5. Для каждого пациента создавался видеoaрхив из 100 цифровых изображений клеток.

Для анализа клеточного цикла и иммунофенотипирования кровь разводили фосфатно-солевым буфером (PBS), пробирку с кровью помещали на 30 минут в термостат ( $37^{\circ}C$ ) для предварительного оседания эритроцитов. Собирали взвесь лейкоцитов, которые затем центрифугировали в течение 10 минут для удаления тромбоцитов. Оставшиеся на дне пробирки лейкоциты разводили раствором Хенкса до объема 2 мл и ресуспендировали. Наслоение клеток на градиент плотности осуществляли по общепринятому протоколу.

3. Методика окрашивания клеток. Клетки ( $9 \times 10^5$  в  $1 \text{ см}^3$ ) инкубировали при  $37^{\circ}C$  в течение приемлемого для исследования цельной крови времени (до 8 ч). Контролем служили интактные клетки, инкубированные в тех же условиях, но

<sup>1</sup> Исследования на хромато-масс-спектрометре проводили в Национальной антидопинговой лаборатории (Республика Беларусь, поселок Лесной) совместно с доктором медицинских наук Хоменко Александром Игнатьевичем, предварительно переведя алкалоиды в диэтиловый эфир.

без экстракта. Использовалась различная концентрация изучаемых алкалоидов *Pereskia aculeata* (0-3.125 мг/мл). В работе проанализирована максимальная концентрация, обладавшая наиболее высокой фармакологической активностью.

Определение доли апоптозных клеток производилось при оценке количества и плотности рецепторов на CD95-позитивных лимфоцитах. Анализ гистограмм проводили с учетом интенсивности флуоресценции на проточном цитофлуориметре CellLabQuanta (Beckman Coulter, USA).

Для анализа клеточного цикла добавляли 1 каплю калибратора ДНК к 1 мл NIM-DAPI, затем суспензию клеток смешивали с 1 мл NIM-DAPI, достигая финальной концентрации  $1-2 \times 10^6$  клеток/мл. Образец пропускали через фильтр с диаметром пор 25 мкм и анализировали клеточную суспензию методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре CellLabQuanta (Beckman Coulter, USA). В каждой пробе анализировали не менее 10000 клеток.

Статистический анализ включал в себя подсчет средних значений для каждого случая, анализ распределения данных, сравнение серий экспериментальных исследований проводился с использованием параметрического теста Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

#### 1. Хроматографический анализ

В результате проведенного исследования изучен качественный состав алкалоидов представителей сем. *Cactaceae* на основе хромато-масс-спектрометрического анализа.

Проведенные исследования позволили установить наличие следующих веществ у видов: *Coryphantha pectinata* (тирамин, горденин), *Hylocereus polyrhizus* (тирамин), *Pereskia aculeata* (тирамин, анхаланин, анхалонидин), *Trichocereus pachanoi* (тирамин, горденин, анхаланин, анхалонидин).

На следующем этапе с помощью количественного хромато-масс-спектрометрического анализа были определены концентрации метанольных экстрактов у видов: *Hylocereus polyrhizus*, *Pereskia aculeata*, *Trichocereus pachanoi*, *Coryphantha pectinata* (рис. 1).

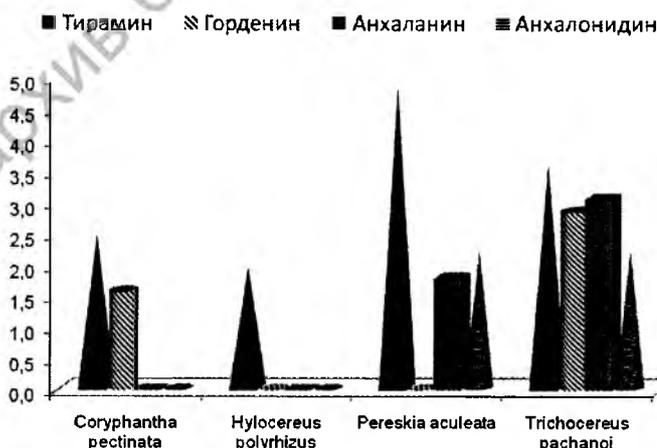


Рис. 1. Концентрация веществ (мкг/кг сухого вещества) у видов сем. *Cactaceae*

## 2. Гематологический анализ

При анализе клеточного звена иммунитета больных ХЛЛ отмечен более высокий уровень лейкоцитов и абсолютного количества лимфоцитов, в обоих случаях превышавший норму. Показатели эритрона у больных ХЛЛ можно охарактеризовать как тенденцию к анемии, о чем свидетельствует снижение на 19% относительно уровня нормы концентрации гемоглобина (известно, что для ХЛЛ характерна анемия, вследствие иммунного лизиса клеток крови).

При анализе лейкоцитарной формулы при 8-часовой инкубации цельной крови с экстрактом *Pereskia* было установлено, что количество лимфоцитов и в контроле, и эксперименте превышает норму. Число лимфоцитов в эксперименте больше количества данных клеток в контроле на 2,9%.

Таким образом, аппликация экстракта *Pereskia* не влияет на лейкоцитарную формулу и у больных отмечается относительный лимфоцитоз и моно- и нейтрофилия.

Для лимфоцитов больных ХЛЛ случаев характерен следующий фенотип: CD19+CD5+CD23+CD79b+dimCD20+dimCD22, рестрикция легких цепей ( $\kappa$  либо  $\lambda$ ). Поскольку наш проточный цитометр имеет только 3 фотодетектора, то диагностическая панель имела следующий вид: FITC – CD19 CD5; PE – CD16CD56; PC5 – CD45, причем на одном фотодетекторе (PE) разместили два взаимоисключающих маркера.

Фенотипирование лимфоцитов больных ХЛЛ показало, что Т-лимфоциты CD45+CD19–CD5+CD16+56– составляли 5% от всех проанализированных иммуноцитов; доля клеток, имеющих фенотип CD45+CD19+CD5+/-CD16+56– (В-лимфоциты, часть клеток имело aberrantный иммунофенотип) составляла – 85%, а 10% – являлись NK клетками, с фенотипом CD45+ CD16+56+CD19–.

Открытие мембранного CD95/Fas/APO-1-рецептора и его лиганда (CD95L) позволило по-новому взглянуть на молекулярные механизмы лекарственно-индуцированного апоптоза. Взаимодействие CD95 с его лигандом или с МКА против CD95 является пусковым моментом для активации процесса апоптоза (CD95-опосредованный механизм) [5].

На следующем этапе был проведен анализ интенсивности флуоресценции лимфоцитов, окрашенных моноклональными антителами к CD95 антигену, который имеет гомологию с TNF-рецептором и обеспечивает передачу апоптозного сигнала [12]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстракт *Pereskia* приводит к росту CD 95-позитивных клеток с  $41.82 \pm 12.12$  до  $75.36 \pm 3.82$  ( $p < 0,05$ ) процентов через 8 часов после аппликации.

Оценка плотности распределения рецепторов на поверхности клеточных мембран лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом при аппликации экстракта *Pereskia* (рисунок 2) выявила повышение (на 350%) плотности распределения рецепторов Fas/APO-1.

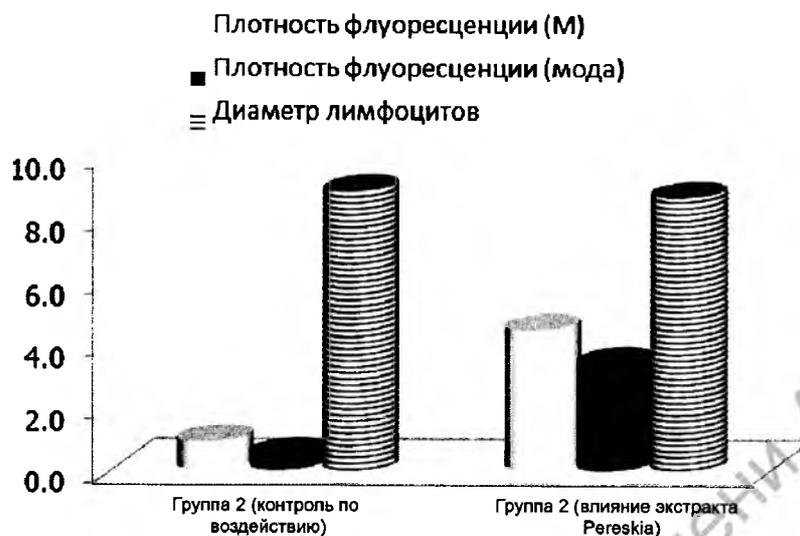


Рис. 2. Оценка апоптоза лимфоцитов у больных ХЛЛ

Эта особенно факт позволяет предположить активацию внешних путей апоптоза. Примечательно, что рост плотности распределения рецепторов не связан с изменением диаметра лимфоцитов, что указывает на ранние стадии программируемой клеточной гибели и является отличительным признаком механизма действия экстракта *Pereskia aculeata*.

На заключительном этапе был проведен цитометрический анализ периферической крови при добавлении в нее (эксперименты *in vitro*) экстракта *Pereskia aculeata*.

Установлено, что при инкубации периферической крови здоровых добровольцев с метанольным экстрактом *Pereskia aculeata* признаки апоптоза лимфоцитов периферической крови не выявлены.

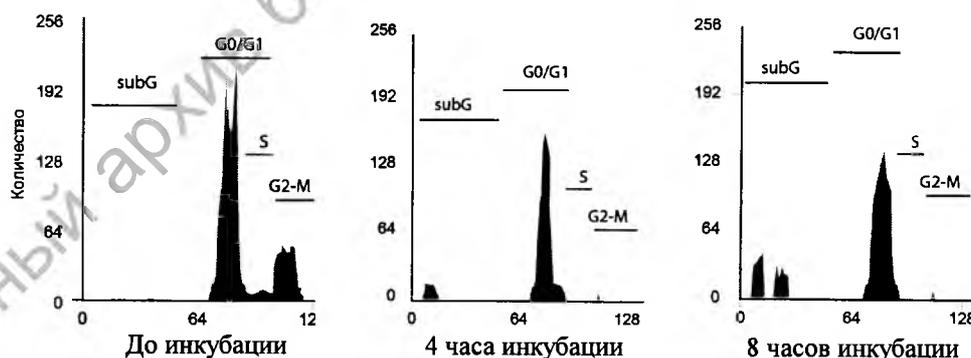


Рис. 3. Оценка клеточного цикла лимфоцитов у больных ХЛЛ

В группе 2 8-часовая инкубация цельной крови больных ХЛЛ с алкалоидами *Pereskia* не вызвала изменений лейкоцитарной формулы, которая соответ-

ствуется типичной картине заболевания. В мазках крови появлялись (7%) лимфоциты с признаками апоптоза; в контрольных образцах (группа 2 контроль по воздействию) значимых морфологических изменений не выявлено. 4-часовая инкубация цельной крови больных ХЛЛ с экстрактом *Pereskia* сопровождалась появлением лимфоцитов с признаками разрыва ДНК, а также практическим отсутствием клеток в S- и G2/M фазе. 8-часовая инкубация приводила к дальнейшему нарастанию (14%) числа клеток, имевших субдиплоидный пик, указывающий на разрыв ДНК.

### Заключение

Среди многообразия растений, представленных в Республике Беларусь, наш выбор остановился на сем. *Cactaceae*, поскольку по данным литературы в кактусах, произрастающих в открытом грунте, обнаружены соединения, обладающие отчетливым биологическим эффектом.

Например, синтез кактусовых алкалоидов начинается с аминокислоты фенилаланина и посредством специфических ферментов (например, пейот-О-метилтрансферазу) образуются конечные продукты. Наиболее известными веществами, встречающимися в данном семействе, являются: биогенные амины (горденин, тирамин), алкалоиды (анхаламин, анхалидин, анхалинин, анхалонидин, лофофорин, мескалин, пеллотин и др.), N-ацетилалкалоиды, алкалоид-лактамы, алкалоид-имиды.

В Республике Беларусь создана и поддерживается уникальная коллекция представителей сем. *Cactaceae*. Одной из наших задач являлась оценка химического состава сем. *Cactaceae*, произрастающих в условиях оранжереи. По данным проведенного нами хроматографического анализа искусственные условия, создаваемые в оранжерее для растений, существенно не изменяют их физиологию и биохимию видов: *Hylocereus polyrhizus*, *Pereskia aculeata*, *Trichocereus pachanoi*, *Coryphantha pectinata*.

В настоящей работе мы остановились на оценке индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови больных хроническим лимфолейкозом при аппликации экстрактов представителей сем. *Cactaceae*. Общеизвестно, что у больных ХЛЛ апоптоз, являющийся проявлением физиологического процесса программированной клеточной смерти, подавлен, поскольку отмечается повышение экспрессии Bcl-2, снижена экспрессия Bax, мутация p53 и другие механизмы, связанные с репарацией двойных разрывов ДНК [5–11].

Используемый в нашем исследовании методический подход применялся в ряде работ, где на культуре клеток проводилась оценка индуцированного лекарственными экстрактами апоптоза [5, 7, 11]. При аппликации экстрактов отмечена активация программы апоптоза в определенной части клеточного пула [5, 11].

Механизмы апоптоза в культуре клеток различны, несмотря на раннюю, массивную экспрессию ассоциированных с апоптозом рецепторов (в первую очередь, Fas рецептора). Так, в краткосрочных культурах преобладают не связанные с рецепторами механизмы гибели, в то время как в длительных культурах преобладают рецепторные механизмы. По мнению ряда исследователей,

это отражает динамику изменения чувствительности лимфоцитов к апоптозу в эффекторной и индуктивной фазах иммунного ответа [10, 11, 12].

Таким образом, из проведенного экспериментального исследования можно сделать следующие выводы:

1. Инкубация цельной крови больных ХЛЛ с экстрактом *Pereskia aculeata* не вызывает изменений лейкоцитарной формулы, которая соответствует типичной картине заболевания, но приводит к появлению в мазках крови лимфоцитов с признаками апоптоза. В контрольных образцах значимых морфологических изменений не выявлено.

2. 8-часовая инкубация цельной крови больных ХЛЛ с алкалоидами *Pereskia aculeata* увеличивает интенсивность экспрессии и плотность распределения рецепторов CD95 на мембране лимфоцитов.

3. Инкубация цельной крови больных ХЛЛ с экстрактом *Pereskia* сопровождалась прямо пропорциональным ростом числа лимфоцитов с признаками разрыва ДНК, а также снижением количества клеток в S- и G2/M фазах.

Поскольку в доступной нам литературе отсутствуют сведения о механизмах влияния экстрактом *Pereskia aculeata* на лимфоциты больных ХЛЛ, то мы считаем необходимым продолжить проведение экспериментальных исследований, а экстракт *Pereskia aculeata* предлагаем рассматривать как источник лекарственного сырья для создания противоопухолевых препаратов.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Блинова, Н. А.** Ботанико-фармакогностический словарь : справ. пособие / К. Ф. Блинова, Н. А. Борисова, Г. Б. Гортинский и др. ; под ред. К. Ф. Блиновой, Г. П. Яковлева. – Москва : Высш. шк., 1990. – 272 с.
2. **Горяев, М. И.** Растения, обладающие противоопухолевой активностью / М. И. Горяев, Ф. С. Шарипова. – Алма-Ата : АН КазССР, 1983. – 173 с.
3. **Садритдинов, Ф. С.** Фармакология растительных алкалоидов и их применение в медицине / Ф. С. Садритдинов, А. Г. Курмуков. – Ташкент : Медицина, 1980. – 311 с.
4. **Карцев, В. Г.** Биологическая активность и новые направления в химии изохинолиновых алкалоидов / В. Г. Карцев // Азотистые гетероциклы и алкалоиды: материалы Первой Международной конференции Москва, 9–12 октября 2001 г. / Компания Inter Bio Screen Ltd. ; под ред. В. Г. Карцева, Г. А. Толстикова. – Москва, 2001. – С. 97–104.
5. **Atassi, G.** Доклинические и клинические исследования новых противоопухолевых препаратов / G. Atassi, B. Giroux // Современная онкология. – 2002. – Т. 4, № 2. – С. 154–158
6. **Frenkel, G. D.** A Prevention strategy for circumventing drug resistance in cancer chemotherapy / G. D. Frenkel, P. B. Caffrey // Curr. Pharm. Design. – 2001. – Vol. 7. – P. 1595–1614.
7. **Germann, U. A.** Chemosensitizers to Overcome and Prevent Multidrug Resistance? / U. A. Germann, M. W. Harding // J. Natl. Cancer Inst. – 1995. – Vol. 87. – P. 1573–1575.
8. **Mata, R.** Tetrahydroisoquinoline Alkaloids of the Mexican Columnar Cactus *Pachycereus weberi* / R. Mata [et al.] // Phytochemistry. – 1980. – Vol. 19. – P. 673–678.
9. **Niranjan, P. S.** A new saponin of oleanolic acid from *Pereskia grandifolia* / P. S. Niranjan, B. Nilima, N. C. Ram // Phytochemistry. – 1974. – Vol. 13. – P. 529–530.

10. **Tan, M. L.** Methanolic extract of *Pereskia* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line / M. L. Tan, S.F. Sulaiman, N. Najimuddin, M. R. Samian, T. S. Tengku Muhammad // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2005. – V. 96. – P. 287–294.
11. **Yonehara, S.** A cell killing monoclonal antibody (anti-Fas) to cell surface antigen co-down-regulated with the receptor to tumor necrosis factor / S. Yonehara, A. Ishii // *J Exp Med* – 1989. – Vol. 109. – P. 1747–1756.
12. **Волкова, Т. О.** Биологические эффекты *in vitro* стирольных производных ряда хинолина и пиридина на примере клеток опухолевых линий / Т. О. Волкова, Н. Н. Немова // Азотистые гетероциклы и алкалоиды: материалы Первой Международной конференции, Москва, 9–12 октября 2001 г. / Компания Inter Bio Screen Ltd. ; под ред. В. Г. Карцева, Г. А. Толстикова. – Москва, 2001. – С. 254–258.

Поступила в редакцию 05.01.2016 г.

Контакты: akulichn@gmail.com (Акулич Николай Васильевич)

**Soroka A.V., Akulich N.V., Kniazeva N.A., Bruhnov V.A. ANTINEOPLASTIC PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF THE FAM. CACTACEAE JUSS GROWN IN THE GREENHOUSE CONDITIONS (in vitro experiments).**

The tumor cells' drug resistance is an urgent problem in clinical oncology. The drug addictive process can be reduced to some extent by the mixed application of medication with different structure and mechanism of action. Thus the studies aimed at the search for a new class of compounds with stronger pharmacological and low toxic effects are of importance. The antitumor pharmacological potential of the extraction of the fam. *Cactaceae* cultivated in the greenhouse has been investigated. It has been stated that the blood incubation of leukemia patients with the alkaloids of *Pereskia aculeata* increases the expression intensity and density of CD95 receptors on a lymphocyte membrane, and is accompanied by the increases of cells with DNA breaks.

**Key words:** *Pereskia aculeata*, antitumor pharmacological potential, flow cytometry.