

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-56-62

УДК: 616-091.8

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА И АУТОФАГИИ В ПЕРЕВИТОЙ САРКОМЕ-45 У КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*GRATIOLA OFFICINALIS* L.)

Н.А. Наволокин, Г.Н. Маслякова, Д.А. Мудрак, Н.В. Полуконова,
Е.С. Воронина, А.Б. Бучарская

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Минздрава России

Цель исследования – в экспериментах *in vivo* установить механизмы патоморфоза перевитой саркомы под влиянием флавоноидсодержащего экстракта аврана. Эксперимент проводили на 60 самцах крыс линии Вистар с перевитой саркомой-45. В опытных группах крысы через 72 часа после перевивки на протяжении 14 суток получали экстракт аврана перорально или внутримышечно в дозе 110 мг/кг/сут и затем выводились из эксперимента. Группу сравнения составили животные с опухолью, но без воздействия. Проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование опухолевой ткани с маркерами апоптоза (p53, bax, bcl-2, Fas-receptor, Fas-ligand), аутофагии LC3b, пролиферации Ki67 и ангиогенеза VEGF. При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения групп использовали критерий Крамера–Уэлча (T). Под влиянием экстракта аврана развивается выраженный патоморфоз перевитой саркомы-45. В опухоли разрастается фиброзная ткань, снижается пролиферация, ангиогенез и активизируются сигнальный и митохондриальный пути апоптоза, а также блокируется протекторная аутофагия. Маркер аутофагии LC3b может использоваться в качестве дополнительного критерия оценки лечебного патоморфоза опухолей.

Ключевые слова: биофлавоноиды, патоморфоз, саркома-45, *Gratiola officinalis*, апоптоз, аутофагия

Смертность от онкологических заболеваний продолжает расти, и, к сожалению, современные методы лечения не всегда оказываются эффективными [3]. Кроме того, применяемые противоопухолевые средства имеют ряд побочных действий: токсическое влияние на органы и ткани организма, развитие у опухолей к ним резистентности [1]. В связи с этим остается актуальным поиск новых, более безопасных и эффективных лекарственных средств.

Лекарственные средства растительного происхождения обладают минимальным количеством побочных эффектов, что обуславливает приоритетность их разработки. Препараты на их основе могут использоваться не только для лечения опухолей при монотерапии, но и в комплексном лечении при проведении стандартного

курса химио- и лучевой терапии для защиты нормальных клеток [1, 3].

В 2011 году у растительного флавоноида вогонина была выявлена способность активизировать апоптоз в опухолевых клетках [10]. Это обстоятельство активизировало поиск других биофлавоноидов, обладающих противоопухолевой активностью.

Ранее на животных с перевиваемыми опухолями было показано, что флавоноидсодержащий экстракт аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) наряду с малой токсичностью обладает противоопухолевой активностью в отношении перевиваемого рака печени, почки [8, 9], а также другими биологическими свойствами [13]. Тем не менее детальное изучение механизмов гибели опухолевых клеток перевиваемой саркомы с

применением иммуногистохимических маркеров под действием экстракта аврана ранее не проводилось.

Цель исследования – в экспериментах *in vivo* установить механизмы патоморфоза перевитой саркомы под влиянием флавоноидсодержащего экстракта аврана.

Материалы и методы

Экстракты были получены нами авторским способом, позволяющим существенно повысить экстракцию биофлавоноидов и предусматривающим минимальный выход токсичных соединений – алкалоидов, гликозидов и т.д. [11]. Экстракт из аврана лекарственного, полученный данным способом, имеет следующий химический состав: 4-винил-2-метоксифенол; 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4он; 2,3-дигидробензофуран; 3-фуранкарбоновая кислота; 5-гидроксиметил-2-фуральдегид; этил-а-d-рибозид; 4-пропилфенол; пирокатехин; L-люксоза (пентоза); 6-деоксигексоза L-галактоза; бензоилуксусной кислоты этиловый эфир; пальмитиновая кислота; гомованилиновая кислота; глюкоза; 1,4-ангидро-d-маннитол; бензойная кислота; кверцетин [11].

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащих Женевской конвенции 1985 года о Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных. Тема и описание экспериментов одобрены этической комиссией СГМУ им. В.И. Разумовского (протокол № 13 от 3 мая 2011 года). Исследование проведено на базе Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им В.И. Разумовского.

Исследование проводили в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [4]. В работе было использовано 60 самцов белых лабораторных крыс линии Вистар массой 150±20 граммов, которым подкожно, в область лопатки, имплантировали по 0,5 мл 25% опухолевой взвеси саркомы-45 в растворе Хэнкса. Животные с перевиваемой саркомой-45 методом случайной выборки были разделены на три группы по 20 крыс: первую и вторую опытные, получавшие водный раствор сухого экстракта аврана перорально или внутримышечно в одинаковой дозировке 110 мг/кг и третью – группу сравнения (животные с перевиваемой опухолью, но без воздействия). В опытных группах крысам раствор экстракта вводили перорально или внутримышечно, ежедневно, в течение 2 недель. Начинали вводить экстракт через 72 часа после трансплантации опухоли. По окончании опыта (через 2 недели) крыс выводили из эксперимента и для дальнейшего исследования проводили забор образцов ткани органов, опухоли.

Использовали показатель торможения роста опухоли (ТРО), свидетельствующий об эффективности

противоопухолевого препарата. Вычисляли его по формуле:

$$\text{ТРО} = [(M_{\text{контр}} - M_{\text{опыт}}) / M_{\text{контр}}] \times 100\%,$$

где $M_{\text{контр}}$ – средняя масса опухоли в группе контроля, а $M_{\text{опыт}}$ – опытной группы (оценивали массу опухоли в конце эксперимента).

Для изучения патоморфоза опухоли использовали морфологические и морфометрические методы, гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. При иммуногистохимическом исследовании применяли систему детекции REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System с антителами фирмы ABCAM (Великобритания) в разведении к антителу 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 его возможного пути реализации, аутофагии LC3b (ab48394) для уточнения роли этого процесса в механизме гибели клеток опухоли, маркер пролиферации Ki67 (clone SP6, ab16667) и ангиогенеза VEGF (clone JH121, ab28775). При окраске с иммуногистохимическими маркерами учитывали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, окрашивание на каждый маркер проводилось для всех образцов тканей одновременно для создания стандартизации условий окраски и повышения объективности полученных результатов. Подсчитывали процент экспрессирующих клеток в 10 полях зрения каждого микропрепарата, а также степень выраженности иммуногистохимических реакций: слабая (+), умеренная (++) и выраженная (+++). Учитывали наличие дистрофических и некротических изменений, а также такие цитоморфометрические показатели как диаметр опухолевых клеток, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), среднее количество клеток в поле зрения (под термином «среднее» принимали медиану). Все морфометрические исследования проводили с помощью микровизора медицинского проходящего света μ Vizo-103 (ЛОМО) при $\times 774$ не менее чем в 10 полях зрения.

При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро–Уилка. При непараметрическом распределении значимость различий определяли при помощи критерия Манна–Уитни (Z-критерий) с вычислением медианы, 25 и 75 перцентилей, максимума и минимума. При данном методе отличия между группами определяются при $Z \geq 1,96$ и $p < 0,05$ с вероятностью в 95%. Весь статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel.

Результаты

В группе сравнения перевитая саркома-45 макроскопически имела вид одного или нескольких узлов. Масса опухоли на конец эксперимента составила 18,8±6,43 грамма. При введении экстракта наблюдали резкое замедление темпов роста опухоли и в конце эксперимента в группе с внутримышечным введением она была меньше на 70,6% (6,6±2,8 грамма), а при пероральном введении – на 65,7% (6,4±5,0 грамма), чем в группе сравнения. Максимально индекс торможения по массе опухоли при внутримышечном введении составил 84,2%. В двух случаях на конец эксперимента макроскопически привитая опухоль не определилась.

Микроскопически в группе животных без воздействия экстракта опухоль представляла собой веретеноклеточный вариант саркомы и состояла из плотно расположенных пучков веретеновидных вытянутых клеток разных размеров и формы, распространяющихся в разных направлениях.

Ядра были гиперхромными, овально-округлыми, веретенообразными, хроматин распределялся в виде зернистых скоплений. Фигур митозов насчитывали до трех в поле зрения (рис. 1 А). Для цитоплазмы клеток саркомы-45 была характерна повышенная базофилия. Опухоль была окружена периферической капсулой с полнокровными сосудами, в ее центре наблюдали в единичных случаях очаги дистрофически измененных клеток и микронекрозы, обусловленные ее быстрым ростом.

В группах животных при обоих способах введения экстракта отмечали патоморфоз опухоли 2–3-й степени на 14-й день после начала введения: обширные зоны некроза, выраженная степень дистрофии в живых клетках, участки фиброза и дезорганизации соединительной ткани. Появлялась четкая граница между некрозом и сохранной тканью опухоли, площадь некроза составляла от 80 до 90% площади среза.

При проведении морфометрии как при внутримышечном, так и при пероральном введении экстракта

наблюдали значимое снижение числа клеток в поле зрения (при ×774,4) – в 1,7 раза и увеличение клеток в состоянии некроза и некробиоза (табл. 1).

Выявили уменьшение диаметра ядра и диаметра клетки в 1,5–1,6 раза при обоих способах введения, в отличие от группы сравнения, что свидетельствовало об атрофических изменениях в клетках под действием экстракта. При этом значение ядерно-цитоплазматического индекса также уменьшалось, в отличие от группы сравнения, в 1,3 раза при внутримышечном введении экстракта и в 1,2 раза при пероральном (табл. 1).

При окраске саркомы-45 методом ОКГ в группе сравнения между опухолевыми клетками выявляли тонкие прослойки соединительной ткани. При обоих путях введения экстракта наблюдали появление участков фиброза самой ткани опухоли без развития предшествующего некроза (рис. 1 Г).

При иммуногистохимическом исследовании саркомы-45 в экспериментальных группах при обоих путях введения экстракта маркер пролиферации Ki67 давал очень слабую экспрессию – индекс пролиферации при внутримышечном пути введения составил 1% и при пероральном пути 9%, в отличие от группы сравнения (без воздействия экстракта), где индекс пролиферации составлял 56% (рис. 1 Б). При этом больше половины клеток в поле зрения давало выраженную экспрессию (табл. 2).

При окраске с маркером EGFR в группе сравнения отмечали умеренную, но распространенную цитоплазматическую экспрессию рецептора эпидермального фактора роста. В экспериментальных группах при обоих путях введения экстракта отмечали очень слабую экспрессию в единичных клетках.

При оценке экспрессии маркера ангиогенеза VEGF в ткани саркомы-45 группы сравнения наблюдали его умеренную цитоплазматическую экспрессию. При пероральном введении экстракта в зоне повреждения опухоли отмечали очаговую и слабую экспрессию маркера

Таблица 1

Морфометрические показатели клеток саркомы-45 на конец эксперимента

Группа	Показатели				
	число клеток в поле зрения (×768)	диаметр ядра	диаметр клетки	ЯЦИ	число некротических клеток в поле зрения
	Медиана; (квартиль 25–75); [min-max]				
Группа сравнения	97,5 (86–109) [83–111]	0,012 (0,010–0,013) [0,010–0,014]	0,021 (0,018–0,024) [0,017–0,025]	0,69 (0,061–0,072) [0,058–0,074]	1,5 (0–2) [0–4]
Экстракт аврана внутримышечно	55,3* (48–61) [44–63]	0,0078* (0,007–0,0082) [0,007–0,0084]	0,014* (0,011–0,014) [0,010–0,016]	0,57* (0,045–0,063) [0,045–0,066]	37,4* (30–38) [29–39]
Экстракт аврана перорально	57,1* (47–62) [45–64]	0,0087* (0,007–0,009) [0,006–0,01]	0,014* (0,011–0,013) [0,010–0,015]	0,58* (0,048–0,064) [0,046–0,071]	38,9* (33–40) [31–41]

* – различия между экспериментальной группой и группой сравнения достоверны на уровне $p < 0,05$ и $z > |2|$

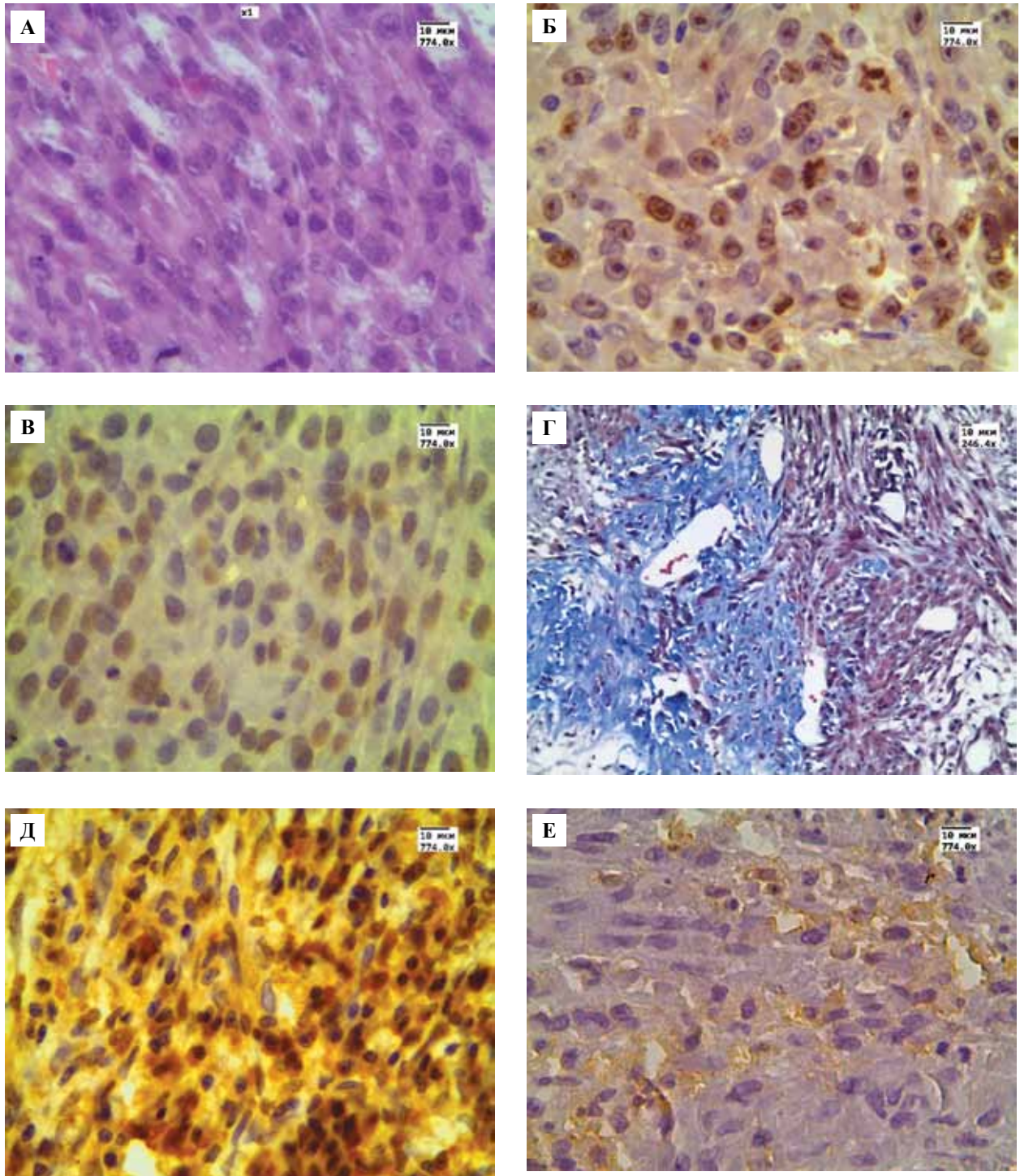


Рис. 1. Морфология опухоли и экспрессия маркеров пролиферации, апоптоза и аутофагии.

А – группа сравнения, окраска гематоксилином и эозином

Б – экспрессия Ki67 в группе сравнения

В – экспрессия p53 при пероральном введении экстракта аврана

Г – склероз стромы опухоли при пероральном введении экстракта аврана, окраска оранжевым Ж, красным 2С, голубым

Д – экспрессия CD95 (Fas/APO-1) при внутримышечном введении экстракта аврана

Е – экспрессия LC3B при пероральном введении экстракта аврана

А–В, Д–Е – $\times 774$, Г – $\times 246$

ангиогенеза VEGF, а при внутримышечном введении экстракта экспрессия маркера ангиогенеза в опухоли отсутствовала.

При оценке супрессора опухолевого роста p53 выявили отсутствие экспрессии в группе сравнения, а после введения экстракта – появление в клетках опухоли умеренной как цитоплазматической, так и ядерной экспрессии маркера p53. Данная реакция была наиболее выражена в зонах наибольшего повреждения опухоли и в клетках с более конденсированным хроматином. При внутримышечном введении экстракта количество экспрессирующих клеток достигало 69% (преобладала выраженная экспрессия), а при пероральном пути – 39% (слабая экспрессия) (рис. 1 В).

При окрашивании цитоплазматическим маркером активации апоптоза Вах в клетках саркомы-45 в группе сравнения наблюдали отрицательную реакцию, как и при пероральном введении экстракта. При внутримышечном введении отмечали слабую и умеренную экспрессию маркера более чем в 90% клеток. Кроме того, экспрессия данного маркера при внутримышечном введении наблюдалась в уже погибших клетках, что может служить подтверждением гибели клеток опухоли через апоптоз (табл. 2).

При окрашивании на маркеры апоптоза CD95 (Fas/APO-1) и FAS-ligand в группе сравнения отмечали отрицательную реакцию, а в экспериментальных группах при обоих способах введения экстракта – выраженную цитоплазматическую экспрессию (рис. 1 Д).

При оценке маркера аутофагии LC3b в клетках саркомы-45 в группе сравнения и при внутримышечном введении экстракта положительная экспрессия отсутствовала, а при пероральном введении слабая экспрессия наблюдалась только в отдельных полях зрения (рис. 1 Е).

Обсуждение

После введения животным экстракта аврана в опухолевой ткани развивался выраженный патоморфоз с образованием обширных очагов некроза, фиброза и дистрофических изменений опухолевых клеток. Качественно изменялась экспрессия изученных маркеров: уменьшалась экспрессия Ki67, EGFR, VEGF и увеличивалась экспрессия маркеров программированной гибели клеток: апоптоза (p53, Вах, CD95(Fas/APO-1), FAS-ligand) и аутофагии (LC3b). Следует отметить, что количественные изменения экспрессии маркеров не противоречат друг другу и согласуются с данными об апоптотической активности флавоноидов, полученными другими авторами в экспериментах *in vitro* [13].

Обращало на себя внимание, что экспрессия маркеров активации апоптоза наблюдается даже в безъядерных клетках. Это позволило предположить, что обширные поля безъядерных клеток, появляющиеся в опухоли под действием экстракта, формируются путем гибели их не через механизм некроза, а через апоптоз. Подтверждается это не только иммуногисто-

Экспрессия иммуногистохимических маркеров в группе сравнения и экспериментальных группах под действием экстракта аврана

Маркер	Группы		
	сравнения	внутримышечное введение экстракта	пероральное введение экстракта
% положительно экспрессирующих клеток			
Индекс пролиферации (Ki67)	56 (47–62) [44–63] +++	1±0,4* (0–2) [0–3] +	9±0,1* (5–15) [3–16] +
Маркер EGFR	92 (75–96) [70–97] +/++	0*	0*
Маркер ангиогенеза (VEGF)	85 (72–89) [65–92] ++	0*	5 (3–6) [2–11] +
Маркер аутофагии (LC3B)	0	0	11 (8–15) [6–19] +
p53	0	67* (51–81) [49–86] +++	36* (32–43) [31–46] +
Вах	0	68* (45–82) [42–88] +/++	0
CD95 (Fas/APO-1)	0	44,7* (40–51) [39–53] ++	41,6* (37–50) [30–52] ++
FAS-ligand	0	40,3* (31–42) [30–45] +++	38,7* (31–48) [29–49] +++

* – различия между экспериментальной группой и группой сравнения достоверны на уровне $p < 0,05$ и $z > |2|$

+, ++, +++ – степень выраженности экспрессии (слабая, умеренная и выраженная)

химическими маркерами, но и следующими морфологическими изменениями: уменьшение размеров клеток, сохранность мембраны клеток (при отсутствии ядра), отсутствие признаков реактивного воспаления в опухоли. Также это согласуется с низким содержанием продуктов перекисного окисления липидов у животных с опухолями на фоне введения экстракта аврана и отсутствием признаков интоксикации у крыс, которые должны бы были появиться, если бы в опухоли развивались массивные очаги некроза [8, 9].

Нами было выявлено, что в опухолевых клетках развивается аутофагия, и частота ее развития зависит от пути введения экстракта. Установлено, что аутофагия развивается в опухолевых клетках только при пероральном пути введения аврана и не наблюдается при внутримышечном введении, что, скорее всего, связано с большей биодоступностью и, следовательно, большей концентрацией экстракта в опухоли при данном пути введения. Аутофагия не диагностировалась и в группе сравнения. Этот факт позволяет предположить, что аутофагия действительно развивается как защитный механизм опухолевой клетки при действии повреждающего агента (в данном случае – противоопухолевого средства). В литературе нет однозначного мнения о появлении признаков аутофагии в опухолевых клетках. Некоторые авторы говорят о более благоприятном прогнозе для пациентов при появлении аутофагов в опухолевых клетках [12, 15], однако большинство исследователей считают, что экспрессия LC3b связана с худшим прогнозом течения заболевания [6, 7, 14]. Мнения всех специалистов сходятся в том, что аутофагия может развиваться в клетках (в том числе опухолевых) как защитный механизм в ответ на лечение [5–7, 12, 14, 15]. Следовательно, нельзя исключить, что появление факта аутофагии может считаться признаком развития резистентности опухоли к действию препаратов из-за недостаточной дозировки, и это необходимо учитывать при оценке степени патоморфоза и определения дальнейшей тактики лечения пациентов.

Выводы

Патоморфоз саркомы-45 после курса введения экстракта аврана в дозе 110 мг/кг проявляется в виде развития выраженных некробиотических и атрофических изменений в опухолевых клетках (уменьшение размеров ядра и клетки в 1,5 раза, снижение пролиферативной активности (Ki-67), исчезновении фигур митозов и переходе клеток в состояние G0, снижении экспрессии маркера ангиогенеза (VEGF).

Механизм противоопухолевой активности экстракта аврана реализуется через активацию апоптоза в клетках саркомы. При этом происходит активация как митохондриального (белки p53, BAX), так и внешнего рецепторного пути через белки CD95 (Fas/APO-1) и FAS-ligand.

Все описанные процессы развиваются более интенсивно (в 1,5–2 раза) при внутримышечном введении аврана. В опухолевых клетках при недостаточной концентрации экстракта при его пероральном введении развивается цитопротекторная аутофагия, а при внутримышечном происходит ее блокирование.

Маркер аутофагии LC3b может использоваться в качестве дополнительного критерия оценки лечебного патоморфоза опухолей, так как отражает эффективность терапии.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Исследование экстрактов лекарственных растений, содержащих флавоноиды, и их фракций с целью создания препаратов, обладающих противоопухолевой, антиоксидантной, антикахексической и другой активностью» и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00298.

Литература/References

1. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е. Растения в комплексной терапии опухолей М.: Издательство РАМН, 2008. С. 180–190 [Gol'dberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P., Amosova E.N., Krylova S.G., Gol'dberg V.E. Plants in the treatment of tumors М.: Izdatel'stvo RAMN, 2008. P. 180–190 (In Russ.)].
2. Горбунова В.А. Новые подходы в лекарственном лечении сарком мягких тканей // Поволжский онкологический вестник. 2012 № 2. С. 25–34 [Gorbunova V.A. Novye podhody v lekarstvennom lechenii sarkom myagkikh tkanej // Povolzhskij onkologicheskij vestnik. 2012. V. 2. P. 25–34 (In Russ.)].
3. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой терапии. М.: Практическая медицина, 2006. 190 с. [Korman D. B. Osnovy protivopukholevoi terapii. М.: Prakticheskaya meditsina, 2006. 190 p. (In Russ.)].
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Мироннова. М.: Гриф и К., 2012. 944 с. [Guidelines for conducting pre-clinical trials of drugs. Part one / Pod red. A.N. Mironova. М.: Grif i K., 2012. 944 p. (In Russ.)].
5. Dokladny K., Zuhl M.N., Mandell M., Bhattacharya D. et al. Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: heat shock response and autophagy // Journal of Biological Chemistry. 2013;288:14959–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462408>
6. Lai K., Mathews S., Wilmott J.S., Killingsworth M.C. et al. Differences in LC3B expression and prognostic implications in oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma patients // BMC Cancer. 2018;18:624. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4536-x>
7. Liu J.L., Chen F.F., Lung J., Lo C.H. et al. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma // Br J Cancer. 2014;111:944–54. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.355>
8. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B. et al. Effect of extracts of Gratiola officinalis and Zea mays on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with transplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012;2(1):0203. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2012.0203>
9. Navolokin N.A., Mudrak D.A., Bucharskaya A.B., Matveeva O.V. et al. 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;6(3):e0304. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2017.0304>
10. Polier G., Ding J., Konkimalla B.V., Eick D. et al. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apop-

- tosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1 // Cell Death Dis. 2011;2:e182. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.66>
11. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B. et al. A new extraction method of bioflavonoids from poisonous plant (*Gratiola officinalis* L.) // Russian Open Medical Journal. 2014;3(3):304. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2014.0304>
 12. Tang J.Y., Hsi E., Huang Y.C., Hsu N.C. et al. High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma // Hum Pathol. 2013;44:2558–62. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.06.017>
 13. Tkachenko N., Pravdin A., Terentyuk G., Navolokin N. et al. Inhibitor of photodynamic haemolysis by *Gratiola officinalis* L. Extract // SPIE Proceedings. 2015;9448:94480. <https://doi.org/10.1117/12.2179862>
 14. Wu D.H., Jia C.C., Chen J., Lin Z.X. et al. Autophagic LC3B overexpression correlates with malignant progression and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma // Tumour Biol. 2014;35:12225–33. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2531-7>
 15. Yang Z., Ghoorun R.A., Fan X., Wu P. et al. High expression of Beclin-1 predicts favorable prognosis for patients with colorectal cancer // Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2015;39:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.06.014>

EXPRESSION OF MARKERS OF APOPTOSIS AND AUTOPHAGIA IN TRANSPLANTED SARCOMA-45 IN RATS IN CASE OF ADMINISTRATION OF FLAVONOID-CONTAINING EXTRACT OF *GRATIOLA OFFICINALIS* L.

N.A. Navolokin, G.N. Maslyakova, D.A. Mudrak, N.V. Polukonova, E.S. Voronina, A.B. Bucharskaya

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov

The aim of the study was to determine the mechanisms of pathomorphosis of transplanted sarcoma 45 under the influence of the flavonoid-containing extract of *Gratiola officinalis* in experiments in vivo. Materials and methods. The experiment was carried out on 60 male Wistar rats with transplanted sarcoma 45. The rats received the *Gratiola officinalis* extract orally or intramuscularly 72 hours after the inoculation for 14 days at a dose of 110 mg/kg/day and then were removed from the experiment. The comparison group comprised untreated animals with a tumor. The histological and immunohistochemical examination of tumor tissue was performed using markers of apoptosis (p53, bax, bcl-2, Fas-receptor, Fas-ligand), autophagy (LC3b), proliferation (Ki67) and angiogenesis (VEGF). The normality of the distribution was verified using the Shapiro-Wilk test. The Cramer-Welch criterion (T) was used for comparison of groups. Results. The pronounced pathomorphological changes in sarcoma-45 were revealed under the influence of *Gratiola officinalis* extract. Fibrous tissue expansion, decreased proliferation and angiogenesis, activation of mitochondrial signaling of apoptosis as well as blocking protective autophagy were found in the tumor. The LC3b autophagy marker can be used as an additional criterion for pathomorphological analysis of treated tumors.

Key words: bioflavonoids, pathomorphosis, sarcoma 45, *Gratiola officinalis*, apoptosis, autophagy

Информация об авторах

Наволокин Никита Александрович – ассистент кафедры патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410049, Саратов, 3-й Кавказский тупик, д. 7а, кв. 29. Телефон 8 903 045 8463. E-mail: nik-navolokin@yandex.ru

Маслякова Галина Никифоровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410012, Саратов, ул. Университетская, д. 56, кв. 42. Телефон 8 (8452) 996 75. E-mail: gmaslyakova@yandex.ru

Мудрак Дмитрий Андреевич – ассистент кафедры патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410009, Саратов, ул. Цветочная, д. 1, кв. 116. Телефон 8 967 506 3525. E-mail: хурпр-wh@mail.ru

Полуконова Наталья Владимировна – доктор биологических наук, профессор, кафедра общей биологии, ботаники и фармакогнозии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410012, Саратов, ул. Большая казачья, д. 112. Телефон 8 960 344 6347. E-mail: polukonovanv@yandex.ru

Воронина Елена Сергеевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410012, Саратов, ул. Большая казачья, д. 112. Телефон 8 903 021 5216. E-mail: lenchicves@mail.ru

Бучарская Алла Борисовна – кандидат биологических наук, руководитель ЦКП НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410000, Саратов, ул. Клиническая, д. 5. Телефон 8 905 385 0895. E-mail: allaalla_72@mail.ru

Материал поступил в редакцию 18 октября 2018 года