

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА *HELICHRYSUM ARENARIUM* (ASTERACEAE) В ОТНОШЕНИИ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

© 2025 г. Н. В. Полуконова¹, М. Н. Курчатова^{1,*}, Н. А. Наволокин¹,
М. А. Барышникова², А. М. Мыльников¹, А. В. Полуконова¹, Н. А. Дурнова^{1,3}

¹ Саратовский государственный медицинский университет им В.И. Разумовского Минздрава РФ,
г. Саратов, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ,
г. Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ,
г. Москва, Россия

*email: kurchatova.maryya@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2024 г.

После доработки 25.11.2024 г.

Принята к публикации 11.12.2024 г.

Впервые выявлено наличие цитотоксической и антипролиферативной активности у экстракта бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) и его способность активировать апоптоз опухолевых клеток человека: Jurkat, MCF-7, SK-BR-3, A549, PC-3, НСТ-116, A498. Под действием экстракта в концентрации 0.9 мг/мл через сутки обнаруживали клетки в стадии раннего апоптоза (от 36.1% на линии A549 до 49.2% – на линии НСТ-116) и позднего апоптоза (от 11.7% на линии НСТ-116 до 37.7% на линии MCF-7). Клетки разных линий реагировали по-разному: в одних преобладали клетки на стадии раннего апоптоза, в других – позднего апоптоза или даже полного разрушения клеток. Под действием экстракта *H. arenarium* в линии Jurkat установлен каспазо-зависимый апоптоз, индукция которого идет через каспазу-3. При действии экстракта при 0.9 мг/мл наблюдали более 11% клеток, погибших апоптозом, на культурах клеток: A549, PC-3, НСТ-116 и MCF-7. Максимальную активность на клетки A498 экстракт *H. arenarium* проявил в концентрации 7.2 мг/мл: в первые 24 ч воздействия выявлена цитотоксическая, цитостатическая активность, снижение способности клетки к цитопротекторной аутофагии; через 48 ч у экстракта сохранялась только цитостатическая активность.

Ключевые слова: *Helichrysum arenarium*, Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, аденокарцинома молочной железы MCF-7, SK-BR-3, карцинома легкого A549, карцинома простаты PC-3, карцинома толстой кишки НСТ-116, карцинома почки A498

DOI: 10.31857/S0033994625010095, **EDN:** EGERBT

В лечении онкологических больных остается много нерешенных проблем: выраженная токсичность многокурсовой химиотерапии; формирование множественной лекарственной устойчивости – приобретение опухолевыми клетками перекрестной резистентности к цитостатикам с разными механизмами действия и внутриклеточными мишениями, которые усугубляют друг друга и значительно снижают эффективность лечения [1]. Перспективными веществами для создания противоопухолевых препаратов могут быть биофлавоноиды. Показано, что

флавоноиды экстракта аврана лекарственного способствуют активации апоптоза в опухолевых клетках за счет негативной регуляции антиапоптотических белков, оказывая на них избирательное воздействие, препятствуют развитию цитопротекторной аутофагии и, соответственно, развитию резистентности к химиотерапии, а также могут приводить к замещению опухолевой ткани соединительной и переводить клетки опухоли из фазы G1 клеточного цикла в состояние покоя G0 [2–11].

Бессмертник песчаный *Helichrysum arenarium* (L.) Moench – многолетнее травянистое растение семейства Сложноцветные, в цветках которого накапливаются биологически активные вещества, обусловливающие лекарственные свойства этого растения, в том числе флавоноиды [12]. Известно, что экстракт *H. arenarium* обладает противоопухолевой активностью в отношении перевиваемой саркомы 45 (уменьшает объем опухоли, вызывает некротические и дистрофические процессы в ней), а также благоприятно влияет на организм животных в целом [13–19].

Цель исследования – определение влияния флавоноидсодержащего экстракта бессмертника песчаного на семь линий опухолевых клеток человека: Jurkat, MCF-7, SK-BR-3, A549, PC-3, HCT-116, A498 и механизма его противоопухолевого воздействия. Для этого использовали флуоресцентные методы визуализации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Растительное сырье – цветки бессмертника песчаного собирали в Лысогорском районе Саратовской области в июле 2024 г.

Экстракт цветков *H. arenarium* получали согласно Патенту № 2482863 [20]. Цветки *H. arenarium* измельчали, экстрагировали 96%-ным спиртом на водяной бане, доводили до кипения и кипятили в течение 14–15 минут, затем выпаривали при температуре 55–60 °C, разводили выпаренный остаток сначала дистиллированной водой при температуре 40–50 °C, затем добавляли хлороформ в пропорции 4/5 части воды и 1/5 части хлороформа, охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали со скоростью 1500 оборотов в минуту в течение 15 минут, затем водную фракцию отделяли и высушивали [20]. Методом молекулярной абсорбционной спектроскопии установлено, что данный экстракт содержит 73.48 мг флавоноидов в пересчете на рутин или 17.94 мг в пересчете на кверцетин на 1 г сухой массы экстракта [13]; и имеет следующий состав (с указанием их относительного содержания от всех флавоноидов): наинггин (13.91%) и его растворимый агрегат (21.39%), прунин (6.72%), кверцетин (1.29%), апигенин (13.62%), наингенин (2.31%), 5-О-глюкозид апигенина (1.70%), а также изосалипурпозид (7.89%) и его агрегат (7.02%).

Полулетальную концентрацию экстракта рассчитывали согласно руководству [21].

Определение апоптоза методом двойного окрашивания аннексином V и йодистым пропидием на проточном цитофлуориметре. Индукцию апоптоза исследовали после инкубации с экстрактом *Helichrysum arenarium* в концентрации 0.9 мг/мл в течение 24 ч следующих клеточных линий: 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, карциномы почки A498 из банка опухолевых культур НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина. Культивирование клеток проводили в пластиковых флааконах в среде RPMI 4 (10% эмбриональной сыворотки, гентамицин, ампциллин, амфотерицин). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C в течение 24 ч.

Исследование проводили с помощью Annexin-V FITC Apoptosis Kit (Invitrogen, Life Technologies, USA). Аннексин V связывается с фосфотидилсерином, выходящим наружу клеточной мембраны в ранней стадии апоптоза. Йодистый пропидий связывается с ДНК разрушенных клеток и является маркером поздней стадии апоптоза или некроза. В итоге определяли количество опухолевых клеток, находившихся на разных этапах их гибели (табл. 1): раннего апоптоза (квадрат Q4), позднего апоптоза (квадрат Q2) и некроза (квадрат Q1). Для проведения реакции клетки снимали, отмывали в PBS и ресуспенсировали в аннексин-связывающем буфере в количестве 1 млн клеток/мл, затем переносили по 100 мкл клеток в пробирки, содержащие 5 мкл Annexin-V-FITC и 5 мкл PI. Инкубировали при комнатной температуре в темноте 15 минут. Добавляли 400 мкл аннексин-связывающего буфера и считали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BecktonDickenson, USA.).

Для обнаружения морфофункциональных изменений в культуре клеток A498 под воздействием экстракта на микроскопе Nikon применяли двойное окрашивание акридиновым оранжевым и йодистым пропидием, что позволило оценивать гибель опухолевых клеток апоптозом [16]. Эксперименты проводили в культуральных планшетах: три контрольные и три экспериментальные лунки для изучения каждой концентрации через 24 и 48 ч. Исследовали следующие концентрации экстракта: 0.9, 1.8, 3.6, 7.2 мг/мл.

Для анализа механизмов противоопухолевого действия экстракта проводили сравнение в контроле и эксперименте по следующим показателям: 1) цитотоксическая активность: количество мертвых клеток и отношение их числа к общему количеству клеток; 2) цитостатическая активность: общее количество клеток в поле зрения, количество мертвых и живых клеток и отношение их числа к общему количеству клеток, количество делящихся клеток и отношение их числа к количеству живых клеток; 3) апоптотическая активность: количество клеток с серпами, с пикнозом и в апоптозе и отношение их числа к количеству живых клеток; 4) аутофагосомная активность: количество клеток с аутофагосомами и отношение их числа к количеству живых клеток; 5) активность, приводящая к митотической катастрофе: количество полиплоидных клеток и отношение их числа к количеству живых клеток.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения SPSS 17.0. Нормальность распределения признаков определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения показателей, полученных в исследовании при их параметрическом распределении, но без равенства дисперсий, использовали критерий Крамера–Уэлча (T), при котором разность средних арифметических двух выборок (контрольной и экспериментальной) делится на естественную оценку среднего квадратического отклонения этой разности. При данном методе отличия средних с вероятностью более 95% ($p > 0.05$) определяются при $T \geq 1.96$. При непараметрическом распределении значимость различий между группами определяли при помощи критерия Манна–Уитни (U/Z-критерий) с вычислением медианы, 25 и 75 перцентиля, максимума и минимума. При данном методе отличия медиан определяются при $Z \geq 1.96$ на уровне значимости $p < 0.05$ (с вероятностью более 95%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка активации апоптоза в опухолевых клетках линий Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, карциномы почки A498 под действием экстракта бессмертника. Под действием экстракта через сутки обнаруживали клетки в стадиях раннего апоптоза (от 36.1% на линии

карциномы легкого A549 до 49.2% на линии карциномы толстой кишки HCT-116) и позднего апоптоза (от 11.7% на линии карциномы толстой кишки HCT-116 до 37.7% на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7), что свидетельствует о наличии противоопухолевой активности у экстракта бессмертника и его способности активировать апоптоз при использовании экстракта в исследованной концентрации. Кроме того, клетки разных культур реагировали на экстракт по-разному: в одних культурах преобладала гибель клеток на стадии раннего апоптоза, в других – на этапе позднего апоптоза или даже путем полного разрушения клеток. При действии экстракта в концентрации 0.9 мг/мл наблюдали более 11% клеток, погибших апоптозом, в культурах клеток: A549, PC-3, HCT-116 и MCF-7 (табл. 1).

Исследование каспазо-зависимого пути апоптоза в опухолевых клетках Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat. На клеточной линии Jurkat был исследован каспазо-зависимый апоптоз (каспаза-3) на фоне экспозиции экстрактом бессмертника.

В эксперименте с anti-caspase-3-FITC (BD) получен достаточно выраженный сигнал – 10.1% положительных клеток. Установлено, что под действием экстракта бессмертника в опухолевой линии Jurkat апоптоз каспазо-зависимый и его индукция осуществляются через каспазу-3.

Исследование противоопухолевой активности на клетках рака почки человека A498 через 24 ч и 48 ч. Полулетальная концентрация экстракта бессмертника в отношении опухолевых клеток A498 7.22 мг/мл.

Состояние клеточной культуры рака почки человека A498 через 24 ч в контроле. Клетки рака почки человека A498 в контроле через 24 ч. имели полигональную форму и были хорошо прикреплены к подложке. Мертвые клетки в контроле единичны.

Состояние клеточной культуры рака почки человека A498 через 24 ч под действием экстракта. Большая часть клеток при концентрации 0.9 мг/мл имела округлую форму, что свидетельствует о потере их контакта с подложкой и заметном воздействии экстракта.

Исследование цитотоксической активности экстракта на клетки рака почки человека A498. Количество и отношение мертвых опухолевых

Таблица 1. Процентное распределение клеток опухолей при воздействии экстракта *Helichrysum arenarium* в концентрации 0.9 мг/мл по данным проточной цитофлуориметрии
Table 1. Flow cytometric data of percentage distribution of tumor cells treated with 0.9 mg/ml extract of *Helichrysum arenarium*

Клеточные линии Cell lines	Группа Group	Квадрат Q3 Живые клетки Square Q3 Living cells (AnV ⁻ /PI ⁻), %	Квадрат Q4 Ранние апоптотические клетки Square Q4 Early apoptotic cells (AnV ⁺ /PI ⁻), %	Квадрат Q2 Поздние апоптотические клетки Square Q2 Late apoptotic cells (AnV ⁺ /PI ⁺), %	Квадрат Q1 Некротические клетки Square Q1 Necrotic cells (AnV ⁻ /PI ⁺), %
A549	Контроль Control	90.8 ± 3.1	3.0 ± 2.0	4.1 ± 1.2	2.3 ± 0.2
	Экстракт Extract	51.6 ± 4.2	36.1 ± 2.2	10.2 ± 2.4	1.2 ± 1.0
PC-3	Контроль Control	96.0 ± 3.0	1.6 ± 1.1	3.0 ± 1.0	0.2 ± 0.1
	Экстракт Extract	82.0 ± 4.0	6.0 ± 2.1	12.0 ± 2.1	0.7 ± 0.2
HCT-116	Контроль Control	79.4 ± 2.4	10.0 ± 3.0	8.0 ± 2.0	3.0 ± 1.2
	Экстракт Extract	37.4 ± 2.0	49.2 ± 5.2	11.7 ± 2.4	1.9 ± 1.0
MCF-7	Контроль Control	82.0 ± 5.0	0.8 ± 1.0	8.0 ± 2.2	9.9 ± 2.4
	Экстракт Extract	47.8 ± 3.4	8.0 ± 4.0	37.7 ± 4.2	7.0 ± 2.0
SK-BR-3	Контроль Control	97.0 ± 3.0	0.9 ± 0.4	2.3 ± 1.2	0.2 ± 0.1
	Экстракт Extract	94.2 ± 3.1	2.6 ± 0.8	2.7 ± 2.0	0.5 ± 0.3
Jurkat	Контроль Control	97.2 ± 1.5	1.4 ± 0.7	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.4
	Экстракт Extract	88.0 ± 6.0	4.3 ± 1.2	7.5 ± 2.1	0.9 ± 0.4

Примечание: полужирным шрифтом выделены значения, имеющие статистически значимые отличия от контроля при $p < 0.05$ критерия Крамера–Уэлча.

Note: values with statistically significant differences from the control at $p < 0.05$ by Cramer–Welch test are highlighted in bold.

клеток к общему количеству клеток А498 под воздействием экстракта через 24 ч увеличивались по сравнению с контролем при всех концентрациях. Количество мертвых клеток увеличилось по сравнению с контролем при 0.9–3.6 мг/мл более, чем в 2 раза, а при 7.2 мг/мл более, чем в 17 раз (табл. 2), что свидетельствует о наличии у экстракта выраженной цитотоксической активности в отношении клеток рака почки человека А498.

Исследование цитостатической активности на клетки А498. Общее количество опухолевых клеток в поле зрения достоверно не отличалось при воздействии экстракта в разных концентрациях через 24 ч по сравнению с контролем, однако показало тенденцию к снижению, причем нелинейного характера. Количество живых клеток через 24 ч также показало тенденцию

к снижению при всех концентрациях экстракта, при этом достоверное снижение наблюдали только при 0.9 и 7.2 мг/мл. Отношение количества живых клеток к общему количеству клеток при всех концентрациях показало наличие у экстракта выраженного цитостатического действия. При оценке количества делящихся клеток на стадиях мета-, ана- и телофазы, не выявлено отличий между клетками под действием экстракта и контролем (табл. 2).

Исследование апоптотической активности в отношении клеток А498 через 24 ч. В результате оценки количества клеток с ядрами в виде серпов, клеток с пикнозом ядра, а также отношения количества таких клеток к количеству живых клеток не выявили отличий между клетками под действием экстракта и контролем. Однако количество клеток, распавшихся

Таблица 2. Воздействие экстракта *Helichrysum arenarium* в разных концентрациях на клетки рака почки человека A498 через 24 ч

Table 2. Effect of *Helichrysum arenarium* extract in different concentrations on human renal cell carcinoma A498 cells after 24 h of treatment

Группа Group	Контроль Control Median (Q1–Q3) [min–max]	Концентрации экстракта, мг/мл Extract concentrations, mg/mL			
		0.9 Median (Q1–Q3) [min–max]	1.8 Median (Q1–Q3) [min–max]	3.6 Median (Q1–Q3) [min–max]	7.2 Median (Q1–Q3) [min–max]
Показатели (в поле зрения) Indicators (in the field of view)					
форма клеток cell shape	вытянутая elongated	круглая round	круглая round	круглая round	круглая round
общее кол-во клеток total number of cells	138.0 (125–162.75) [106–192] <i>p</i> = 0.193	128.0 (119.5–133) [114–155] <i>p</i> = 0.269	120.0 (112–150) [109–173] <i>p</i> = 0.269	115.0 (110.5–137.5) [96–182] <i>p</i> = 0.155	152.0 (135.75–185.25) [108–196] <i>p</i> = 0.285
кол-во мертвых клеток number of dead cells	4.0 (2.25–8) [0–21] <i>p</i> = 0.029	9.0 (7–11.5) [5–34] <i>p</i> = 0.028	10.0 (7–13) [3–17] <i>p</i> = 0.028	9.0 (6.5–10.5) [5–13] <i>p</i> = 0.048	71.5 (68.5–92.75) [50–98] <i>p</i> < 0.01
отношение кол-ва мертвых клеток к общему кол-ву клеток ratio of the dead cells to the total number of cells	0.025 (0.02–0.07) [0–0.125] <i>p</i> = 0.015	0.060 (0.056–0.096) [0.037–0.25] <i>p</i> = 0.015	0.090 (0.06–0.1) [0.02–0.136] <i>p</i> = 0.012	0.080 (0.045–0.09) [0.038–0.114] <i>p</i> = 0.012	0.498 (0.475–0.504) [0.439–0.519] <i>p</i> < 0.01
кол-во живых клеток number of living cells	134.5 (119.5–150.5) [103–177] <i>p</i> = 0.042	110.0 (106.5–124) [100–146] <i>p</i> = 0.042	113.0 (101–144) [99–163] <i>p</i> = 0.105	105.0 (103.5–128) [85–175] <i>p</i> = 0.09	79.0 (67.25–93.5) [58–98] <i>p</i> < 0.01
отношение кол-ва живых клеток к общему кол-ву клеток ratio of the living cells to the total number of cells	0.970 (0.93–0.98) [0.87–1] <i>p</i> = 0.015	0.940 (0.9–0.94) [0.75–0.96] <i>p</i> = 0.015	0.900 (0.89–0.94) [0.86–0.97] <i>p</i> = 0.012	0.920 (0.91–0.96) [0.89–0.96] <i>p</i> = 0.012	0.502 (0.495–0.525) [0.481–0.561] <i>p</i> < 0.01
кол-во делящихся клеток number of dividing cells	2.0 (1.25–2.75) [0–4] <i>p</i> = 0.234	1.0 (0.5–2.5) [0–3] <i>p</i> = 0.323	2.0 (1–2) [0–3] <i>p</i> = 0.323	1.0 (1–2) [0–2] <i>p</i> = 0.089	0.0 (0–0) [0–1] <i>p</i> < 0.01
отношение кол-ва делящихся клеток к кол- ву живых клеток ratio of the dividing cells to the number of living cells	0.014 (0.009–0.018) [0–0.04] <i>p</i> = 0.413	0.010 (0.003–0.02) [0–0.28] <i>p</i> = 0.738	0.010 (0.009–0.02) [0–0.022] <i>p</i> = 0.738	0.010 (0.0095–0.013) [0–0.024] <i>p</i> = 0.318	0.000 (0–0) [0–0.01] <i>p</i> < 0.01
кол-во клеток с серпами number of sickle cells	1.0 (1–2) [0–4] <i>p</i> = 0.082	0.0 (0–1.5) [0–2] <i>p</i> = 0.017	0.0 (0–1) [0–2] <i>p</i> = 0.017	1.0 (0–1) [0–1] <i>p</i> = 0.026	0.0 (0–0.25) [0–3] <i>p</i> < 0.01
кол-во клеток с пикнозом number of pyknotic cells	4.5 (3.25–5.75) [2–7] <i>p</i> = 0.196	5.0 (4.5–6.5) [3–8] <i>p</i> = 0.281	4.0 (2–4) [2–8] <i>p</i> = 0.281	4.0 (4–5) [2–7] <i>p</i> = 0.975	4.0 (3.75–5) [2–5] <i>p</i> = 0.67
отношение кол-ва клеток с пикнозом к кол-ву живых ratio of pyknotic cells to the number of living cells	0.032 (0.02–0.04) [0.01–0.06] <i>p</i> = 0.096	0.040 (0.035–0.058) [0.027–0.08] <i>p</i> = 0.096	0.030 (0.02–0.035) [0.013–0.05] <i>p</i> = 0.681	0.038 (0.035–0.048) [0.011–0.067] <i>p</i> = 0.318	0.057 (0.045–0.063) [0.02–0.07] <i>p</i> = 0.08

Таблица 2. Окончание

Группа Group	Контроль Control Median (Q1–Q3) [min–max]	Концентрации экстракта, мг/мл Extract concentrations, mg/mL			
		0.9 Median (Q1–Q3) [min–max]	1.8 Median (Q1–Q3) [min–max]	3.6 Median (Q1–Q3) [min–max]	7.2 Median (Q1–Q3) [min–max]
форма клеток cell shape	вытянутая elongated	круглая round	круглая round	круглая round	круглая round
кол-во клеток с апоптотическими тельцами number of cells with apoptotic bodies	0.0 (0–0) [0–1]	1.0 (0.5–1) [0–2] <i>p</i> = 0.003	0.0 (0–1) [0–2] <i>p</i> = 0.04	1.0 (0.5–1) [0–2] <i>p</i> = 0.03	0.0 (0–0.25) [0–1] <i>p</i> = 0.374
кол-во клеток с аутофагосомами number of cells with autophagosomes	8.0 (5–10.75) [3–14]	18.0 (7–20) [6–23] <i>p</i> = 0.06	9.0 (6–12) [4–30] <i>p</i> = 0.454	8.0 (7.5–9) [4–12] <i>p</i> = 0.927	3.0 (1.75–4.25) [0–5] <i>p</i> = 0.001
отношение кол-ва клеток с аутофагосомами к кол- ву живых клеток ratio of the cells with autophagosomes to the number of living cells	0.060 (0.04–0.07) [0.02–0.1]	0.140 (0.06–0.18) [0.05–0.21] <i>p</i> = 0.046	0.070 (0.04–0.12) [0.034–0.2] <i>p</i> = 0.237	0.078 (0.054–0.09) [0.032–0.16] <i>p</i> = 0.204	0.036 (0.021–0.047) [0–0.073] <i>p</i> = 0.03
кол-во полиплоидных клеток number of polyploid cells	4.0 (3–7.5) [1–13]	5.0 (4.5–6.5) [4–8] <i>p</i> = 0.314	14.0 (10–15) [5–20] <i>p</i> < 0.01	8.0 (7.5–9) [4–12] <i>p</i> = 0.087	0.5 (0–2) [0–2] <i>p</i> = 0.001
отношение кол-ва полиплоидных клеток к кол-ву живых клеток ratio of the polyploid cells to the number of living cells	0.030 (0.02–0.05) [0.007–0.09]	0.040 (0.039–0.056) [0.036–0.06] <i>p</i> = 0.09	0.110 (0.085–0.139) [0.037–0.18] <i>p</i> < 0.01	0.078 (0.054–0.09) [0.032–0.115] <i>p</i> = 0.015	0.005 (0–0.023) [0–0.029] <i>p</i> = 0.009

Примечание: полужирным шрифтом выделены значения, имеющие статистически значимые отличия от контроля.

Значимость различий между группами определяли при помощи критерия Манна–Уитни (U/Z-критерий) с вычислением медианы, 25 и 75 перцентиля, максимума и минимума. При данном методе отличия медиан определяются при $Z \geq 1.96$ на уровне значимости $p < 0.05$ (с вероятностью более 95%).

Note: Values with statistically significant differences from the control are highlighted in bold. The significance of differences between groups was determined using the Mann–Whitney test (U/Z test) with calculation of the median, 25th and 75th percentiles, maximum and minimum. With this method, differences in medians are determined at $Z \geq 1.96$ at a significance level of $p < 0.05$ (with a probability of more than 95%).

на апоптотические тельца, под действием экстракта от 0.9 до 3.6 мг/мл через 24 ч было не на много выше, чем в контроле, что свидетельствует о слабой апоптотической активности экстракта в отношении клеток A498 (табл. 2).

Исследование аутофагосомной активности в отношении клеток A498 через 24 ч. Для данной культуры клеток характерно наличие фагоцитарной активности даже без видимого воздействия. Так, в проведенном ранее *in silico* исследовании транскрипционного профиля линии A498 была установлена повышенная активность генов аутофагии [22]. По-видимому, возникновение аутофагосом способствует опухолевым

клеткам поддерживать свою жизнеспособность, что позволяет говорить о цитопротекторной аутофагии. Количество клеток с аутофагосомами под действием экстракта через 24 ч снижалось при концентрации экстракта 7.2 мг/мл (табл. 2), что свидетельствует о способности экстракта при повышении концентрации препятствовать восстановлению клетки за счет цитопротекторной аутофагии.

Исследование активности, приводящей к митотической катастрофе, в отношении клеток A498 через 24 ч. Количество полиплоидных клеток и их отношение к общему количеству живых клеток при концентрации 7.2 мг/мл через

24 ч уменьшалось по сравнению с контролем (табл. 2), что свидетельствует об отсутствии способности экстракта вызывать гибель клеток митотической катастрофой.

Состояние клеточной культуры рака почки человека A498 через 48 ч в контроле. Клетки имели полигональную форму. Мертвые клетки в контроле были единичны. Общее количество клеток в поле зрения, количество мертвых и живых клеток заметно снижалось к 48 ч (табл. 3). Появлялись единичные клетки, распавшиеся на апоптотические тельца. Увеличивалось количество полиплоидных клеток.

Исследование цитотоксической активности в отношении клеток A498 через 48 ч. Количество мертвых клеток при всех концентрациях экстракта не отличалось от контроля (табл. 3). При концентрациях 0.9 и 1.8 мг/мл наблюдали тенденцию к снижению количества мертвых клеток по сравнению с уровнем через 24 ч (табл. 4), что свидетельствует о снижении цитотоксической активности экстракта на вторые сутки.

Исследование цитостатической активности в отношении клеток A498 через 48 ч. Общее количество опухолевых клеток в поле зрения при всех концентрациях экстракта по сравнению с контролем было заметно снижено (табл. 3), что на фоне отсутствия увеличения количества мертвых клеток свидетельствует о выраженной цитостатической активности экстракта на вторые сутки. Количество живых клеток было снижено на фоне экстракта в концентрациях 0.9 и 1.8 мг/мл. Через 48 ч наблюдали сходную тенденцию снижения общего количества клеток в поле зрения и количества живых клеток по сравнению с их уровнем через 24 ч (табл. 4), что также свидетельствует о выраженной цитостатической активности экстракта на вторые сутки.

Анализ апоптотической активности в отношении клеток A498 через 48 ч. Выявлено отсутствие апоптотической активности экстракта в отношении клеток A498 (табл. 3).

Анализ аутофагосомной активности в отношении клеток A498 через 48 ч. Количество клеток с аутофагосомами снижалось при концентрациях экстракта 0.9 и 1.8 мг/мл (табл. 3, 4), что свидетельствует о способности экстракта *H. arenarium* подавлять образование аутофагосом через 48 ч.

В результате ко вторым суткам у экстракта оставалась только выраженная способность к цитостатической активности в отношении клеток A498.

Таким образом, противоопухолевая активность экстракта *H. arenarium* реализуется через цитотоксическую, цитостатическую активности и снижение к способности опухолевых клеток образовывать аутофагосомы. В первые 24 ч воздействия на клетки рака почки человека A498 противоопухолевая активность экстракта *H. arenarium* реализуется через цитотоксическую, цитостатическую активность и снижение к способности образовывать аутофагосомы. В то время, как через 48 ч у экстракта остается только цитостатическая активность.

Полученные нами данные могут свидетельствовать о перспективности углубленного изучения молекулярных механизмов противоопухолевого, в том числе и апоптотического действия экстракта цветков *H. arenarium*, а также перспективности исследований и фитопрепарата из цветков бессмертника песчаного «Фламин» в отношении опухолевых клеток, так как сумма флавоноидов в нем в пересчете на изосалипурпозид и сухое вещество достигает 60% [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В цветках бессмертника песчаного *Helichrysum arenarium* (L.) Moench обнаружены следующие флавоноиды: налингин и его растворимый агрегат, прунин, кверцетин, апигенин и нарингенин, а также 5-О-глюкозид апигенина и изосалипурпозид. Нами в экспериментах *in vitro* выявлена противоопухолевая активность флавоноидсодержащего экстракта *H. arenarium* в отношении клеток семи линий 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, карциномы почки A498. Так, более 11% клеток, погибших апоптозом, наблюдали при действии экстракта *H. arenarium* в концентрации 0.9 мг/мл на четырех культурах опухолевых клеток человека: карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, аденокарциномы молочной железы MCF-7. В эксперименте с anti-caspase-3-FITC (BD) получен выраженный сигнал – 10.1% положительных клеток, установлено, что под действием

Таблица 3. Воздействие экстракта *Helichrysum arenarium* в разных концентрациях на клетки рака почки человека А498 через 48 ч

Table 3. Effect of *Helichrysum arenarium* extract in different concentrations on human renal cell carcinoma A498 cells after 48 h of treatment

Группа Group Показатели (в поле зрения) Indicators (in the field of view)	Контроль control Median (Q1–Q3) [min–max]	Концентрации экстракта, мг/мл Extract concentrations, mg/mL	
		0.9 Median (Q1–Q3) [min–max]	1.8 Median (Q1–Q3) [min–max]
форма клеток cell shape	вытянутая elongated	круглая round	круглая round
общее кол-во клеток total number of cells	82.0 (63–102.5) [54–140]	40.0 (33.25–44.75) [28–67] <i>p < 0.01</i>	36.0 (32.25–40.75) [29–45] <i>p < 0.01</i>
кол-во мертвых клеток number of dead cells	1.0 (0–3) [0–10]	1.0 (0.25–1.75) [0–3] <i>p = 0.786</i>	1.0 (1–2.75) [0–6] <i>p = 0.648</i>
отношение кол-ва мертвых клеток к общему кол-ву клеток ratio of the dead cells to the total number of cells	0.010 (0–0.03) [0–10]	0.026 (0.0047–0.0425) [0–0.0625] <i>p = 0.394</i>	0.027 (0.0223–0.0765) [0–0.1875] <i>p = 0.125</i>
кол-во живых клеток number of living cells	79.0 (62–98.5) [54–132]	39.5 (33.25–43.5) [27–64] <i>p < 0.01</i>	33.5 (32.25–38.75) [26–44] <i>p < 0.01</i>
отношение кол-ва живых клеток к общему кол-ву клеток ratio of the living cells to the total number of cells	0.990 (0.97–1) [0.91–1]	0.974 (0.9575–0.9953) [0.9375–1] <i>p = 0.394</i>	0.973 (0.9235–0.9777) [0.8125–1] <i>p = 0.125</i>
кол-во делящихся клеток number of dividing cells	2.0 (2–2.5) [1–3]	1.0 (1–1.75) [0–2] <i>p = 0.002</i>	1.0 (1–2) [0–2] <i>p = 0.018</i>
отношение кол-ва делящихся клеток к кол-ву живых клеток ratio of the dividing cells to the number of living cells	0.024 (0.0185–0.0352) [0.0152–0.0423]	0.030 (0.0204–0.0434) [0–0.0714] <i>p = 0.407</i>	0.038 (0.0305–0.0462) [0–0.0606] <i>p = 0.03</i>
кол-во клеток с серпами number of sickle cells	2.0 (1.5–3) [0–6]	1.0 (0–1.75) [0–5] <i>p = 0.02</i>	0.0 (0–0) [0–1] <i>p < 0.01</i>
кол-во клеток с пикнозом number of pyknotic cells	4.0 (3–5) [3–12]	4.5 (4–5.75) [3–6] <i>p = 0.575</i>	4.0 (2.25–5) [2–8] <i>p = 0.495</i>
отношение кол-ва клеток с пикнозом к кол-ву живых ratio of pyknotic cells to the number of living cells	0.047 (0.404–0.0644) [0.0303–0.2]	0.119 (0.083–0.1438) [0.0667–0.2143] <i>p < 0.01</i>	0.104 (0.0696–0.1731) [0.05–0.3077] <i>p = 0.007</i>
кол-во клеток с апоптотическими тельцами number of cells with apoptotic bodies	1.0 (0–9) [0–21]	3.5 (1–6.75) [0–12] <i>p = 0.551</i>	1.5 (1–3.5) [0–5] <i>p = 0.713</i>
кол-во клеток с аутофагосомами number of cells with autophagosomes	7.0 (6–8.5) [6–16]	4.0 (3–6) [2–8] <i>p < 0.01</i>	5.0 (4–8.5) [3–12] <i>p = 0.065</i>
отношение кол-ва клеток с аутофагосомами к кол-ву живых клеток ratio of the cells with autophagosomes to the number of living cells	0.083 (0.0703–0.1417) [0.0577–0.2679]	0.117 (0.0719–0.1541) [0.0469–0.2424] <i>p = 0.631</i>	0.140 (0.1175–0.2466) [0.1111–0.3125] <i>p = 0.015</i>
кол-во полиплоидных клеток number of polyploid cells	10.0 (5.5–11) [3–19]	2.0 (0–2.75) [0–9] <i>p < 0.01</i>	1.5 (0–2.75) [0–6] <i>p < 0.01</i>

Примечание: полужирным шрифтом выделены значения, имеющие статистически значимые отличия от контроля при *p < 0.05*.
Note: values that have statistically significant differences from the control at *p < 0.05* are highlighted in bold.

Таблица 4. Сравнение действия экстракта *Helichrysum arenarium* в концентрациях 0.9 и 1.8 мг/мл на клетки рака почки человека A498 через 24 ч и 48 ч

Table 4. Comparison of the effect of *Helichrysum arenarium* extract in concentrations of 0.9 and 1.8 mg/ml on human renal cell carcinoma A498 cells after 24 h and 48 h of treatment

Группа Group	Контроль через 24 ч Control after 24 h Median (Q1–Q3) [min–max]	Контроль через 48 ч Control after 48 h Median (Q1–Q3) [min–max]	Экстракт 0.9 мг/мл через 24 ч Extract 0.9 after 24 h Median (Q1–Q3) [min–max]	Экстракт 0.9 мг/мл через 48 ч Extract 0.9 after 48 h Median (Q1–Q3) [min–max]	Экстракт 1.8 мг/мл через 24 ч Extract 1.8 after 24 h Median (Q1–Q3) [min–max]	Экстракт 1.8 мг/мл через 48 ч Extract 1.8 after 48 h Median (Q1–Q3) [min–max]
Показатели (в поле зрения) Indicators (in the field of view)						
общее кол-во клеток total number of	138.0 (125–162.75) [106–192]	82.0 (63–102.5) [54–140] <i>p < 0.01</i>	128.0 (119.5–133) [114–155]	40.0 (33.25–44.75) [28–67] <i>p < 0.01</i>	120.0 (112–150) [109–173]	36.0 (32.25–40.75) [29–45] <i>p < 0.01</i>
КОЛ-ВО мертвых клеток number of dead cells	4.0 (2.25–8) [0–21]	1.0 (0–3) [0–10] <i>p = 0.022</i>	9.0 (7–11.5) [5–34]	1.0 (0.25–1.75) [0–3] <i>p < 0.01</i>	10.0 (7–13) [3–17]	1.0 (1–2.75) [0–6] <i>p < 0.01</i>
КОЛ-ВО живых клеток number of living cells	134.5 (119.5–150.5) [103–177]	79.0 (62–98.5) [54–132] <i>p < 0.01</i>	110.0 (106.5–124) [100–146]	39.5 (33.25–43.5) [27–64] <i>p < 0.01</i>	113.0 (101–144) [99–163]	33.5 (32.25–38.75) [26–44] <i>p < 0.01</i>
отношение кол- ва живых клеток к общему кол-ву клеток ratio of the living cells to the total number of cells	0.970 (0.93–0.98) [0.87–1]	0.990 (0.97–1) [0.91–1] <i>p = 0.148</i>	0.940 (0.9–0.94) [0.75–0.96]	0.974 (0.9575–0.9953) [0.9375–1] <i>p < 0.01</i>	0.900 (0.89–0.94) [0.86–0.97]	0.973 (0.9235–0.9777) [0.8125–1] <i>p = 0.22</i>
КОЛ-ВО делящихся клеток number of dividing cells	2.0 (1.25–2.75) [0–4]	2.0 (2–2.5) [1–3] <i>p = 0.938</i>	1.0 (0.5–2.5) [0–3]	1.0 (1–1.75) [0–2] <i>p = 0.581</i>	2.0 (1–2) [0–3]	1.0 (1–2) [0–2] <i>p = 0.403</i>
КОЛ-ВО клеток с серпами number of sickle cells	1.0 (1–2) [0–4]	2.0 (1.5–3) [0–6] <i>p = 0.092</i>	0.0 (0–1.5) [0–2]	1.0 (0–1.75) [0–5] <i>p = 0.576</i>	0.0 (0–1) [0–2]	0.0 (0–0) [0–1] <i>p = 0.229</i>
КОЛ-ВО клеток с пикнозом number of pyknotic cells	4.5 (3.25–5.75) [2–7]	4.0 (3–5) [3–12] <i>p = 0.912</i>	5.0 (4.5–6.5) [3–8]	4.5 (4–5.75) [3–6] <i>p = 0.301</i>	4.0 (2–4) [2–8]	4.0 (2.25–5) [2–8] <i>p = 0.615</i>
КОЛ-ВО клеток с апоптотическими тельцами number of cells with apoptotic bodies	0.0 (0–0) [0–1]	1.0 (0–9) [0–21] <i>p = 0.001</i>	1.0 (0.5–1) [0–2]	3.5 (1–6.75) [0–12] <i>p = 0.019</i>	0.0 (0–1) [0–2]	1.5 (1–3.5) [0–5] <i>p = 0.074</i>
КОЛ-ВО клеток с аутофагосомами number of cells with autophagosomes	8.0 (5–10.75) [3–14]	7.0 (6–8.5) [6–16] <i>p = 0.662</i>	18.0 (7–20) [6–23]	4.0 (3–6) [2–8] <i>p = 0.002</i>	9.0 (6–12) [4–30]	5.0 (4–8.5) [3–12] <i>p = 0.092</i>
КОЛ-ВО полиплоидных клеток number of polyploid cells	4.0 (3–7.5) [1–13]	10.0 (5.5–11) [3–19] <i>p = 0.006</i>	5.0 (4.5–6.5) [4–8]	2.0 (0–2.75) [0–9] <i>p = 0.005</i>	14.0 (10–15) [5–20]	1.5 (0–2.75) [0–6] <i>p < 0.01</i>

Примечание: полужирным шрифтом выделены значения, имеющие статистически значимые отличия от контроля при *p < 0.05*.
Note: values that have statistically significant differences from the control at *p < 0.05* are highlighted in bold.

экстракта *H. arenarium* в опухолевой линии Jurkat апоптоз каспазо-зависимый и его индукция осуществляется через каспазу-3.

В первые 24 ч воздействия на клетки рака почки человека А498 противоопухолевая активность экстракта *H. arenarium* реализуется через цитотоксическую, цитостатическую активность, и снижение к способности образовывать аутофагосомы; а через 48 ч у экстракта *H. arenarium* остается только цитостатическая активность. Наиболее активен экстракт в концентрации 7.2 мг/мл.

Перспективно дальнейшее углубленное изучение молекулярных механизмов

противоопухолевого воздействия экстракта *H. arenarium*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично финансирована грантом ССМУ-2021-003 «Оценка эффективности противоопухолевого воздействия и индукции апоптоза в опухолевых клетках растительными экстрактами и БАДами в низких концентрациях».

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

В экспериментах животные и люди не участвовали.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корман Д. Б. 2006. Основы противоопухолевой химиотерапии. М.: Практическая медицина. 503 с.
2. Наволокин Н. А., Маслякова Г. Н., Полуконова Н. В., Мудрак Д. А., Бучарская А. Б. 2019. Экспрессия маркеров апоптоза и аутофагии в перевитом раке почке у крыс при введении флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного *Gratiola officinalis* L. — Архив патологии. 81(1): 24. <https://doi.org/10.17116/patol20198101124>
3. Полуконова Н. В., Наволокин Н. А., Мудрак Д. А., Полуконова А. В., Бучарская А. Б., Маслякова Г. Н. Средство, обладающее избирательным действием на опухолевые клетки, активирующее их апоптоз и препятствующее формированию их резистентности. Пат. RU 2694547 С1, 16.07.2019. Заявка № 2018105419 от 13.02.2018. Опубл. 16.07.2019. Бюл. №20. <https://elibrary.ru/oyrhyz>
4. Полуконова Н. В., Наволокин Н. А., Мудрак Д. А., Полуконова А. В., Маслякова Г. Н. Способ определения минимальной эффективной концентрации противоопухолевого лекарственного средства, ингибирующего цитопротекторную аутофагию *in vitro*. Пат. RU 2693829 С1, 05.07.2019. Заявка № 2018105465 от 13.02.2018. Опубл.: 05.07.2019. Бюл. № 19. <https://elibrary.ru/kkfoxo>
5. Маслякова Г. Н., Полуконова Н. В., Наволокин Н. А., Мудрак Д. А., Полуконова А. В., Бучарская А. Б. Средство, вызывающее в экспериментах *in vivo* замещение опухолевой ткани соединительной и переводящее клетки опухоли из фазы G1 клеточного цикла в состояние покоя G0. Пат. RU 2731105 С2, 28.08.2020. Заявка № 2018115319 от 25.04.2018. Опубл.: 28.08.2020. Бюл. № 25. <https://elibrary.ru/cpjkvx>
6. Мыльников А. М., Полуконова Н. В., Исаев Д. С., Дорошенко А. А., Верховский Р. А., Николаева Н. А., Мудрак Д. А., Наволокин Н. А. 2020. Выявление путей гибели клеток карциномы почки человека А498 под действием экстракта аврана лекарственного и флавоноидов зеленого чая с помощью флуоресцентных методов визуализации. — Оптика и спектроскопия. 128(7): 964–971. <https://doi.org/10.21883/OS.2020.07.49569.72-20>
7. Polukonova N. V., Baryshnikova M. A., Khochankov D. A., Stepanova E. V., Solomko E. S., Polukonova A. V., Mudrak D. A., Mylnikov A. M., Bucharskaya A. B., Maslyakova G. N., Navolokin N. A. 2021. Activation of apoptosis and autophagy by *Gratiola officinalis* extract in human tumor cell lines. — J. Biomed. Photonics Eng. 7(4): 040307. <https://doi.org/10.18287/JBPE21.07.040307>
8. Navolokin N. A., Mudrak D. A., Bucharskaya A. B., Polukonova N. V., Maslyakova G. N. 2022. Pathomorphosis and mechanisms of death of tumor cells in cell cultures and inoculated tumors under the influence of drug hedge hyssop extract. — Cardiometry. 24: 41–42. <https://cardiometry.net/issues/no24-november-2022/conference>
9. Polukonova N. V., Demin A. G., Polukonova A. V. 2023. Components of antitumor extract of *Gratiola officinalis* lead to tumor cell death by apoptosis due to negative regulation of MCL-1 protein. — Cardiometry. 29: 28. <https://doi.org/10.18137/cardiometry.2023.29.conf.20>

10. Полуконова Н. В., Полуконова А. В., Демин А. Г. 2022. Молекулярный механизм повышения чувствительности клеток рака почки человека А498 к апоптозу под действием экстракта аврана лекарственного. — Успехи молекулярной онкологии. 9(С4): 129.
<https://umo.abvpress.ru/jour/article/view/472>
11. Полуконова Н. В., Демин А. Г., Полуконова А. В., Наволокин Н. А. 2022. Молекулярно-генетическое обоснование преодоления резистентности клеток карциномы почки человека А498 под действием экстракта аврана лекарственного. — Успехи молекулярной онкологии. 9(С4): 128.
<https://umo.abvpress.ru/jour/article/view/472>
12. Куркин В. А. 2007. Фармакогнозия: учебник для фармацевтических вузов (факультетов). Самара. 1239 с.
13. Гринев В. С., Широков А. А., Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Курчатова М. Н., Дурнова Н. А., Бучарская А. Б., Маслякова Г. Н. 2015. Полифенольные соединения новой биологически активной композиции из цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.). — Химия растительного сырья. 2: 177–185.
<https://elibrary.ru/szponp>
14. Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Мудрак Д. А., Афанасьева Г. А., Тычина С. А., Маслякова Г. Н., Бучарская А. Б., Корчаков Н. В. Средство, обладающее антикахексическим, противоопухолевым свойствами и снижающее уровень эндогенной интоксикации. Пат. RU 2601406 С1, 10.11.2016. Заявка № 2015149423/15 от 17.11.2015. Опубл.: 10.11.2016. Бюл. № 31.
<https://elibrary.ru/etvlsc>
15. Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Маслякова Г. Н., Скворцова В. В., Байтман Т. П., Бучарская А. Б., Дурнова Н. А. 2013. Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды. — Российский биотерапевтический журнал. 12(2): 59–59а.
16. 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. 2019. Преимущества и возможности флуоресцентных методов для визуализации апоптоза и аутофагии в опухолевых клетках человека *in vitro*. — Оптика и спектроскопия. 126(6): 771–780.
<https://doi.org/10.21883/OS.2019.06.47772.52-19>
17. Скворцова В. В., Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Манаенкова Е. В., Панкратова Л. Э., Курчатова М. А., Маслякова Г. Н., Дурнова Н. А. 2015. Противотуберкулезная активность экстракта бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium*) *in vitro*. — Экспериментальная и клиническая фармакология. 78(2): 30–33.
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2015-78-2-30-33>
18. Наволокин Н. А., Мудрак Д. А., Матвеева О. В., Тычина С. А., Бучарская А. Б., Полуконова Н. В., Маслякова Г. Н. 2015. Влияние растительных экстрактов, содержащих флавоноиды, на лейкоцитарную формулу и красный костный мозг лабораторных крыс с перевитой саркомой 45. — Успехи современного естествознания. 4: 134–140.
<https://elibrary.ru/udzgrn>
19. Наволокин Н. А., Мудрак Д. А., Полуконова Н. В., Тычина С. А., Канаева Т. В., Бучарская А. Б., Маслякова Г. Н. 2016. Антикахексическая и противоопухолевая активность флавоноидсодержащего экстракта бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium*) при пероральном введении крысам с перевитой саркомой-45. — Злокачественные опухоли. 4S1(21): 329–330.
<https://elibrary.ru/zczvab>
20. Полуконова Н. В., Наволокин Н. А., Дурнова Н. А., Маслякова Г. Н., Бучарская А. Б. 2012. Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью. Пат. RU 2482863 С1, 27.05.2013. Заявка № 2012105384/15 от 15.02.2012. Опубл. 27.05.2013. Бюл. № 15.
<https://elibrary.ru/xvqjse>
21. Корсов А. В., Калинкина Н. М. 2003. Количественные методы экологической токсикологии: Учебно-методическое пособие. Петрозаводск. 56 с.
22. Демин А. Г., Полуконова А. В., Наволокин Н. А., Полуконова Н. В. 2019. *In silico* оценка уровня экспрессии генов, ассоциированных с путями клеточной гибели в клетках карциномы почки человека (линия А498). — В кн.: VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы. Сборник тезисов. С. 798.
<https://elibrary.ru/lrgpus>
23. Государственный реестр лекарственных средств
<https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>. (Данные по состоянию на: 11.12.2024).

Cytotoxic and Antiproliferative Activity of *Helichrysum Arenarium* (Asteraceae) Extract Against Tumor Cell Lines

© 2025. N. V. Polukonova¹, M. N. Kurchatova^{1,*}, N. A. Navolokin¹, M. A. Baryshnikova², A. M. Mylnikov¹, A. V. Polukonova¹, N. A. Durnova^{1,3}

¹Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia

²National Medical Research Center of Oncology named after N. N. Blokhin, Moscow, Russia

³I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

*email: kurchatova.marya@yandex.ru

Abstract. For the first time, the presence of cytotoxic and antiproliferative activity in the *Helichrysum arenarium* (L.) Moench extract and its ability to induce apoptosis in human tumor cell lines Jurkat, MCF-7, SK-BR-3, A549, PC-3, HCT-116, A498 was revealed. After 24 hours of incubation in the extract (0.9 mg/ml), cells in early apoptosis (from 36.1% in the A549 line to 49.2% in the HCT-116 line) and late apoptosis (from 11.7% in the HCT-116 line to 37.7% in the MCF-7 line) were detected. Different cell lines exhibit different sensitivity response: early apoptosis predominated in some, while late apoptosis or even complete cell destruction prevailed in others. Under the effect of *H. arenarium* extract, caspase-dependent apoptosis which is induced through caspase-3, was established in the Jurkat line. More than 11% of cells killed by apoptosis were observed in cell lines A549, PC-3, HCT-116, and MCF-7 when incubated in 0.9 mg/mL extract. The extract of *H. arenarium* showed maximum activity on A498 cells at a semi-lethal concentration of 7.2 mg/mL: in the first 24 h of exposure, cytotoxic and cytostatic activity, and a decrease in the cell's ability to cytoprotective autophagy were detected; after 48 h the extract retained only cytostatic activity.

Keywords: T-cell lymphoblastic leukemia Jurkat, breast adenocarcinoma MCF-7, SK-BR-3, lung carcinoma A549, prostate carcinoma PC-3, colon carcinoma HCT-116, renal carcinoma A498

REFERENCES

1. Korman D. B. 2006. [Fundamentals of anticancer chemotherapy]. Moscow. 503 p. (In Russian)
2. Navolokin N. A., Maslyakova G. N., Polukonova N. V., Mudrak D. A., Bucharskaya A. B. 2019. The expression of apoptosis and autophagy markers in transplantable rat kidney cancer with the administration of flavonoid-containing hedge hyssop (*Gratiola officinalis* L.) extract. — Archive of Pathology. 81(1): 24. <https://doi.org/10.17116/patol20198101124> (In Russian)
3. Polukonova N. V., Navolokin N. A., Mudrak D. A., Polukonova A. V., Bucharskaya A. B., Maslyakova G. N. 2019. Agent having sensitive action on tumor cells, activating apoptosis thereof and preventing formation of resistance thereof. Patent of invention RU 2694547 C1, Application № 2018105419 of 13.02.2018. Publ. 16.07.2019. Bull №20. <https://elibrary.ru/oyrhyz> (In Russian)
4. Polukonova N. V., Navolokin N. A., Mudrak D. A., Polukonova A. V., Maslyakova G. N. 2019. Method for determining minimum effective concentration of antitumor drug which inhibits cytoprotective autophagy *in vitro*. Patent of invention RU 2693829 C1, 05.07.2019. Application № 2018105465 of 13.02.2018. Publ. 05.07.2019. Bull. №19 <https://elibrary.ru/kkfoxo> (In Russian)
5. Maslyakova G. N., Polukonova N. V., Navolokin N. A., Mudrak D. A., Polukonova A. V., Bucharskaya A. B. 2020. Agent causing in *in vivo* experiments substitution of tumor tissue with connective tissue and transferring tumor cells from G1 phase of cell cycle into rest state G0. Patent of invention 2731105 C2, 28.08.2020. Application № 2018115319 of 25.04.2018. Publ.: 28.08.2020. Bull. № 25. <https://elibrary.ru/cpjkvx> (In Russian)
6. Mylnikov A. M., Polukonova N. V., Isaev D. S., Doroshenko A. A., Verkhovskii R. A., Nikolaeva N. A., Mudrak D. A., Navolokin N. A. 2020. Identification of pathways of A498 human kidney carcinoma cell death under the action of *Gratiola officinalis* L. extract and green tea flavonoids using fluorescence imaging techniques. — Opt. Spectrosc. 128(7): 972–979. <https://doi.org/10.1134/S0030400X20070139>

7. Polukonova N. V., Baryshnikova M. A., Khochankov D. A., Stepanova E. V., Solomko E. S., Polukonova A. V., Mudrak D. A., Mylnikov A. M., Bucharskaya A. B., Maslyakova G. N., Navolokin N. A. 2021. Activation of apoptosis and autophagy by *Gratiola officinalis* extract in human tumor cell lines. — J. Biomed. Photonics Eng. 7(4): 040307. <https://doi.org/10.18287/JBPE21.07.040307>
8. Navolokin N. A., Mudrak D. A., Bucharskaya A. B., Polukonova N. V., Maslyakova G. N. 2022. Pathomorphosis and mechanisms of death of tumor cells in cell cultures and inoculated tumors under the influence of drug hedge hyssop extract. — Cardiometry. 24: 41–42. <https://cardiometry.net/issues/no24-november-2022/conference>
9. Polukonova N. V., Demin A. G., Polukonova A. V. 2023. Components of antitumor extract of *Gratiola officinalis* lead to tumor cell death by apoptosis due to negative regulation of MCL-1 protein. — Cardiometry. 29: 28. <https://doi.org/10.18137/cardiometry.2023.29.conf.20>
10. Polukonova N. V., Polukonova A. V., Demin A. G. 2022. [Molecular mechanism of increasing the sensitivity of human renal cell carcinoma A498 cells to apoptosis under the action of *Gratiola officinalis* extract]. — Advances in Molecular Oncology. 9(S4): 129. <https://umo.abvpress.ru/jour/article/view/472> (In Russian)
11. Polukonova N. V., Demin A. G., Polukonova A. V., Navolokin N. A. 2022. [Molecular and genetic substantiation of overcoming resistance of human renal cell carcinoma A498 cells under the action of *Gratiola officinalis* extract]. — Advances in Molecular Oncology. 9(S4): 128. <https://umo.abvpress.ru/jour/article/view/472> (In Russian)
12. Kurkin V. A. 2007. [Pharmacognosy. Pharmaceutical university coursebook]. Samara. 1239 p. (In Russian)
13. Grinev V. S., Shirokov A. A., Navolokin N. A., Polukonova N. V., Kurchatova M. N., Durnova N. A., Bucharskaya A. B., Maslyakova G. N. 2016. Polyphenolic compounds of a new biologically active extract from immortelle sandy flowers (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.). — Russ. J. Bioorg. Chem. 42(7): 770–776. <https://doi.org/10.1134/S1068162016070086>
14. Navolokin N. A., Polukonova N. V., Mudrak D. A., Afanaseva G. A., Tychina S. A., Maslyakova G. N., Bucharskaya A. B., Korchakov N. V. 2016. Agent possessing anti-cachexic, anti-tumor properties and reducing endogenous intoxication level. Patent of invention RU 2601406 C1, 10.11.2016. Application № 2015149423/15 of 17.11.2015. Publ.: 10.11.2016. Bull. № 31. <https://elibrary.ru/etvlsc> (In Russian)
15. Navolokin N. A., Polukonova N. V., Maslyakova G. N., Skvorcov V. V., Bajtman T. P., Bucharskaya A. B., Durnova N. A. 2013. [Anti-tumor activity of plant extracts containing bioflavonoids]. — Russ. J. Biother. 12(2): 59–59a. <https://elibrary.ru/qazrzl> (In Russian)
16. Navolokin N. A., Polukonova N. V., Mudrak D. A., Myl'nikov A. M., Baryshnikova M. A., Khochenkov D. A., Bucharskaya A. B., Polukonova A. V., Maslyakova G. N., 2019. Advantages and possibilities of fluorescence-based methods for the visualization of apoptosis and autophagy in human tumor cells in vitro. — Opt. Spectrosc. 126(6): 693–702. <https://doi.org/10.1134/S0030400X19060171>
17. Skvortsova V. V., Navolokin N. A., Polukonova N. V., Manaenkova E. V., Pankratova L. E., Kurchatova M. N., Maslyakova G. N., Durnova N. A. 2015. Antituberculous *in vitro* activity of *Helichrysum arenarium* extract. — Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. 78(2): 30–33. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2015-78-2-30-33> (In Russian)
18. Navolokin N. A., Mudrak D. A., Matveeva O. V., Tychina S. A., Bucharskaya A. B., Polukonova N. V., Maslyakova G. N. 2015. Influence of plant extract containing flavonoids on the leucocyte formula and bone marrow of laboratory rats with transplanted sarcoma 45. — Advances in Current Natural Sciences. 4: 134–140. <https://elibrary.ru/udzgrn> (In Russian)
19. Navolokin N. A., Mudrak D. A., Polukonova N. V., Ty'china S. A., Kanaeva T. V., Bucharskaya A. B., Maslyakova G. N. 2016. [Anti-cachexic and anti-tumor activity of orally administered *Helichrysum arenarium* extract containing flavonoids in rats with transplanted sarcoma 45]. — Malignant Tumors. 4S1(21): 329–330. <https://elibrary.ru/zczvab> (In Russian)
20. Polukonova N. V., Navolokin N. A., Durnova N. A., Maslyakova G. N., Bucharskaya A. B. 2012. Method for preparing dry extract of herbal raw material possessing biological activity. Patent of invention RU 2482863 C1, 27.05.2013. Appl. № 2012105384/15 of 15.02.2012. Publ. 27.05.2013. Bull. № 15. <https://elibrary.ru/xvqjse>
21. Korosov A. V., Kalinkina N. M. 2003. [Qualitative methods of ecological toxicology, Textbook]. Petrozavodsk. 56p. (In Russian)

22. Demin A. G., Polukonova A. V., Navolokin N. A., Polukonova N. V. 2019. [In silico assessment of the gene expression associated with the cell death pathways in human renal cell carcinoma A498 cells]. — In: VII Congress of Vavilov Society of Genetics and Breeders (VSG&B) and Associate Symposiums. Book of abstracts. P. 798.
<https://elibrary.ru/Irpgus> (In Russian)
23. State Register of Medicines (GRLS).
<https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>. (Accessed 11.12.2024)