

На правах рукописи

Камалова Язгуль Насиковна

КАМАЛОВА ЯЗГУЛЬ НАСИКОВНА

**ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РАСТЕНИЙ
СЕМЕЙСТВА *ASPARAGACEAE***

03.01.04 – Биохимия
03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2020

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: **Карамова Назира Сунагатовна**
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Митькович Владимир Александрович** – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Кипенская Лариса Викторовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава РФ, г. Казань

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва", г. Саранск

Защита диссертации состоится **24 сентября 2020 г. в 14 ч** на заседании диссертационного совета КФУ.03.07 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»: <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «_» 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

О.А. Кравцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Одной из самых актуальных и приоритетных задач современной медицины является поиск новых альтернативных эффективных средств противоопухолевой терапии, так как ежегодно от онкологических заболеваний умирает более 9.6 миллиона человек [Ferlay *et al.*, 2019]. Необходимость создания и применения средств противоопухолевой терапии с различным механизмом действия обусловлена тем, что рак имеет множество нозологических форм, каждая из которых характеризуется собственными этиологическими (часто неизвестными) и клиническими особенностями.

Общепринятый подход к лечению рака в настоящее время основан на применении методов химио- и радиотерапии, но помимо основного терапевтического действия, данные методы имеют ряд нежелательных побочных эффектов на организм человека. Перспективным направлением онкотерапии является использование препаратов, полученных из натуральных продуктов микробного, животного [Garipov *et al.*, 2014] и растительного происхождения [Unnati *et al.*, 2013; Katz, Baltz, 2016; Kinghorn *et al.*, 2016; Agarwal *et al.*, 2019].

Лекарственные растения с давних времен являются частью традиционной народной медицины. В современном мире огромное число эффективных лекарственных препаратов также имеет растительное происхождение [Shoeb, 2006]. На сегодняшний день противоопухолевая активность выявлена у большинства групп химических соединений, входящих в состав растений [Kintzios, Barberaki, 2004].

Противоопухолевые агенты растительного происхождения проявляют различные механизмы действия, направленные на ингибирование всех стадий канцерогенеза: инициации, промоции и прогрессии. Эти агенты стимулируют репарацию ДНК, осуществляют нейтрализацию свободных радикалов и детоксикацию канцерогенов, а также принимают участие в подавлении пролиферации, индукции дифференцировки, повышении иммунитета, активации апоптоза и подавленииangiогенеза [Balunas, Kinghorn, 2005].

Целью настоящей работы стала характеристика противоопухолевой активности растений семейства *Asparagaceae*.

В работе решали следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать цитотокическое действие органических экстрактов пяти видов растений семейства *Asparagaceae* в отношении линий опухолевых клеток: adenокарциномы легких человека A549, двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80, прямой кишки человека SW837, карциномы сигмовидной кишки человека COLO 320 и клеток нормального легочного эпителия LEC.
2. Определить потенциал сочетанного цитотокического действия экстрактов листвьев *Polianthes tuberosa* и *Yucca filamentosa* с РНКазой *Bacillus pumilus* и антрациклиновым антибиотиком доксорубицином по отношению к клеткам adenокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80.
3. Оценить антимиграционный эффект экстракта листвьев *Polianthes tuberosa* на клетки adenокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80.
4. Охарактеризовать влияние исследуемых растительных экстрактов на

жизнеспособность бактерий р. *Lactobacillus*.

5. Определить генотоксический потенциал экстрактов пяти видов растений семейства *Asparagaceae*.

6. Провести анализ состава органических экстрактов исследуемых растений.

Научная новизна. Показано, что водные растворы метанольных экстрактов листьев и луковиц *Polianthes tuberosa* и листьев *Yucca filamentosa* и *Furcraea gigantea* оказывают дозозависимое цитотоксическое действие на клетки adenокарциномы легкого человека A549, adenокарциномы прямой кишки SW837, adenокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu 80 и карциномы сигмовидной кишки человека COLO 320, проявляя меньшую токсичность по отношению к нормальным клеткам легкого эмбриона коровы LEC. Впервые охарактеризована антимиграционная активность экстракта листьев *Polianthes tuberosa* на клетках adenокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu 80. Получены приоритетные данные о цитотоксическом действии экстракта листьев *Polianthes tuberosa* и *Yucca filamentosa* в сочетании с другими противоопухолевыми агентами: РНКазой *Bacillus pumilus* и антрациклиновым антибиотиком доксорубицином на клетки adenокарциномы HuTu 80 и нормальные клетки легкого LEC. Впервые установлено, что исследованные экстракты пяти видов растений сем. *Asparagaceae* не подавляют жизнедеятельность бактерий р. *Lactobacillus*, выделенных из пробиотических препаратов и кишечника человека. Впервые показано отсутствие генотоксичности и мутагенности водных растворов метанольных экстрактов листьев и корневищ *S. cylindrica*, *S. trifasciata*, листьев и клубней *P. tuberosa*, листьев *Y. filamentosa* и *F. gigantea* в бактериальных тест-системах. Установлен состав экстрактивных веществ экстрактов пяти видов растений сем. *Asparagaceae*, которые, в основном, представлены фенольными, терпеноидными и стероидными соединениями. В экстрактах *Yucca filamentosa*, *Furcraea gigantea* преобладают стероидные сапонины в спиростаноловой форме.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, характеризующие избирательный цитотоксический эффект исследованных органических экстрактов растений сем. *Asparagaceae* в отношении четырех линий опухолевых клеток человека, количественный и качественный состав экстрактов, могут быть использованы при разработке новых лекарственных средств для онкотерапии, в особенности, опухолей кишечника. Важное теоретическое и практическое значение имеют приоритетные данные об эффективном синергетическом цитотоксическом действии экстракта листьев полиантеса клубненосного (*Polianthes tuberosa*) и юкки нитчатой (*Yucca filamentosa*) в сочетании с РНКазой *Bacillus pumilus* на клетки adenокарциномы HuTu 80, что открывает новые перспективы для создания схем мульти сочетанной терапии рака кишечника на основе природных агентов. Данные об отсутствии ДНК-повреждающей и мутагенной активности исследованных растительных экстрактов представляют собой первичную информацию об их безопасности для генетического материала клеток. Результаты и методы исследования могут быть использованы в образовательном процессе в рамках дисциплин «Генетическая токсикология и канцерогенез»,

«Генетическая токсикология», «Антимутагенез», «Биохимия», «Лекарственные растения» ИФМиБ КФУ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Для органических экстрактов листьев и луковиц полиантеса клубненосного (*Polianthes tuberosa*), листьев юкки нитчатой (*Yucca filamentosa*) и фуркреи гигантской (*Furcraea gigantea*) установлена дозозависимая цитотоксичность в отношении опухолевых клеток человека A549, SW837, HuTu 80 и COLO 320; для листьев полиантеса выявлен антимиграционный эффект на клетках HuTu 80.

2. Впервые охарактеризовано цитотоксическое действие экстракта листьев полиантеса клубненосного и юкки нитчатой в сочетании с РНКазой *Bacillus pumilus* или доксорубицином на клетки adenокарциномы HuTu 80. Установлено, что синергетический эффект преимущественно обнаруживается при сочетанном действии растительного экстракта и биназы в концентрациях полумаксимального ингибирования (IC_{50}).

3. Метанольные экстракты растений семейства *Asparagaceae* (*Sansevieria cylindrica*, *Sansevieria trifasciata*, *Polianthes tuberosa*, *Yucca filamentosa* и *Furcraea gigantea*), произрастающие на территории Египта, не обладают антимикробным эффектом в отношении пробиотической кишечной микрофлоры, а также генотоксическим потенциалом в бактериальных тест-системах.

4. Цитотоксичность метанольных экстрактов листьев полиантеса клубненосного в отношении клеток опухолей кишечника коррелирует с высоким содержанием в них фенольных и терпеноидных соединений, а экстрактов листьев юкки нитчатой и фуркреи гигантской – фенольных соединений и стероидных сапонинов в спиростаноловой форме.

Степень достоверности полученных результатов. Полученные данные многократных экспериментов представлены в виде статистически достоверных результатов, полученных с помощью стандартного пакета MS Excel и Statistica-7, а также подтверждаются публикациями полученных результатов работы в научных журналах, рецензируемых ведущими учеными в данной области.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на I Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2014), 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2015), Международной научной конференции «Трансляционная медицина, настоящее и будущее» (Казань, 2016), VII Международной конференции молодых ученых РМАПО «Шаг в завтра» (Москва, 2016), 20-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016), II Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2016), III Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2018), XII Всероссийской научной интернет-конференции "Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии" (Уфа, 2018), 2-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биохимия –

основа наук о Жизни» (Казань, 2019).

Связь работы с научными программами и личный вклад соискателя.

Исследования выполнены в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета, поддержаны исследовательским грантом РФФИ № 15-54-61024 (2015-2016) и грантом Фонда развития науки и технологий Египта (STDF) № 13821 (2015-2016). Автором проанализированы данные литературы, освоены методы работы, выполнены лабораторные эксперименты, проведены анализ и статистическая обработка полученных результатов, на их основе подготовлены к публикации статьи и тезисы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК (включая журналы, индексируемые WoS/Scopus), а также 11 тезисов.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.б.н., доценту Н. С. Карамовой за постановку проблемы и внимательное отношение к работе; академику Академии наук РТ, д.б.н., профессору кафедры микробиологии КФУ О. Н. Ильинской за обсуждение результатов диссертации; к.б.н., доценту П. В. Зеленихину за постоянную поддержку, помочь в освоении методов и обсуждение результатов; доктору Иссаму Абдул-Хафизу (университет г. Асют, Египет) за помочь в приготовлении растительных экстрактов; к.б.н., доценту Д. Р. Яруллиной за предоставление штаммов бактерий р. *Lactobacillus*; к.х.н., доценту кафедры пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «КНИТУ» В. Р. Хабибрахмановой за помочь в проведении экспериментов по исследованию состава растительных экстрактов и обсуждение результатов. Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам кафедры микробиологии Казанского федерального университета.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 161 странице машинописного текста, содержит 16 таблиц и 26 рисунков, включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список литературы (241 наименование), приложение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1 Используемые в экспериментальной работе материалы

Растительный материал

В работе использовали материал растений, принадлежащих семейству Спаржевых (*Asparagaceae*): листья и корневища сансевиерии цилиндрической и сансевиерии трехполосной (*Sansevieria cylindrica*, *Sansevieria trifasciata*), листья и луковицы полиантеса клубненосного (*Polianthes tuberosa*), листья юкки нитчатой (*Yucca filamentosa*) и фуркреи гигантской (*Furcraea gigantea*), произрастающих в разных регионах Египта. Все растения были определены до вида специалистами университета г. Асют, Египет. Растительный материал был собран в апреле 2014г. в Египте.

Противоопухолевые препараты. Для оценки сочетанного действия растительных экстрактов с противоопухолевыми агентами были использованы гуанил-специфичная РНКаза *Bacillus pumilus* 3-19 дикого типа (биназа), а также антрациклический антибиотик доксорубицин (Доксорубицин-РОНЦ®, Россия).

2. Использованные в работе культуры

Клеточные культуры и условия их культивирования.

Противоопухолевую активность растительных экстрактов оценивали на линиях клеток легкого эмбриона коровы LEC (Коллекция культур клеток позвоночных, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург), adenокарциномы легких человека A549, adenокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80, карциномы сигмовидной кишки человека COLO 320, adenокарциномы прямой кишки человека SW837 (ATCC, Роквилл, США). Для культивирования клеточных линий A549 и COLO 320 применяли среду RPMI-1640, для клеток HuTu 80 и LEC использовали среду DMEM. Питательные среды содержали 10% эмбриональной сыворотки телят (США), 2мМ глутамина и 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина. Для выращивания клеток SW837 использовали аналогичную среду DMEM с добавлением 2% незаменимых аминокислот («ПанЭко»). Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Тестерные бактерии и условия культивирования. Штаммы *Escherichia coli* WP2 и recA⁻, *Salmonella typhimurium* TA100 и TA98 инкубировали в 5 мл среды Лурия Бертани (LB) при температуре 37°C в течение 18 часов с аэрацией. Штаммы *Lactobacillus fermentum* Ga, *L. plantarum* Na, *L. plantarum* RiaF-8, выделенные из пробиотических препаратов «Гастрофарм», «Наринэ», «РиоФлора Баланс Нео», соответственно, и *Lactobacillus sp.* HF-A4, *Lactobacillus sp.* HF-D1, *Lactobacillus sp.* HF-E1, выделенные из кишечника клинически здоровых людей, выращивали на среде MRS при температуре 37°C в течение 18 часов, разводили свежей питательной средой до плотности клеток 1.5×10^8 КОЕ/мл.

3. Растительные экстракты

Приготовление экстрактов. 200 г свежего растительного материала помещали в 2 литра 80% метанола и перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре. Полученную смесь гомогенизировали и фильтровали через бумажный фильтр в системе вакуумной фильтрации. Растворитель упаривали при пониженном давлении на роторном испарителе (Hidolph VV2000, Нидерланды). Высушенные экстракты хранили при -18°C. Исходные водные растворы экстрактов готовили в концентрации 20 мг/мл. Условные обозначения экстрактов, используемые в тексте: листья *S. cylindrica* – Scl, корневище *S. cylindrica* – Scr, листья *P. tuberosa* – Ptl, луковицы *P. tuberosa* – Pt_b, листья *S. trifasciata* – Stl, корневище *S. trifasciata* – Str, листья *Y. filamentosa* – Yfl, листья *F. gigantea* – Fgl.

4. Оценка жизнеспособности клеточных культур

Оценка цитотоксичности растительных экстрактов методом проточной цитометрии. В работе с клеточными культурами руководствовались правилами, описанными Freshney [Freshney, 1993]. Клетки засевали в соответствующие питательные среды в 48-луночные планшеты с начальной

плотностью 1×10^5 клеток/лунку, по достижении монослоем клеток 50-70% конфлюэнтности, инкубировали клетки в течение 4 ч в среде с добавлением растительных экстрактов в концентрациях 100 и 300 мкг/мл. В качестве негативного контроля использовали необработанные клетки. Если экстракты проявляли повышенную цитотоксичность, дополнительно проверяли концентрации 10, 25, 50 мкг/мл. После инкубирования проницаемость ЦПМ определяли с помощью красителя йодида пропидия (PI) [Crowley *et al.*, 2016]. Клетки в стадии некроза фиксировали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США). В каждом измерении анализировали 10 тысяч клеток. Обработку результатов проводили с помощью программы FACSDiva Software (BD).

Колориметрическое определение выживаемости клеток в МТТ-тесте. Клетки пяти линий культивировали в средах с добавлением экстрактов: *Scl*, *Scr*, *Stl*, *Str* с концентрацией 100-2000 мкг/мл; для *Ptl*, *Ptb*, *Yfl*, *Fgl* – 10-1500 мкг/мл в течение 24 ч. В качестве негативного контроля служили клетки, необработанные исследуемыми растительными экстрактами. Затем вносили по 10 мкл раствора МТТ (Sigma-Aldrich, США, 5 мг/мл) и 90 мкл полной среды, для растворения кристаллов формазана использовали диметилсульфоксид. Оптическую плотность измеряли с помощью сканирующего спектрофотометра (BioRad, США) при $\lambda=570$ нм [Mosmann, 1983]. За 100% принимали жизнеспособность клеток в негативном контроле. Концентрацию полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток (IC_{50}) определяли с помощью IC_{50} -калькулятора (<https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator/>).

5. Оценка сочетанного действия растительных экстрактов и биназы/доксорубицина на опухолевые клетки. Клетки NuTu 80 высевали в 96-луночные планшеты (10^4 клеток/лунка) и подвергали воздействию исследуемых факторов в течение 24 часов. Оценивали жизнеспособность клеток для моно- и комбинированных обработок исследуемыми факторами по методике, описанной Tsakalozou [Tsakalozou *et al.*, 2012]. Для интерпретации результатов по определению синергизма, аддитивности и антагонизма лекарственных средств использовали единую теорию, представленную Chou [Chou, 2006; Chou, 2008].

6. Анализ влияния растительных экстрактов на миграцию опухолевых клеток. В работе использован метод скрэтч-анализа и фазово-контрастной микроскопии [Yarrow *et al.*, 2004; Gotsulyak *et al.*, 2014]. В лунки вносили 10, 50 и 70 мкг/мл экстракта листьев *P. tuberosa*. В качестве контроля использовали клетки в лунках без добавления экстрактов. Изображения получали с использованием объектива 5x на фазово-контрастном микроскопе (Axio observer, Австрия). Микроскопические изображения предварительно обрабатывали в графическом редакторе Paint для достижения максимального контраста. Оценку изменений площади царапины производили при помощи программного продукта BioFilmAnalyser [Bogachev *et al.*, 2018].

7. Оценка antimикробного потенциала растительных экстрактов и доксорубицина в отношении бактерий *p. Lactobacillus*. Для определения антибактериального эффекта экстрактов (0.25, 0.5, 1 мг/диск) и доксорубицина

(5, 10, 50 и 100 мкг/диск) по отношению к бактериям р. *Lactobacillus* использовали диско-диффузионный метод [МУК 4.2.1890-04]. Чувствительность лактобацилл к экстрактам и доксорубицину оценивали по диаметрам зон задержки роста бактерий (мм) вокруг дисков по сравнению с негативным контролем (дистиллированная вода).

8. Оценка генотоксичности и мутагенности растительных экстрактов в прокариотических тест-системах.

Тест на ДНК-повреждающий эффект (REC-тест). Для анализа ДНК-повреждающей активности растительных экстрактов была использована чашечная модификация Rec-теста. На бумажные диски наносили растворы исследуемых экстрактов в концентрации 1 мг/диск. В качестве позитивного контроля использовали раствор 2-нитрофурала, 2 мг/диск, негативного контроля – PBS (растворитель). ДНК-повреждающий эффект оценивали по диаметрам зон ингибирования роста тестерных штаммов.

Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса). Перед проведением теста оценивали токсичность исследуемых агентов в отношении тестерного штамма бактерий *Salmonella typhimurium* TA100 [Mortelmans, Zeiger, 2000]. В teste Эймса использовали культуры тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* TA100 и TA98. В качестве негативного и позитивного контроля использовали дистиллированную воду и растворы стандартных мутагенов 2-НФ и NaN₃, соответственно. Известно, что исследуемые вещества считаются мутагенами, если число колоний His+-ревертантов, выросших при их действии, превышает число колоний в негативном контроле более чем в 2 раза [Mortelmans, Zeiger, 2000].

9. Анализ состава вторичных метаболитов растительных экстрактов

Количественное содержание суммы фенольных соединений в растительных экстрактах определяли методом Фолина-Чокальтеу в пересчете на галловую кислоту (Sigma-Aldrich) [Ainsworth, Gillespie, 2007]. Данные представляли в мг эквивалентов галловой кислоты (ГК) на 1 г экстракта.

Количественное содержание суммы флавоноидов в растительных экстрактах определяли в реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в пересчете на кверцетин [Корулькин, 2007]. Данные представлены в виде мг эквивалентов кверцетина (КЭ) на 1 г экстракта.

Количественное определение содержания суммы терпеноидных соединений в растительных экстрактах проводили по методике, описанной Сысоевой [Сысоева с соавт., 2015] в пересчете на ланостерол. Данные представлены в виде мг эквивалентов ланостерола на 1 г экстракта.

Количественное определение содержания углеводов в растительных экстрактах проводили анtronовым методом [Yemm, Willis, 1954]. Результаты представлены в виде мг эквивалентов глюкозы на 1 г экстракта.

Определение качественного и количественного состава веществ в экстрактах методом инструментальной тонкослойной хроматографии (ТСХ). Нанесение образцов на хроматограмму осуществляли автоматически при помощи прибора «Linomat 5» (CAMAG, Швейцария). Хроматографирование осуществляли в приборе «ADC2» (CAMAG, Швейцария), используя систему

растворителей хлороформ – метанол – вода (70:30:0.5). Денситометрическая обработка полученной хроматограммы была проведена на приборе TLC Scanner 3 (SAMAG, Швейцария) с программным обеспечением «winCATS» в режиме адсорбции при УФ-свете, $\lambda=254$ нм. Далее образцы экстрактов на хроматограмме обрабатывали реагентом «анисовый альдегид+серная кислота» и проводили денситометрическую обработку полученной хроматограммы в TLC Scanner 3 (SAMAG, Швейцария) в режиме адсорбция при $\lambda=550$ нм. Идентификацию обнаруженных соединений осуществляли по литературным данным [Бешлей, Ширшова, 2014].

10. Статистический анализ результатов проводили с помощью программ «Microsoft Excel 2010» и Statistica 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Противоопухолевый потенциал экстрактов пяти видов растений сем. *Asparagaceae*

При культивировании клеток всех линий в течение 4 часов в средах с добавлением растительных экстрактов листьев и корневищ *S. cylindrica*, *S. trifasciata* в концентрации 100 и 300 мкг/мл, мы не наблюдали значительного токсического действия экстрактов как на опухолевые, так и на нормальные клетки. Доля выживших клеток линий LEC и A549 составляла в среднем 93-99%, соответственно, для опухолей кишечника 80-96% (Рисунок 1).

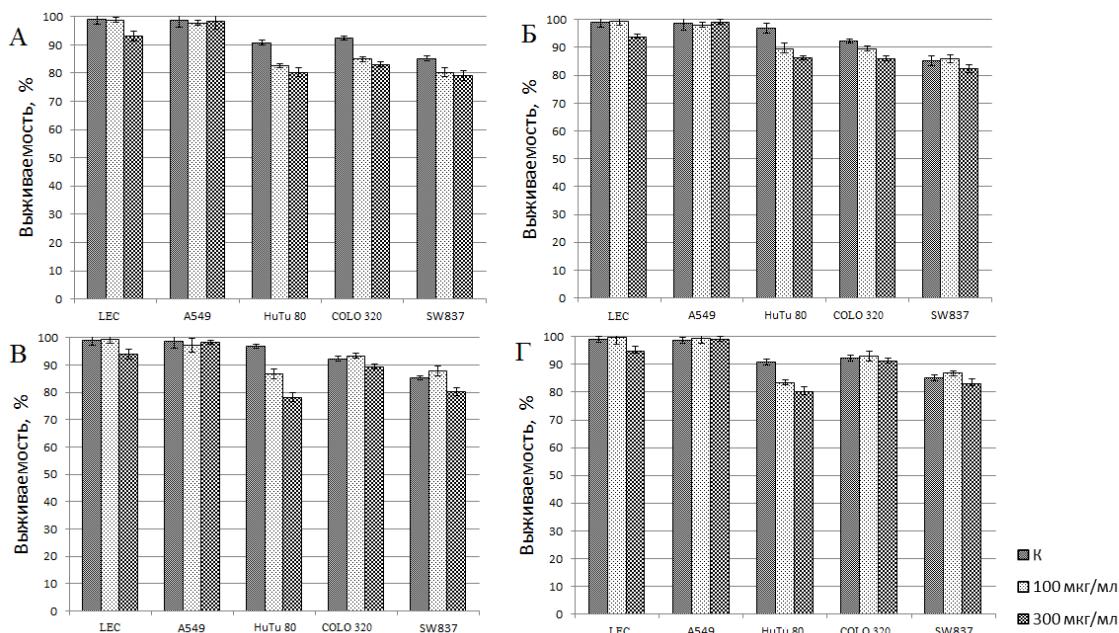


Рисунок 1 – Цитотоксическое действие экстрактов листьев и корневищ *Sansevieria cylindrica* (А, Б) и *Sansevieria trifasciata* (В, Г) по отношению к опухолевым клеткам линий A549, HuTu80, COLO 320, SW837 и нормальным клеткам линии LEC в тесте с PI.

При изучении влияния экстрактов листьев и корневищ *S. trifasciata* и *S. cylindrica* на выживаемость опухолевых клеток в МТТ-тесте было установлено, что экстракты вызывают снижение жизнеспособности клеток только в наивысших из исследованных концентраций (100-2000 мкг/мл). Полученных данных оказалось недостаточно для расчета IC_{50} для экстрактов

данных растений. Таким образом, метанольные экстракты листьев и корневищ *S. trifasciata* и *S. cylindrica* не демонстрировали выраженный цитотоксический эффект в отношении клеток adenокарциномы легкого человека A549, а также опухолей кишечника: adenокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 и прямой кишки SW837, карциномы сигмовидной кишки COLO 320.

Стоит отметить, что в литературе есть данные о противоопухолевой активности представителей рода *Sansevieria*. Например, органические экстракты надземных частей *S. cylindrica* проявляли цитотоксичность по отношению к опухолевым клеточным линиям HCT116, MCF-7 и PC-3 [Raslan *et al.*, 2017], экстракты корня *S. liberica* – HeLa, HCT-116, THP-1и DCM [Akindele *et al.*, 2015]; экстракт корневища *S. roxburghiana* – к клеткам асцитной карциномы Эрлиха [Haldar *et al.*, 2010].

Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, свидетельствуют о том, что экстракт листьев *P. tuberosa* (*Ptl*) проявляет значительное дозозависимое цитотоксическое действие в отношении всех исследованных клеточных линий, в концентрации 300 мкг/мл экстракт вызывал гибель почти всех клеток популяции (Рисунок 2). Следует отметить, что линия нормальных клеток LEC была чувствительна к действию экстракта *Ptl*, однако жизнеспособность клеток опухолей кишечника в его присутствии подавлялась более интенсивно: для линии HuTu 80, COLO 320 и SW837 при концентрации 100 мкг/мл количество живых клеток составило всего 15%, 20% и 19%, соответственно (Рисунок 2А). Более того, для данного экстракта в МТТ-тесте также показано выраженное цитотоксическое действие на клетки опухолей кишечника: значение IC₅₀ варьирует от 50 мкг/мл до 70.3 мкг/мл, в то время как значение IC₅₀ для линии нормальных клеток составило 79.9 мкг/мл (Таблица 1). Экстракт луковиц *Ptb*, также проявлял цитотоксическую активность преимущественно в отношении опухолевых клеток, но в целом, демонстрировал меньшую активность, по сравнению с экстрактом листьев: значения IC₅₀ для клеток опухолей кишечника, COLO 320 и SW837 составили 76.9 и 68.6 мкг/мл, соответственно, а для нормальных клеток легочного эпителия LEC – 164.6мкг/мл (Таблица 1). Известно, что *P. tuberosa* проявляет цитотоксическую активность, направленную против опухолевой клеточной линии HL-60 (IC₅₀ 2.6-6.1 мкмоль/мл) [Mimaki *et al.*, 2000]. Ранее было показано, что спиростаноловые пентагликозиды из подземных частей полиантеса клубненосного, экстрагированные метанолом, токсичны для клеток линии HSC-2 (IC₅₀ 1.5-13 мкмоль/мл) [Mimaki *et al.*, 2002], стероидные гликозиды – для клеток линии HeLa (IC₅₀ 3.54-20 мкмоль/мл) [Lim, 2013].

Экстракт листьев юкки нитчатой *Yfl*, согласно результатам, полученным при цитометрическом анализе, проявляет наибольший избирательный цитотоксический эффект по отношению к линиям опухолей кишечника. Особено отмечено существенное снижение выживаемости клеток adenокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 (70-19%, Рисунок 2В) при действии экстракта в диапазоне концентраций 25-300 мкг/мл. Концентрации полумаксимального ингибирования данного экстракта: 409.1 мкг/мл для клеток линии LEC, A549 – 178 мкг/мл, для линий кишечных

опухолей – 83.5-103 мкг/мл (Таблица 1). В работе [Balestrieri *et al.*, 2006] показано, что фенольные соединения из коры *Y. schidigera* снижают пролиферацию клеток саркомы Капоши. Водно-спиртовой экстракт из свежих цветов *Y. glauca* обладал противоопухолевой активностью в отношении меланомы B16 у мышей [Ali *et al.*, 1978].

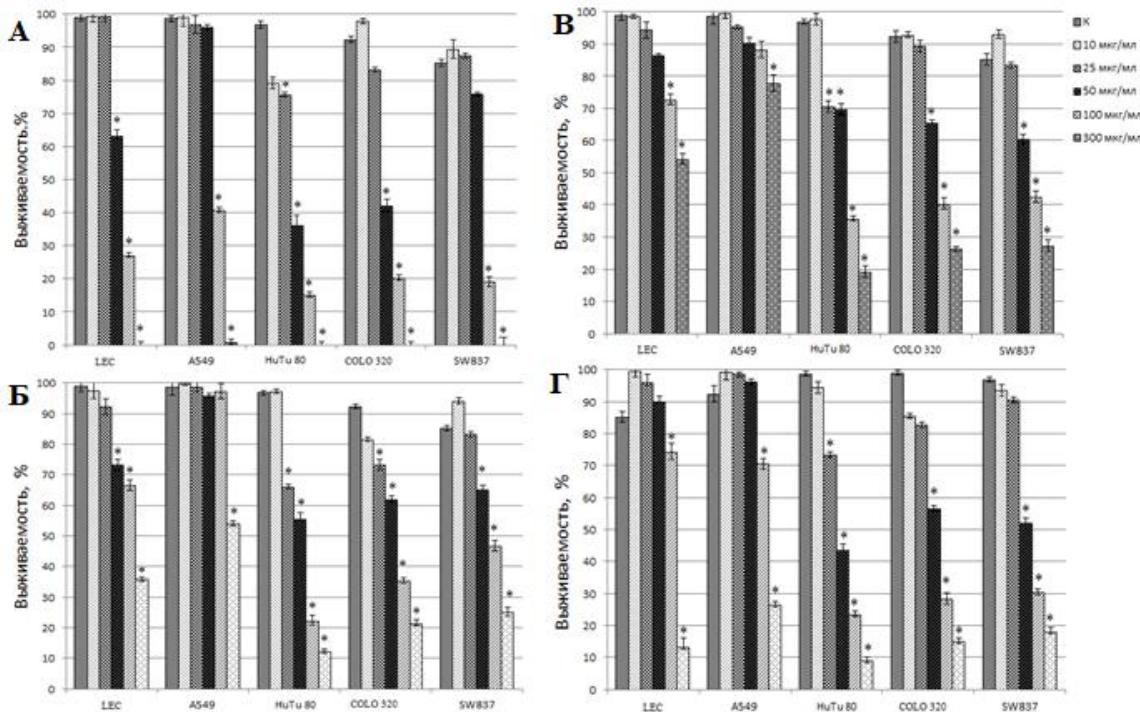


Рисунок 2 – Цитотоксическое действие экстрактов листьев (А) и луковиц (Б) *Polianthes tuberosa*, листьев *Yucca filamentosa* (В) и листьев *Furcraea gigantea* (Г) по отношению к опухолевым клеткам линий A549, HuTu 80, COLO 320, SW837 и нормальных клеток линии LEC в тесте с PI. * – отличия от варианта без обработки экстрактами статистически значимы при $p \leq 0,05$.

В данной работе установлено, что метанольный экстракт листьев *Furcraea gigantea* (*Fgl*) обладает существенной избирательной цитотоксической активностью по отношению к клеточным линиям опухолей кишечника. Статистически значимое некроз-индуцирующее действие экстракта *Fgl* на клетки LEC отмечено лишь в концентрации 300 мкг/мл, (выживаемость снижалась до $13.5 \pm 2.11\%$), в то время как опухолевые клеточные линии оказались более чувствительными к действию экстракта. Например, выживаемость клеток adenокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 снижалась с 73% до 9.35% при действии экстракта *Fgl* в диапазоне концентраций 25-300 мкг/мл (Рисунок 2Г). Значение IC_{50} экстракта *Fgl* для клеток линии adenокарциномы легкого человека A549, установленная в МТТ тесте, составляет 82 мкг/мл, для линий опухолей кишечника – в диапазоне 47-58 мкг/мл, а для нормальных клеток легочного эпителия LEC – 87.1 мкг/мл (Таблица 1). Согласно данным литературы, стероидные гликозиды из листьев *F. foetida* проявляют противоопухолевые свойства по отношению к клеточным линиям A549, HSC-2, HSC-4, HL-60 с IC_{50} 1.6-5 мкмоль [Yokosuka *et al.*, 2009].

Таким образом, результаты данного исследования свидетельствуют о существенном антиканцерогенном потенциале экстрактов трех растений сем.

Asparagaceae, произрастающих в Египте: полиантеса клубненосного, юкки нитчатой и фуркреи гигантской.

Таблица 1 – Концентрации полумаксимального ингибирования растительных экстрактов по отношению к клеточным линиям A549, HuTu 80, COLO 320, SW837 и нормальных клеток линии LEC.

Экстракты	IC ₅₀ , мкг/мл				
	LEC	A549	HuTu 80	COLO 320	SW837
Ptl	79.9	62.5	70.3	50.6	50.0
Ptb	164.6	107.3	49.3	76.9	68.6
Yfl	409.1	178.0	83.5	86.7	103.0
Fgl	87.1	82.0	55.9	47.8	58.9

2 Сочетанное действие растительных экстрактов и биназы/доксорубицина на опухолевые клетки

Известно, что комбинированная терапия на основе терапевтических агентов, воздействующих на несколько молекулярных мишней, показывает многообещающий потенциал в лечении рака [Yap *et al.*, 2013].

В данной работе был исследован сочетанный цитотоксический эффект экстракта листьев *P. tuberosa* и *Y. filamentosa* с известными противоопухолевыми агентами рибонуклеазой *Bacillus pumilus* и антрациклиновым антибиотиком доксорубицином на клетках линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 в MTT-тесте.

Нами установлено, что в 50% комбинаций разных концентраций экстракта листьев *P. tuberosa* (10 – 1500 мкг/мл) и биназы (10 – 1500 мкг/мл) наблюдается синергизм цитотоксического эффекта (Рисунок 3, IA). Так, самая низкая выживаемость опухолевых клеток наблюдается при одновременном действии всех концентраций биназы и 70.3 мкг/мл экстракта и выше (22-38%).

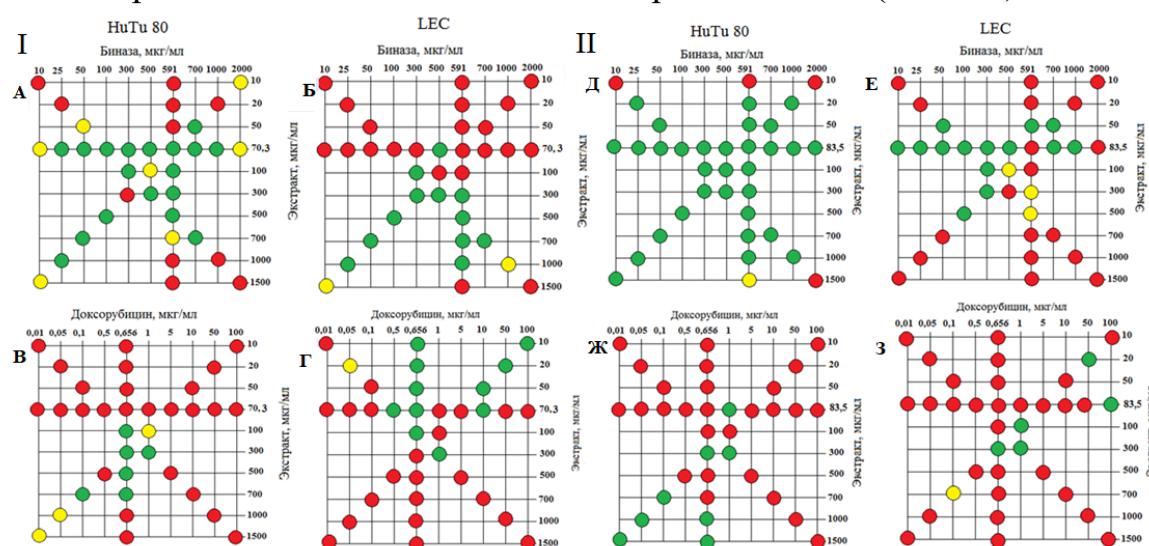


Рисунок 3 – Карты сочетанного действия: (I) – экстракта листьев *Polianthes tuberosa* и биназы (А, Б) или доксорубицина (В, Г), (II) – экстракта листьев *Yucca filamentosa* и биназы (Д, Е) или доксорубицина (Ж, З) по отношению к клеткам HuTu 80 и LEC по значениям индекса сочетания (CI). Точки на рисунке указывают на антагонизм (CI > 1.1, красный), аддитивность (0.9 < CI < 1.1, желтый) и синергизм (CI < 0.9, зеленый).

При сочетании биназы и экстракта листьев *Y. filamentosa* наблюдается 86% синергии цитотоксического действия по отношению к клеткам HuTu 80 (Рисунок 3, ПД). В результате синергии происходит существенное угнетение жизнеспособности клеток HuTu 80 (выживаемость = 20-41%), уже начиная с низких концентраций действующих веществ, например, 25 мкг/мл биназы и 20 мкг/мл экстракта. По отношению к клеткам линии LEC синергизм наблюдался в 40% комбинаций разных концентраций биназы и экстракта (Рисунок ПЕ).

Ранее было показано, что одновременное применение биназы с экстрактами растений альбиции лебекк *Albizzia lebbeck*, баухинии пестрой *Bauhinia variegata* (*Fabaceae*), а также кигелии африканской *Kigelia africana* (*Bignoniaceae*) способствовало усилению индукции апоптоза клеток аденокарциномы легких человека A549, по сравнению с действием биназы и экстрактов в отдельности [Карамова с соавт., 2015]. Также установлена эффективность апоптозиндуцирующего действия РНКазы *B. rumilis* в сочетании с известным противоопухолевым антибиотиком блеомицином в определенных концентрациях на клетки A549 [Зеленихин с соавт., 2016].

Установлено, что совместное действие растительных экстрактов и доксорубицина менее эффективно, по сравнению с биназой. У доксорубицина и экстракта листьев полиантеса клубненосного по отношению к клеткам HuTu 80 синергия наблюдалась в 17% вариантов, у антибиотика и экстракта юкки нитчатой – в 23% вариантов сочетаний.(Рисунок 3, IB, ПЖ). Однако есть примеры успешного применения доксорубицина в сочетанной противоопухолевой терапии, например, с таксаном [Czepas, Gwozdzinski, 2014]. Также показано, что комбинация эпигаллокатехин-3-галлата с доксорубицином оказывает значительный синергетический противоопухолевый эффект на клетки HeLa [Guo *et al.*, 2019].

3 Оценка antimиграционных свойств экстракта листьев *Polianthes tuberosa*

При оценке влияния экстракта *Ptl* на миграцию опухолевых клеток HuTu 80 методом скрэтч-анализа было установлено, что экстракт уже в концентрации 10 мкг/мл вызывает значимое подавление миграции опухолевых клеток, по сравнению с негативным контролем. В присутствии экстракта *Ptl* в наивысшей из исследованных концентраций (70 мкг/мл) наблюдался лишь незначительный прирост клеток на линию царапины (Рисунок 4). После 24 ч инкубирования клеток HuTu 80 с растительным экстрактом (10-70 мкг/мл) площадь царапины без клеток увеличивается с 64 до 96%, в то время как в негативном контроле площадь царапины, свободная от клеток, равна 60%.

Известно, что некоторые соединения растительного происхождения оказывают влияние на миграцию опухолевых клеток. Фенольные соединения юккаолы из *Y. schidigera* снижали миграцию клеток саркомы Капоши [Balestrieri *et al.*, 2006]. Установлено, что нарцилазин из *Narcissus* (100–300 нМ) эффективно ингибирует пролиферацию, миграцию,angiогенное прорастание первичных эндотелиальных клеток человека [Brautigam *et al.*, 2019]. Стандартизированная субфракция листьев шелковочашечника курчавого *Strobilanthes crispus* ингибирует распространение клеточных линий карциномы

молочной железы мыши 4T1 рака молочной железы человека MDA-MB-231 вдоль края царапины [Baraya *et al.*, 2019].

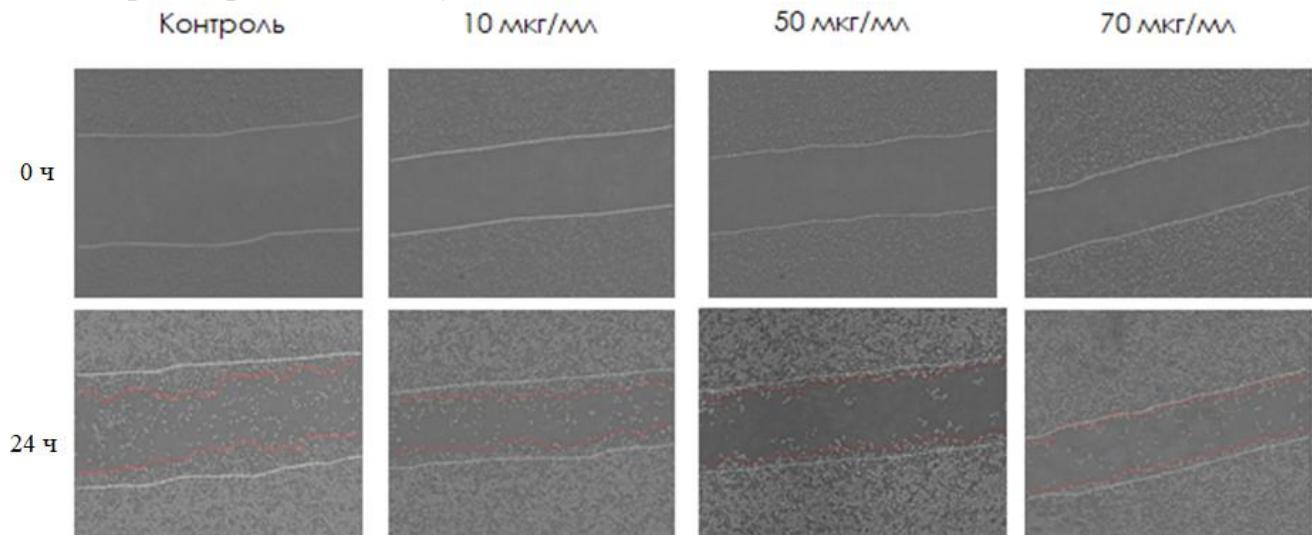


Рисунок 4 – Антимиграционные свойства экстракта листьев *Polianthes tuberosa* по отношению к клеткам аденоциркоза двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. Фазово-контрастная микроскопия. Пунктирные белые и красные линии обозначают края царапины через 0 и 24 часа после ее проведения, соответственно.

4 Влияние растительных экстрактов и доксорубицина на жизнеспособность бактерий р. *Lactobacillus*

Для оценки действия экстрактов *Ptl*, *Ptb*, *Yfl*, *Fgl*, проявивших выраженную цитотоксическую активность в отношении клеток трех видов опухолей кишечника, на нормальную микрофлору кишечника человека, мы исследовали их влияние на жизнеспособность бактерий, представителей р. *Lactobacillus*. Установлено, что в исследованном диапазоне концентраций (250-1000 мкг/диск) ни один из растительных экстрактов не вызывал угнетения роста изолятов *Lactobacillus* sp. HF-A4, *Lactobacillus* sp. HF-D1, *Lactobacillus* sp. HF-E1, выделенных из кишечника относительно здоровых людей, и изолятов *L. fermentum* Ga, *L. plantarum* Na, *L. plantarum* RiaF-8, выделенных из пробиотических препаратов «Гастрофарм», «Наринэ», «РиоФлора Баланс Нео» (Рисунок 5).

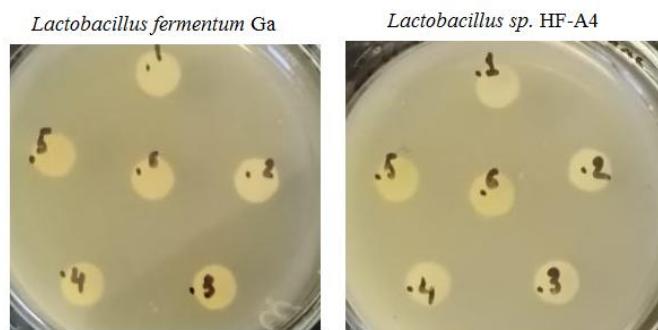


Рисунок 5 – Влияние растительных экстрактов на рост бактерий *Lactobacillus fermentum* GA и *Lactobacillus* sp. HF-A4. Экстракти: 1, 2 – листья *Polianthes tuberosa*; 3, 4 – луковицы *Polianthes tuberosa*; 5, 6 – листья *Yucca filamentosa*, 1000 мкг/диск.

В то же время нами показано, что доксорубицин, используемый в противоопухолевой терапии, оказывает антимикробное действие на изоляты лактобактерий *L. fermentum* Ga, *L. plantarum* Na, *L. plantarum* RiaF-8, выделенные из пробиотических препаратов, а также на *Lactobacillus* sp. HF-A4, *Lactobacillus* sp. HF-D1, *Lactobacillus* sp. HF-E1, выделенные из кишечника человека, в среднем, начиная с концентрации 50 мкг/диск (Рисунок 6). Ранее было показано, что для некоторых штаммов лактобактерий диапазон минимальных ингибирующих концентраций доксорубицина составляет 0.75–3 мкг/мл [Сержантов с соавт., 2016].

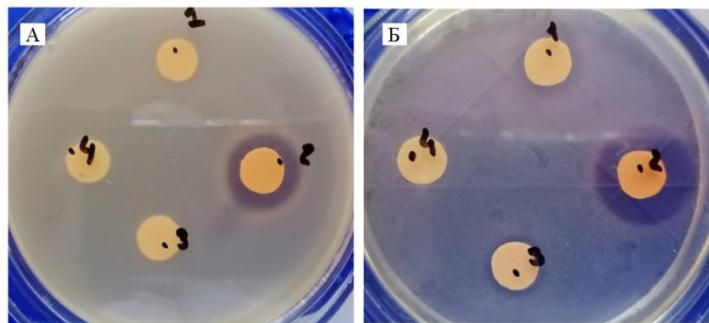


Рисунок 6 – Влияние доксорубицина на рост бактерий *Lactobacillus plantarum* Na (А) и *Lactobacillus* HF-E1 (Б). Доксорубицин: 1 – 50 мкг/диск; 2 – 100 мкг/диск; 3 – 10 мкг/диск; 4 – 5 мкг/диск.

5 Оценка генотоксичности и мутагенности растительных экстрактов

5.1 ДНК-повреждающая активность экстрактов

При оценке ДНК-повреждающей активности исследуемых экстрактов (*Scl*, *Scr*, *Stl*, *Str*, *Ptl*, *Ptb*, *Yfl* и *Fgl*) в концентрации 2 мг/диск не наблюдалось подавления роста как дикого штамма Wp2 *E. coli*, так и штамма *recA*-, дефектного по репарации ДНК. ДНК-повреждающая активность для 2-нитрофурала (позитивный контроль) составила 75% (Рисунок 7). Следовательно, исследуемые растительные экстракты не обладают ДНК-повреждающим действием.

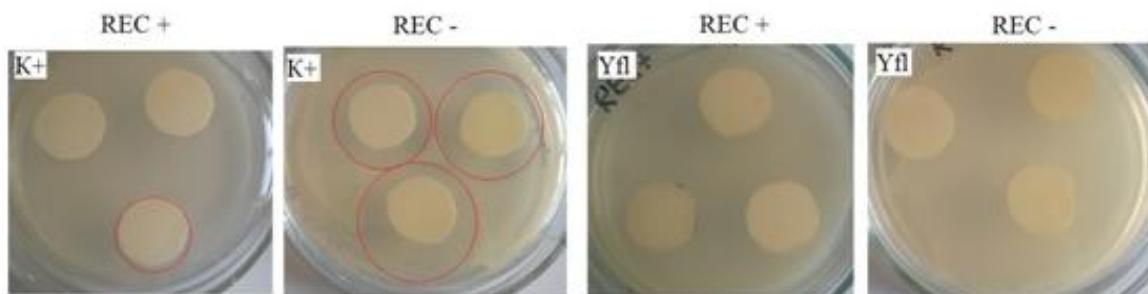


Рисунок 7 – Зоны подавления роста тестерных бактерий в teste на ДНК-повреждающий эффект. K+ – позитивный контроль 2-нитрофурал, 2мг/диск, Yfl – экстракт листьев *Yucca filamentosa*, 2 мг/диск. Rec⁺ – *E. coli* WP2 дикий тип, Rec⁻ – *E. coli* *recA*⁻, штамм, дефектный по *recA*-зависимой репарации ДНК.

5.2 Мутагенный потенциал органических экстрактов растений сем. *Asparagaceae*

При проведении теста Эймса установлено, что ни один из исследованных экстрактов не вызывал повышения количества His⁺ревертантов для штаммов

S. typhimurium TA98 и TA100 над спонтанным фоном мутирования более чем в 2 раза (Таблица 2). При этом число колоний ревертантов, индуцированных известными мутагенами 2-НФ и NaN₃, значительно превысило таковое в позитивном контроле для обоих штаммов.

Таким образом, исследованные нами растительные экстракты не обладают генотоксичностью и мутагенностью, что свидетельствует об их генетической безопасности.

Таблица 2 – Мутагенный потенциал экстрактов пяти видов растений сем. *Asparagaceae* в teste Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100.

Экстракт	Количество His ⁺ ревертантов/ чашку					
	TA100			TA98		
	0.1 мг/мл	0.5 мг/мл	1 мг/мл	0.1 мг/мл	0.5 мг/мл	1 мг/мл
<i>Scl</i>	177.5±20.5	134.5±17.8	158±2.82	39.5±2.1	43±5.66	41±8.48
<i>Scr</i>	177±4.24	155.5±7.78	123±15.56	34±2.83	45.5±0.7	43.5±6.36
<i>Ptl</i>	151±20.6	138.5±2.12	124.5±22.3	35.5±2.12	44±4.24	34.5±0.7
<i>Ptb</i>	129±22.4	137±1.41	114.5±21.2	43.5±3.53	38±1.41	38.5±2.12
<i>Stl</i>	219.5±0.7	184±5.65	117.5±10.6	44±2.82	38±5.65	46.5±0.7
<i>Str</i>	167.5±19.1	169±12.72	141±15.56	41.5±3.54	35.5±2.12	35±1.41
<i>Yfl</i>	141.5±23.3	176.5±16.3	120.5±13.4	41.5±4.95	47.5±3.54	35±4.24
<i>Fgl</i>	140±14.14	187±4.24	188±11.31	34.5±2.12	36.5±3.54	32±1.41
Позитивный контроль	1270.01±137.0*			1072±158.4*		
Негативный контроль	161±15.5			46.5±6.36		

6 Анализ состава вторичных метаболитов растительных экстрактов

Сравнительный анализ состава экстрактов пяти видов растений сем. *Asparagaceae*, полученных из разных анатомических частей, позволил установить, что экстракты листьев содержат более широкий спектр соединений, по сравнению с экстрактами подземных органов. При этом разные экстракты листьев, как и экстракты корневищ, схожи по качественному составу, но отличаются по количественному содержанию отдельных веществ, что согласуется с литературными данными [Philip *et al.*, 2011].

Нами было проведено количественное определение основных биологически активных веществ в органических экстрактах исследуемых пяти видов растений сем. *Asparagaceae* с использованием спектрофотометрических методов (Таблица 3). Согласно полученным результатам, самое высокое содержание фенольных соединений обнаружено в экстрактах листьев юкки нитчатой *Yfl* (513.17 мг ГК/гэ), фуркреи гигантской *Fgl* (471.2 мг ГК/гэ), а также полиантеса клубненосного *Ptl* (335.75 мг ГК/гэ). Также в экстракте *Yfl* выявлено наибольшее количество флавоноидов (155.95±5. 97 мг КЭ/гэ). Таким образом, примерно 1/3 фенольных соединений, содержащихся в экстракте листьев юкки

нитчатой, представлено флавоноидами. Максимальное содержание терпеноидных соединений характерно для экстракта *Ptl* – 124.06 ± 0.54 мг ЛЭ /г экстракта. Было обнаружено большее содержание углеводов в экстрактах корневищ сансевиерии трехполосной и сансевиерии цилиндрической и луковиц полиантеса клубненосного, что, по всей видимости, связано с их физиологическими особенностями накопления органических веществ.

Таблица 3 – Суммарное содержание некоторых вторичных метаболитов в органических экстрактах пяти видов растений сем. *Asparagaceae*.

Растительный экстракт	Фенольные соединения, мг ГК/гэ.	Флавоноиды, мг КЭ/гэ	Терпеноиды, мг ЛЭ/гэ	Углеводы, мг глюкозы/гэ
<i>Scl</i>	293.89 ± 3.25	59.4 ± 0.92	82.85 ± 2.74	648 ± 0.13
<i>Scr</i>	73.45 ± 1.17	8.2 ± 0.14	61.24 ± 3.31	-
<i>Ptl</i>	335.75 ± 7.15	26.7 ± 1.71	124.06 ± 0.54	545 ± 1.5
<i>Ptb</i>	200.8 ± 3.45	20.93 ± 1.77	52.54 ± 0.51	-
<i>Stl</i>	293.82 ± 2.08	27.76 ± 0.54	50.98 ± 1.09	507.5 ± 1.63
<i>Str</i>	91.39 ± 1.22	12.84 ± 0.54	77.17 ± 1.93	-
<i>Yfl</i>	513.17 ± 10.22	155.95 ± 5.97	68.38 ± 0.83	832.6 ± 0.67
<i>Fgl</i>	471.2 ± 8.77	19.32 ± 0.84	49.70 ± 0.83	593.9 ± 0.96

* «–» - метод не может быть применим, так как дает завышенный результат вследствие побочной реакции между сапонинами и серной кислотой, входящей в состав анtronового реагента.

Исследование качественного и количественного состава экстрактов, полученных из пяти видов растений семейства *Asparagaceae*, проводили с помощью инструментальной тонкослойной хроматографии. На рисунке 8 представлены ТСХ пластины с хроматограммами исследованных экстрактов в видимом свете, при детекции УФ-светом и после дериватизации реагентом «анисовый альдегид+серная кислота», а также спектры экстрактов при $\lambda=254$ нм и 550 нм после обработки ТСХ пластины в «TLS Scanner» (CAMAG).

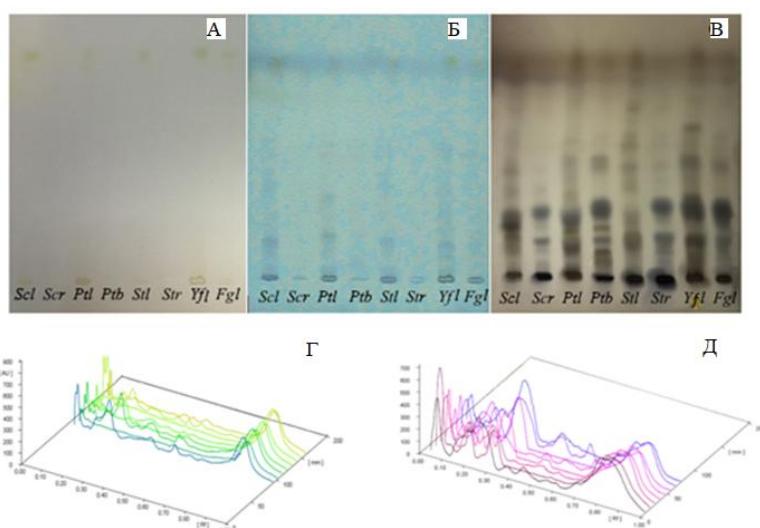


Рисунок 8 – ТСХ пластины анализа метанольных экстрактов растений сем. *Asparagaceae* в видимом свете (А), при детекции УФ-светом с $\lambda = 254$ нм (Б), в видимом свете после обработки реагентом «анисовый альдегид + серная кислота» (В). Спектры экстрактов при $\lambda=254$ нм (Г) и при $\lambda=550$ нм (Д).

Результаты денситометрического анализа хроматограммы для экстрактов листьев и луковиц полиантеса клубненосного, листьев юкки нитчатой и фуркреи гигантской, обладающих наиболее выраженным цитотоксическим действием в отношении клеток кишечных опухолей, приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Качественный и количественный состав веществ в растительных экстрактах, установленный методом инструментальной ТСХ

Экстракт	R _f	Содержание*, %	Окраска	Отнесение
<i>Ptl</i>	0.05	13.52	черный	Пигменты, сложные полифенольные соединения
	0.15	11.70	темно-синий	СС в фуростаноловой форме
	0.23	3.20	серо-черный	H/C
	0.26	14.10	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.35	0.34	серо-черный	H/C
	0.45	1.88	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.52	0.19	серо-черный	H/C
	0.54	0.57	серо-черный	H/C
	0.72	4.13	серо-черный	H/C
	0.81	19.40	серо-черный	H/C
<i>Ptb</i>	0.04	6.60	черный	Пигменты, сложные полифенольные соединения
	0.10	4.96	серо-черный	H/C
	0.13	5.02	серо-черный	H/C
	0.18	4.43	темно-синий	СС в фуростаноловой форме
	0.23	3.86	серо-черный	H/C
	0.30	23.76	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.48	1.74	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.81	20.48	серо-черный	H/C
	0.85	28.48	серо-коричневый	Простые фенольные соединения
<i>Yfl</i>	0.05	7.10	черный	Пигменты, сложные полифенольные соединения
	0.11	0.53	серо-черный	H/C
	0.13	0.93	серо-черный	H/C
	0.18	9.89	темно-синий	СС в фуростаноловой форме
	0.30	30.02	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.43	0.87	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.48	7.30	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.55	0.22	серо-черный	H/C
	0.61	4.69	серо-черный	H/C
	0.72	2.63	серо-черный	H/C
	0.81	8.91	серо-черный	H/C
	0.87	26.91	серо-коричневый	Простые фенольные соединения

Fgl	0.05	5.94	черный	Пигменты, сложные полифенольные соединения
	0.12	0.59	серо-черный	H/C
	0.18	9.24	темно-синий	СС в фуростаноловой форме
Fgl	0.29	40.64	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.46	4.38	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.48	2.14	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.52	1.24	серо-черный	H/C
	0.57	0.73	серо-черный	H/C
	0.74	4.01	серо-черный	H/C
	0.80	12.19	серо-черный	H/C
	0.85	18.92	серо-коричневый	Простые фенольные соединения

*- по площади пика на денситограмме, СС – стероидные сапонины, Н/С – неидентифицированные соединения

Анализ состава растительных экстрактов с применением инструментальной ТСХ позволил установить, что в экстракте листьев полиантеса клубненосного почти в равных количествах содержатся стероидные сапонины в фуростаноловой и спиростаноловой форме, тогда как в экстракте луковиц преобладали последние. Для экстрактов листьев и луковиц полиантеса клубненосного характерно содержание довольно большого количества фенольных соединений: 44.5% для экстракта листьев и 35% для экстракта луковиц, которые представлены простыми фенольными соединениями, а также сложными полифенолами. Из данных литературы известно, что растения *P. tuberosa*, произрастающие в разных странах, богаты стероидными сапогенинами, сапонинами, гликозидами, некоторые из которых обладают цитотоксической активностью против опухолевых клеточных линий. В работе [Barghout *et al.*, 2018] показано, что водные экстракты листьев *P. tuberosa* содержат большое количество полифенольных соединений. Свежие клубни *P. tuberosa* из Китая содержали стероидные гликозиды, в том числе два спиростанола (полиантозиды В и С) и четыре фуростанола (полиантозиды D – G) [Jin *et al.*, 2004]. Полиантозиды В-Н проявляют цитотоксическое действие в отношении раковых клеток шейки матки HeLa [Lim, 2013]. Сапонины из подземных частей *P. tuberosa* (Япония) проявляли умеренную цитотоксическую активность в отношении клеток HL-60 и клеток HSC-2, которые были устойчивы к этопозиду [Mimaki *et al.*, 2002].

Согласно полученным результатам, суммарное содержание стероидных сапонинов в экстракте листьев фуркреи гигантской *F. gigantea* составляет 56.4%, из них 72% занимают стероидные сапонины в спиростаноловой форме. Ранее было показано, что сапонин фуркреастатин, полученный из этанольного экстракта листьев *Furcraea foetida* из Таиланда, снижает жизнеспособность мутантных p53-сверхэкспрессирующих клеток [Itabashi *et al.*, 2000]. Также из данного растения выделены стероидные гликозиды, проявляющие значительную цитотоксичность со значениями IC₅₀ в диапазоне от 1.4 до 4.6 мМ на клеточных

линиях A549, HSC-2, HSC-4, HL-60, устойчивых к противоопухолевым агентам этопозиду и цисплатину [Yokosuka *et al.*, 2009].

Суммарное содержание стероидных сапонинов в экстракте юкки нитчатой *Yfl* равно 48.1%, при этом 62% из них занимают стероидные сапонины в спиростаноловой форме. Известно, что растения р. *Yucca* являются одним из главных индустриальных источников стероидных сапонинов [Sastre *et al.*, 2016]. *Yucca schidigera*, произрастающая на территории США, содержит биологически активные вторичные метаболиты, такие как сапонины, фенольные комплексы и юккаолы [Olas *et al.*, 2005; Piacente *et al.*, 2005], ресвератрол [Oleszek *et al.*, 2001]. Согласно данным литературы, стероидные гликозиды из подземных частей *Y. glauca* (Канада) оказывают цитотоксическую активность в отношении клеток лейкемии человека HL-60 и клеток аденокарциномы легкого человека A549 [Yokosuka *et al.*, 2014].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что водные растворы метанольных экстрактов листьев и корневищ *Sansevieria cylindrica*, *Sansevieria trifasciata* не обладают существенным токсическим действием по отношению к четырем видам опухолевых клеточных линий (A549, SW837, HuTu 80, COLO 320) и нормальным клеткам легочного эпителия LEC, в то время как органические экстракты листьев и луковиц *Polianthes tuberosa*, листьев *Yucca filamentosa* и *Furcraea gigantea* оказывают избирательное дозозависимое цитотоксическое действие на опухолевые клетки, проявляя сравнительно меньшую токсичность в отношении нормальных клеток LEC. Наиболее высокий цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток демонстрируют экстракты листьев *P. tuberosa* и *F. gigantea*; экстракт листьев *Y. filamentosa* обладает наибольшей избирательностью к опухолевым клеткам (значения IC₅₀ в отношении всех тестированных опухолевых клеточных линий в среднем в 3.6 раза меньше, чем для нормальных клеток LEC), а экстракт листьев *P. tuberosa* вызывает дозозависимое снижение миграционной активности клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. Комбинированное действие экстракта листьев *P. tuberosa* и биназы дает на клетках HuTu 80 синергетический цитотоксический эффект в 50% вариантов сочетаний концентраций, а экстракта листьев *Yucca filamentosa* и биназы – в 86%. Установлено, что метанольные экстракты пяти видов растений сем. *Asparagaceae* не обладают антибактериальной активностью в отношении представителей нормальной микрофлоры кишечника человека и пробиотических микроорганизмов р. *Lactobacillus*, а также не обладают генотоксическим потенциалом. Фитохимический анализ исследуемых экстрактов свидетельствует о том, что цитотоксический эффект экстрактов листьев и луковиц *Polianthes tuberosa* связан с высоким содержанием в них фенольных и терпеноидных соединений, а экстрактов листьев *Yucca filamentosa*, *Furcraea gigantea* – стероидных сапонинов.

По результатам работы сделаны следующие основные **выводы**:

1. Органические экстракты листьев и корневищ *Sansevieria cylindrica*, *Sansevieria trifasciata*, не оказывают значимого цитотоксического действия на клетки аденокарциномы легких человека А549, двенадцатиперстной кишки человека НуТу 80, карциномы сигмовидной кишки COLO 320, аденокарциномы прямой кишки человека SW837 и клетки нормального легочного эпителия LEC. Органические экстракты листьев и луковиц *Polianthes tuberosa*, листьев *Yucca filamentosa* и *Furcraea gigantea* демонстрируют дозозависимую цитотоксичность на опухолевые клетки А549, НуТу 80, COLO 320 и SW837, с выраженной активностью в отношении клеток опухолей кишечника (значения IC₅₀ для экстракта листьев *P. tuberosa*: в отношении клеток линий НуТу 80, COLO 320 и SW837 составляют 50-70.3 мкг/мл; для экстракта луковиц *P. tuberosa*: 49.3-76.9 мкг/мл, для экстракта листьев *Y. filamentosa*: 83.5 - 103 мкг/мл; *F.gigantea*: 47.8-58.9 мкг/мл, соответственно).

2. Экстракты листьев *Polianthes tuberosa* и *Yucca filamentosa* совместно с биназой обладают противоопухолевым потенциалом при сочетанном действии на клетки аденокарциномы НуТу 80. Синергетический эффект установлен для 50% комбинаций биназы с экстрактом полиантеса клубненосного и 86% для юкки нитчатой. При совместном действии растительных экстрактов и доксорубицина на опухолевые клетки линии НуТу 80 синергетический эффект наблюдался в 14-17% вариантах сочетаний.

3. Экстракт листьев *Polianthes tuberosa* обладает антиметастатическим потенциалом, вызывая дозозависимое снижение миграционной активности клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека НуТу 80.

4. Исследованные экстракты пяти видов растений семейства *Asparagaceae* не ингибируют рост бактерий р. *Lactobacillus*, выделенных из кишечника человека и пробиотических препаратов.

5. Экстракты пяти видов растений сем. *Asparagaceae* не обладают генотоксичностью, выявляемой в REC-тесте на штаммах *Escherichia coli* WP2, recA⁻ и в тесте Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98, TA100.

6. Органические экстракты листьев растений сем. *Asparagaceae* содержат более широкий спектр соединений по сравнению с экстрактами из подземных органов. Экстракты листьев *Polianthes tuberosa* характеризуются высоким содержанием в них фенольных и терпеноидных соединений, а экстракты листьев *Yucca filamentosa*, *Furcraea gigantea* – фенольных соединений и стероидных сапонинов.

Публикации по теме диссертации

Статьи (включая публикации в журналах, индексируемых WoS, Scopus и РИНЦ)

1. Камалова, Я. Н. Растительное сырье как потенциальный источник противоопухолевых агентов / Я. Н. Камалова, Н. С. Карамова, П. В. Зеленихин, И. Абдул-Хафиз, О. Н. Ильинская // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2019. – Т. 161, кн. 3. – С. 385–394 (BAK, Scopus, РИНЦ, IF - 0,163).

2. Камалова, Я. Н. Препараты растительного происхождения в противоопухолевой терапии (обзор) / Я. Н. Камалова, Н. С. Карамова, О. Н. Ильинская // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т. 10, №.3. – С. 3 – 19 (BAK, Scopus, WoS, РИНЦ, IF -0,314).

3. **Камалова, Я. Н.** Цитотоксическое и апоптозиндуцирующее действие экстрактов растений семейства *Asparagaceae* по отношению к клеткам adenокарциномы легких человека / Я. Н. Камалова, В. В. Штырёва, И. Абдул-Хафиз, Х. М. О. Ибрагим, П. В. Зеленихин, Н. С. Карамова, О. Н. Ильинская // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. - 2016. – Т. 158, кн. 3. - С. 338-350 (ВАК, Scopus, РИНЦ, IF - 0,163).

4. Карамова, Н. С. Апоптозиндуцирующее действие рибонуклеазы *Bacillus pumilus* и экстрактов лекарственных растений Египта на клетки adenокарциномы легких человека / Н. С. Карамова, П. В. Зеленихин, Н. Б. Мирошник, Иссаам Абдул-Хафиз, **Я. Н. Закирова (Камалова)**, О. Н. Ильинская // Гены и клетки. – 2015. – Т.10, №3. – С. 62-67 (ВАК, Scopus, РИНЦ, IF - 0,428).

Тезисы докладов и материалы конференций

1. **Камалова, Я. Н.** Оценка сочетанного действия экстракта листьев *Polianthes tuberosa* и биназы/доксорубицина на опухолевые клетки / Я. Н. Камалова, Н. С. Карамова, П. В. Зеленихин // Биохимия – основа наук о жизни [Электронный ресурс]: материалы 2-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Казань, 7-9 ноября 2019 г.) / под ред. З.И. Абрамовой, Н.И. Акберовой. - Электрон. текстовые данные. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2019. – С.95-97.
2. **Kamalova, Y. N.** Cytotoxic effect of *Asparagaceae* family plant extracts to intestinal carcinoma cells / Y. N. Kamalova // Interaction: from cell to human: abstract book Russian-German Seminar dedicated to the 30th anniversary of the partnership agreement between the Justus Liebig University (Giessen) and Kazan (Volga region) Federal University, 20-24 May, 2019 – Kazan: Publishing House of Kazan University, 2019. – P.53.
3. **Камалова, Я. Н.** Цитотоксическое действие растительных экстрактов на клетки легких эмбриона коровы / Я. Н. Камалова, В. С. Пуховская // Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии: материалы XII Всероссийской научной интернет-конференции / редкол.: Р. А. Исмаков и др. – Уфа: Издательство УГНТУ, 2018. – С.92-93.
4. **Камалова, Я. Н.** Апоптозиндуцирующий эффект экстрактов растений семейства *Asparagaceae* / Я. Н. Камалова, П. В Зеленихин // Сборник Тезисов III Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. Ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань.: Изд-во КФУ, 2018. – С.41.
5. **Камалова, Я. Н.** Цитотоксическое действие экстрактов растений семейства *Asparagaceae* на клетки карциномы кишечника человека / Я. Н. Камалова, П. В. Зеленихин // Сборник Тезисов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. Ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань.: КФУ, 2016. – С.46.
6. Штырёва, В. В. Оценка цитотоксического действия растительных экстрактов на клетки adenокарциномы легких человека. / В. В. Штырёва, **Я. Н. Камалова**, П. В. Зеленихин // Сборник Тезисов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. Ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань.: КФУ, 2016. – С.96.
7. **Камалова, Я. Н.** Цитотоксическая активность биназы в отношении клеток рака кишечника / Я. Н. Камалова, П. В. Зеленихин // Биология – наука XXI века: 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 18-22 апреля 2016 г.): Сборник тезисов. – Пущино, 2016. – С. 126-127.
8. **Камалова, Я. Н.** Биназа вызывает апоптоз клеток рака кишечника / Я. Н. Камалова // VII Конференция молодых ученых РМАПО с международным участием «ШАГ В ЗАВТРА»: сборник материалов конференции; ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2016. – Т. 1. – С.194-195.
9. Штырева, В. В. Цитотоксическое действие экстрактов растений семейства *Asparagaceae* на клетки adenокарциномы прямой кишки человека / В. В. Штырева, **Я. Н.**

Камалова, Н. С. Карамова, О. Н. Ильинская / Сборник тезисов международной конференции «Трансляционная медицина 2016» (Казань, 13-14 октября 2016 г.). / Отв. Ред. А.В. Захаров – Казань.: Изд-во КФУ, 2016. – С.117.

10. Муртазина, Р. Р. Характеристика влияния рибонуклеазы *Bacillus pumilus* на мембранный потенциал митохондрий раковых клеток / Р. Р. Муртазина, **Я. Н. Закирова (Камалова)**, П. В. Зеленихин // Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.): Сборник тезисов. – Пущино, 2015.– С. 254.

11. Муртазина, Р. Р. Биназа снижает мембранный потенциал митохондрий раковых клеток / Р. Р. Муртазина, **Я. Н. Закирова (Камалова)**, П. В. Зеленихин // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. Ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань.: Изд-во КФУ, 2014 – С. 121.

E-mail автора: yazgulen@mail.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, г. Казань,
ул. Кремлевская, д. 18, главное здание Казанского федерального университета,
отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю
Диссертационного совета КФУ.03.07 Кравцовой Ольге Александровне,
e-mail: okravz@yandex.ru