

*На правах рукописи*

*Жаму*

**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: **Митькевич 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 подавлении ангиогенеза [Balunas, Kinghorn, 2005].

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

В работе решали следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать цитотоксическое действие органических экстрактов пяти видов растений семейства *Asparagaceae* в отношении линий опухолевых клеток: аденокарциномы 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 цитотоксического действия экстрактов листьев *Polianthes tuberosa* и *Yucca filamentosa* с РНКазой *Bacillus pumilus* и антрациклиновым антибиотиком доксорубицином по отношению к клеткам аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80.

3. Оценить антимиграционный эффект экстракта листьев *Polianthes tuberosa* на клетки аденокарциномы 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 аденокарциномы легкого человека A549, аденокарциномы прямой кишки SW837, аденокарциномы 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 аденокарциномы 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 аденокарциномы 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 сапононины 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 аденокарциномы HuTu 80, что открывает новые перспективы для создания схем мультисочетанной 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 аденокарциномы HuTu 80. Установлено, что синергетический эффект преимущественно обнаруживается при сочетанном действии растительного экстракта и биназы в концентрациях полумаксимального ингибирования (IC<sub>50</sub>).

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» (Пушино, 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» (Пушино, 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 технологии 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, помощь в освоении методов и обсуждение результатов; доктору Иссаму Абдул-Хафизу (университет г. Асьют, Египет) за помощь 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 помощь 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. Асьют, 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 антрациклиновый антибиотик доксорубин (Доксорубин-РОНЦ®, Россия).

## **2. Используемые 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), аденокарциномы легких человека A549, аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80, карциномы сигмовидной кишки человека COLO 320, аденокарциномы 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 глутамин 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% CO<sub>2</sub>.

**Тестерные бактерии и условия культивирования.** Штаммы *Escherichia coli* WP2 и *recA*<sup>-</sup>, *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<sup>8</sup> 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 ротационном 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* – *Ptb*, 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 засеивали в соответствующие питательные среды в 48-луночные планшеты с начальной

плотностью  $1 \times 10^5$  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 формаза 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 HuTu 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 5х 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 антимикробного потенциала растительных экстрактов и доксорубицина в отношении бактерий р. *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 доксорубину 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-нитрофура, 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 тесте 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  $\text{NaN}_3$ , соответственно. Известно, что исследуемые вещества считаются мутагенами, если число колоний His<sup>+</sup>-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 антроновым 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 (CAMAG, Швейцария) с программным обеспечением «winCATS» в режиме адсорбции при УФ-свете,  $\lambda=254$  нм. Далее образцы экстрактов на хроматограмме обрабатывали реактивом «анисовый альдегид+серная кислота» и проводили денситометрическую обработку полученной хроматограммы в TLC Scanner 3 (CAMAG, 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).

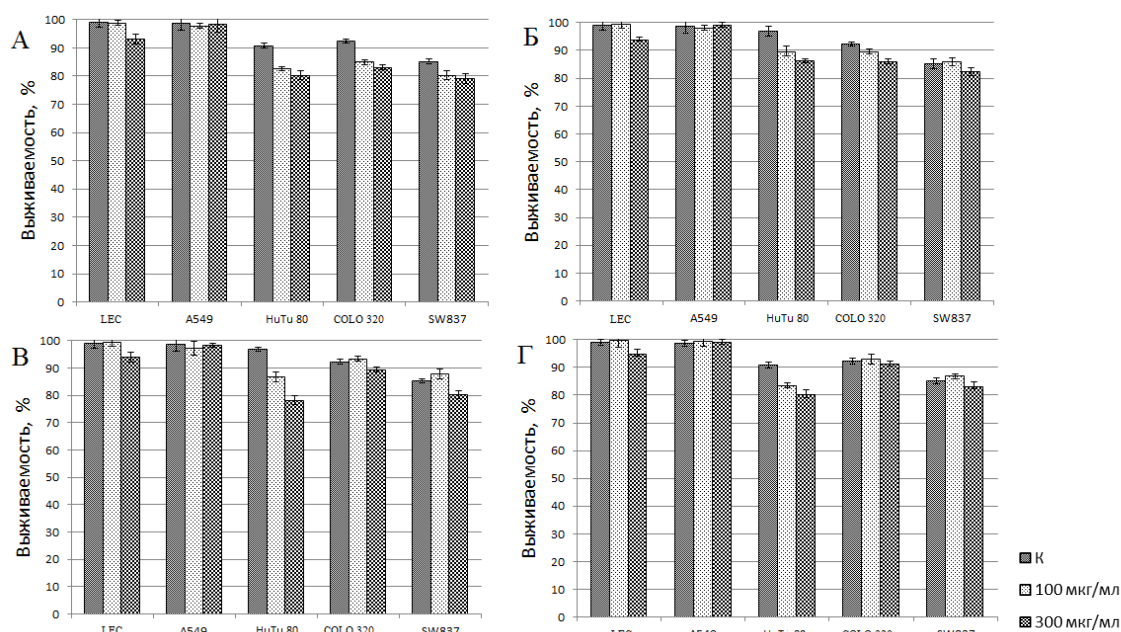


Рисунок 1 – Цитотоксическое действие экстрактов листьев и корневищ *Sansevieria cylindrica* (А, Б) и *Sansevieria trifasciata* (В, Г) по отношению к опухолевым клеткам линий A549, HuTu80, COLO 320, SW837 и нормальным клеткам линии LEC в тесте с PI.

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 аденокарциномы легкого человека A549, а также опухолей кишечника: аденокарциномы 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-1 и 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 ЛЕС 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  $IC_{50}$  варьирует от 50 мкг/мл до 70.3 мкг/мл, в то время как значение  $IC_{50}$  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  $IC_{50}$  для клеток опухолей кишечника, COLO 320 и SW837 составили 76.9 и 68.6 мкг/мл, соответственно, а для нормальных клеток легочного эпителия ЛЕС – 164.6 мкг/мл (Таблица 1). Известно, что *P. tuberosa* проявляет цитотоксическую активность, направленную против опухолевой клеточной линии HL-60 ( $IC_{50}$  2.6-6.1 мкмоль/мл) [Mimaki *et al.*, 2000]. Ранее было показано, что спироستانоловые пентагликозиды из подземных частей полиантеса клубненосного, экстрагированные метанолом, токсичны для клеток линии HSC-2 ( $IC_{50}$  1.5-13 мкмоль/мл) [Mimaki *et al.*, 2002], стероидные гликозиды – для клеток линии HeLa ( $IC_{50}$  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. Особенно отмечено существенное снижение выживаемости клеток аденокарциномы 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 ЛЕС, 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].

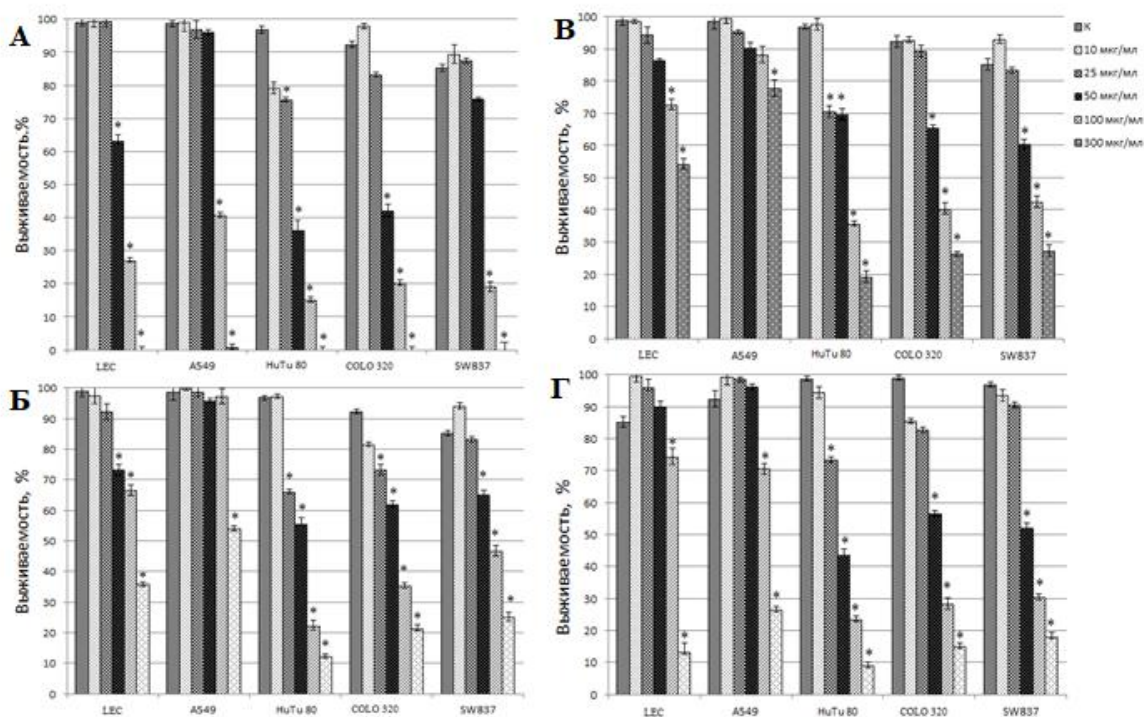


Рисунок 2 – Цитотоксическое действие экстрактов листьев (А) и луковиц (Б) *Polianthes tuberosa*, листьев *Yucca filamentosa* (В) и листьев *Furcraea gigantea* (Г) по отношению к опухолевым клеткам линий 549, HuTu 80, COLO 320, SW837 и нормальных клеток линии LEC в тесте с PI. \* – отличия от варианта 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 аденокарциномы 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 аденокарциномы 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 <sub>50</sub> , мкг/мл				
	LEC	A549	HuTu 80	COLO 320	SW837
<i>Ptl</i>	79.9	62.5	70.3	50.6	50.0
<i>Ptb</i>	164.6	107.3	49.3	76.9	68.6
<i>Yfl</i>	409.1	178.0	83.5	86.7	103.0
<i>Fgl</i>	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 мишеней, 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 МТТ-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, IА). Так, самая низкая выживаемость опухолевых клеток наблюдается при одновременном действии всех концентраций биназы и 70.3 мкг/мл экстракта и выше (22-38%).

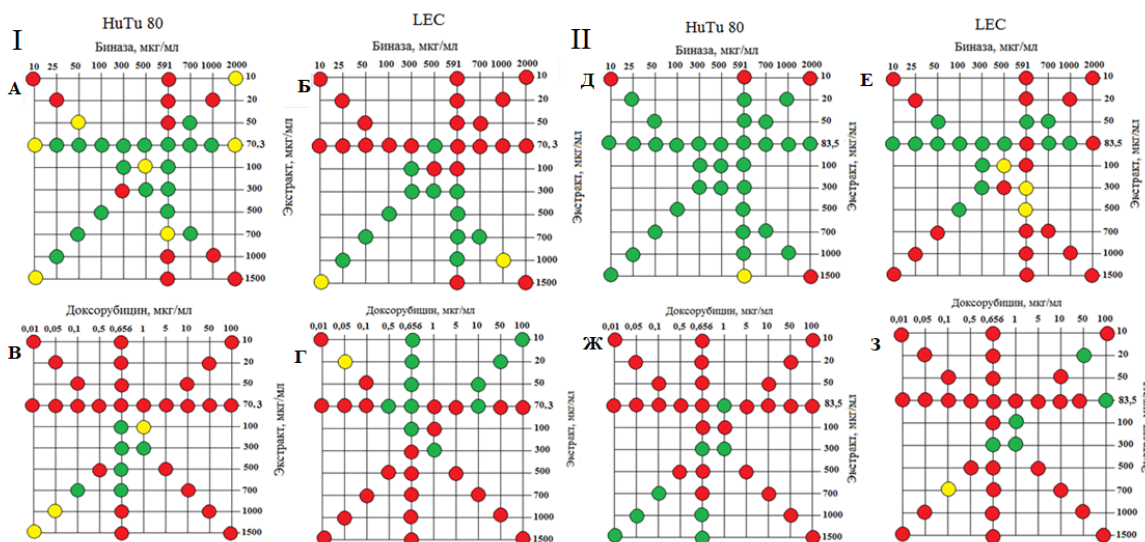


Рисунок 3 – Карты сочетанного действия: (I) – экстракта листьев *Polianthes tuberosa* и биназы (А, Б) или доксорубицина (В, Г), (II) – экстракта листьев *Yucca filamentosa* и биназы (Д, Е) или доксорубицина (Ж, З) по отношению к клеткам HuTu 80 и LEC по значениям индекса сочетания (CI). Точки на рисунке 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 lebbek*, баухинии пестрой *Bauhinia variegata* (*Fabaceae*), а также кигелии африканской *Kigelia africana* (*Bignoniaceae*) способствовало усилению индукции апоптоза клеток аденокарциномы легких человека А549, по сравнению с действием биназы и экстрактов в отдельности [Карамова с соавт., 2015]. Также установлена эффективность апоптозиндуцирующего действия РНКазы *B. pumilus* в сочетании с известным противоопухолевым антибиотиком блеомицином в определенных концентрациях на клетки А549 [Зеленихин с соавт., 2016].

Установлено, что совместное действие растительных экстрактов и доксорубина менее эффективно, по сравнению с биназой. У доксорубина 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, IV, ПЖ). Однако есть примеры успешного применения доксорубина в сочетанной противоопухолевой терапии, например, с таксаном [Czepas, Gwozdzinski, 2014]. Также показано, что комбинация эпигаллокатехин-3-галлата с доксорубином оказывает значительный синергетический противоопухолевый эффект на клетки HeLa [Guo *et al.*, 2019].

### **3 Оценка антимиграционных 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 нарциклазин из *Narcissus* (100–300 нМ) эффективно ингибирует пролиферацию, миграцию, ангиогенное 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].

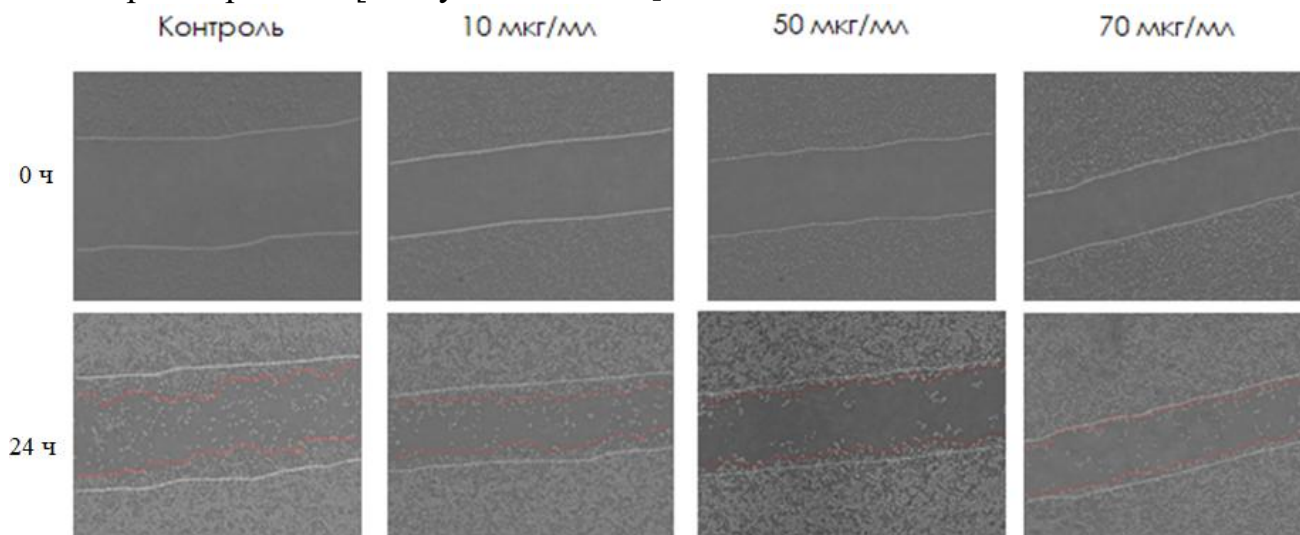


Рисунок 4 – Антимиграционные свойства экстракта листьев *Polianthes tuberosa* по отношению к клеткам аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. Фазово-контрастная микроскопия. Пунктирные белые и красные линии обозначают края царапины через 0 и 24 часа после ее проведения, соответственно.

#### 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).

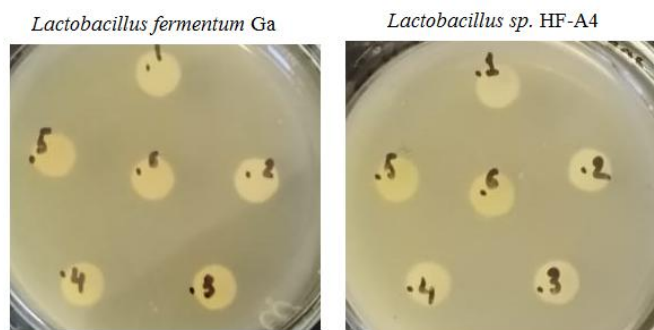


Рисунок 5 – Влияние растительных экстрактов на рост бактерий *Lactobacillus fermentum* GA и *Lactobacillus sp.* HF-A4. Экстракты: 1, 2 – листья *Polianthes tuberosa*; 3, 4 – луковицы *Polianthes tuberosa*; 5, 6 – листья *Yucca filamentosa*, 1000 мкг/диск.

В то же время нами показано, что доксорубин, 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 доксорубина составляет 0.75–3 мкг/мл [Сержантов с соавт., 2016].

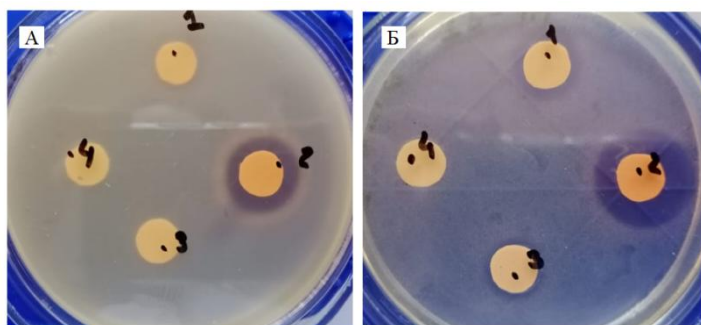


Рисунок 6 – Влияние доксорубина на рост бактерий *Lactobacillus plantarum* Na (А) и *Lactobacillus* HF-E1 (Б). Доксорубин: 1 – 50 мкг/диск; 2 – 100 мкг/ диск; 3 – 10 мкг/ диск; 4 – 5 мкг/ диск.

## 5 Оценка генотоксичности и мутагенности растительных экстрактов

### 5.1 ДНК-повреждающая активность экстрактов

При оценке ДНК-повреждающего эффекта 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-нитрофура (позитивный контроль) составила 75% (Рисунок 7). Следовательно, исследуемые растительные экстракты не обладают ДНК-повреждающим действием.

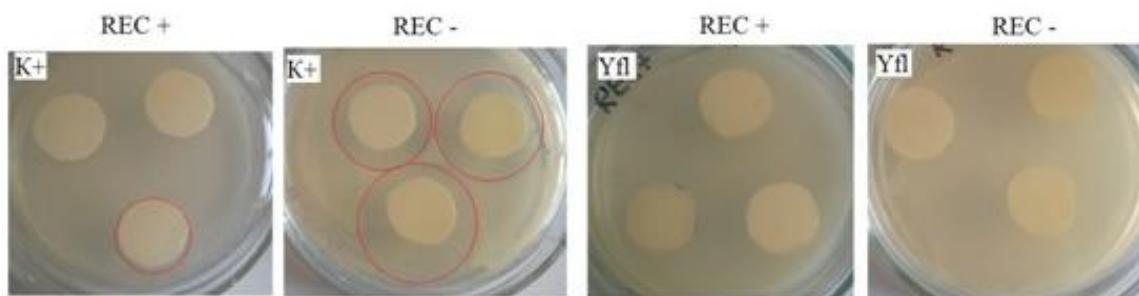


Рисунок 7 – Зоны подавления роста тестерных бактерий в тесте на ДНК-повреждающий эффект. K+ – позитивный контроль 2-нитрофурал, 2мг/диск, Yfl – экстракт листьев *Yucca filamentosa*, 2 мг/диск. Rec<sup>+</sup> – *E. coli* WP2 дикий тип, Rec<sup>-</sup> – *E. coli recA*<sup>-</sup>, штамм, дефектный по *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<sup>+</sup>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 NaN<sub>3</sub>, 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 тесте Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100.

Экстракт	Количество His <sup>+</sup> 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* –  $124.06 \pm 0.54$  мг ЛЭ /г экстракта. Было обнаружено большее содержание углеводов в экстрактах корневищ сансевьерии трехполосной и сансевьерии 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>	$293.89 \pm 3.25$	$59.4 \pm 0.92$	$82.85 \pm 2.74$	$648 \pm 0.13$
<i>Scr</i>	$73.45 \pm 1.17$	$8.2 \pm 0.14$	$61.24 \pm 3.31$	-
<i>Ptl</i>	$335.75 \pm 7.15$	$26.7 \pm 1.71$	$124.06 \pm 0.54$	$545 \pm 1.5$
<i>Ptb</i>	$200.8 \pm 3.45$	$20.93 \pm 1.77$	$52.54 \pm 0.51$	-
<i>Stl</i>	$293.82 \pm 2.08$	$27.76 \pm 0.54$	$50.98 \pm 1.09$	$507.5 \pm 1.63$
<i>Str</i>	$91.39 \pm 1.22$	$12.84 \pm 0.54$	$77.17 \pm 1.93$	-
<i>Yfl</i>	$513.17 \pm 10.22$	$155.95 \pm 5.97$	$68.38 \pm 0.83$	$832.6 \pm 0.67$
<i>Fgl</i>	$471.2 \pm 8.77$	$19.32 \pm 0.84$	$49.70 \pm 0.83$	$593.9 \pm 0.96$

\* «—» - метод не может быть применим, так как дает завышенный результат вследствие побочной реакции между сапонинами и серной кислотой, входящей в состав антронового реактива.

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 реактивом «анисовый альдегид+серная кислота», а также спектры экстрактов при  $\lambda=254$  нм и 550 нм после обработки ТСХ пластины в «TLS Scanner» (CAMAG).

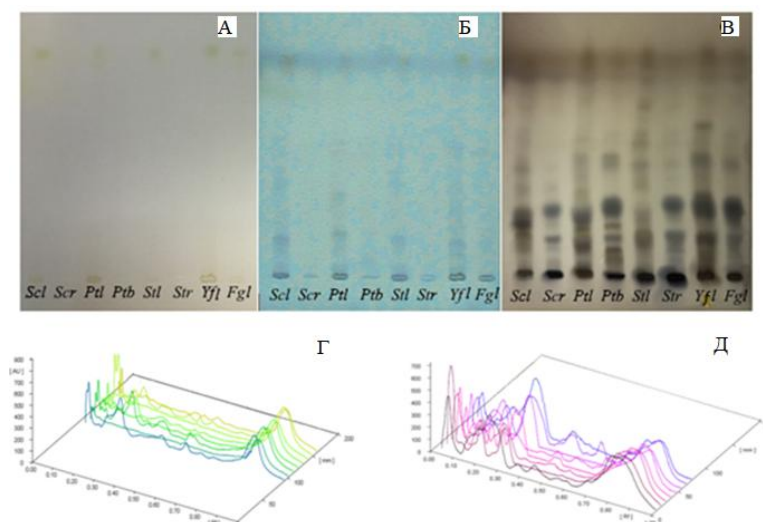


Рисунок 8 – ТСХ пластины анализа метанольных экстрактов растений сем. *Asparagaceae* в видимом свете (А), при детекции УФ-светом с  $\lambda = 254$  нм (Б), в видимом свете после обработки реактивом «анисовый альдегид + серная кислота» (В). Спектры экстрактов при  $\lambda=254$  нм (Г) и при  $\lambda=550$  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 <sub>f</sub>	Содержание*, %	Окраска	Отнесение
<i>Ptl</i>	0.05	13.52	черный	Пигменты, сложные полифенольные соединения
	0.15	11.70	темно-синий	СС в фураностаноловой форме
	0.23	3.20	серо-черный	Н/С
	0.26	14.10	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.35	0.34	серо-черный	Н/С
	0.45	1.88	темно-синий	СС в спиростаноловой форме
	0.52	0.19	серо-черный	Н/С
	0.54	0.57	серо-черный	Н/С
	0.72	4.13	серо-черный	Н/С
	0.81	19.40	серо-черный	Н/С
	0.84	30.94	серо-коричневый	Простые фенольные соединения
<i>Ptb</i>	0.04	6.60	черный	Пигменты, сложные полифенольные соединения
	0.10	4.96	серо-черный	Н/С
	0.13	5.02	серо-черный	Н/С
	0.18	4.43	темно-синий	СС в фураностаноловой форме
	0.23	3.86	серо-черный	Н/С
	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	Н/С
	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	Н/С
	0.13	0.93	серо-черный	Н/С
	0.18	9.89	темно-синий	СС в фураностаноловой 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	Н/С
	0.61	4.69	серо-черный	Н/С
	0.72	2.63	серо-черный	Н/С
	0.81	8.91	серо-черный	Н/С
	0.87	26.91	серо-коричневый	Простые фенольные соединения

<i>Fgl</i>	0.05	5.94	черный	Пигменты, сложные полифенольные соединения
	0.12	0.59	серо-черный	Н/С
	0.18	9.24	темно-синий	СС в фураностаноловой форме
<i>Fgl</i>	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	Н/С
	0.57	0.73	серо-черный	Н/С
	0.74	4.01	серо-черный	Н/С
	0.80	12.19	серо-черный	Н/С
	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 фураностаноловой 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 сапонинами, 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 фураностанола (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 р53-сверхэкспрессирующих клеток [Itabashi *et al.*, 2000]. Также из данного растения выделены стероидные гликозиды, проявляющие значительную цитотоксичность со значениями IC<sub>50</sub> 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 IC<sub>50</sub> 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 A549, двенадцатиперстной кишки человека HuTu 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 A549, HuTu 80, COLO 320 и SW837, с выраженной активностью в отношении клеток опухолей кишечника (значения IC<sub>50</sub> для экстракта листьев *P. tuberosa*: в отношении клеток линий HuTu 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 HuTu 80. Синергетический эффект установлен для 50% комбинаций биназы с экстрактом полиантеса клубненосного и 86% для юкки нитчатой. При совместном действии растительных экстрактов и доксорубина на опухолевые клетки линии HuTu 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 HuTu 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<sup>-</sup> 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 аденокарциномы 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 аденокарциномы легких человека / Н. С. Карамова, П. В. Зеленихин, Н. Б. Мирошник, Иссам 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/доксорубина 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 аденокарциномы 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 последиplomного образования». – М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2016. – Т. 1. – С.194-195.

9. Штырева, В. В. Цитотоксическое действие экстрактов растений семейства *Asparagaceae* на клетки аденокарциномы 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.

Е-mail автора: [yazgulen@mail.ru](mailto: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](mailto:okravz@yandex.ru)