

*На правах рукописи*

**Китаева Мария Петровна**

**Клеточная культура *Rodophyllum peltatum* L.  
как продуцент биологически активных веществ, обладающих  
цитотоксической активностью**

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР)

**Научный руководитель** доктор медицинских наук, главный научный сотрудник Научно-исследовательского центра Медико-биологических проблем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», главный научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории молекулярной фармакологии Научно-исследовательского института трансляционной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет» имени Н.И. Пирогова

**Федотчева Татьяна Александровна**

**Официальные оппоненты** доктор биологических наук, профессор, заведующая группой фенольного метаболизма растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН

**Загоскина Наталья Викторовна**

кандидат биологических наук, доцент, исполняющий обязанности заведующего кафедрой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева»

**Чередниченко Михаил Юрьевич**

**Ведущая организация** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов"

Защита состоится 31 января 2023 года в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 при РХТУ имени Д.И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <https://muctr.ru>.

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
99.0.027.03, к.т.н.



И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** Особую роль в противоопухолевой терапии играют биологически активные вещества, полученные из растений: фенольные соединения, алкалоиды и полисахариды. Источником получения указанных веществ могут быть не только дикорастущие и культивируемые растения, но и суспензионные клеточные культуры, биоинженерные продукты. Растения рода *Podophyllum* - традиционный источник фенольных соединений (лигнанов и флавоноидов) с противоопухолевой активностью. В том числе лигнана подофиллотоксина, который применяется в медицинской практике и как самостоятельный препарат, и как субстрат при получении полусинтетических производных (этопозид, этопозифоса и тенипозид). Указанные вещества применяются при остроконечных генитальных кондиломах, опухолях яичек, болезни Ходжкина и неходжкинских лимфомах, лимфогранулематозе, остром нелимфоцитарном лейкозе, раке легкого, желудка, мочевого пузыря, нейробластоме, опухолях мозга, лимфомах (Машковский, 2010). Масштабный сбор дикорастущих растений для нужд фармации исчерпал их природные запасы (Guo, 2012; Hu, 2016). Введение *P. peltatum* L. в полевую культуру не дает возможности получить необходимое количество подофиллотоксина. Традиционное сырье (корневища с корнями) собирают раз в 4-5 лет. Даже при ежегодном сборе нетрадиционного сырья (листьев) не удастся получить нужное количество подофиллотоксина (Moraes-Cerdeira, 2002; Zheljazkov, 2011; Мурадханов, 2012; Жигунов, 2018; Сапрыкина, 2018). В настоящее время продолжается поиск возможности заменить растения рода *Podophyllum* менее дефицитным растительным (Ardalani, 2017; Hu, 2018; Мурадханов, 2012; Баширова, 2016; Жигунов, 2018; Сапрыкина, 2018) и грибным (Ardalani, 2017) сырьем. Однако в других растениях и грибах содержится меньшее количество подофиллотоксина. Химический синтез подофиллотоксина и его производных оказался слишком трудоемким, длительным и дорогим и не был введен в промышленное производство (Farkya, 2004). В попытке сохранения зарослей растений рода *Podophyllum* и повышения использования исходных растительных ресурсов ученые разных стран (Россия, США, Индия, Китай, Германия, Бразилия и др.) обратились к биотехнологии. Исследования ведутся в разных направлениях: микрклональное размножение (Sagowska, 1997; Moraes-Cerdeira, 1998, 2002; Farkya, 2004; Kim, 2007; Guo, 2012; Kumari, 2016), получение клеточных культур-продуцентов подофиллотоксина (Farkya, 2004; Kumari, 2016; Мурадханов, 2012; Сапрыкина, 2018) и культуры «волосатых корней» (Farkya, 2004; Anbazhagan, 2008), биотрансформация субстратов в подофиллотоксин и его производные (Woerdenbag, 1990; Broomhead, 1991; Uden,

1991, 1995; Farkya, 2004). К настоящему моменту пока не удалось разработать рентабельную биотехнологическую производственную схему получения подофиллотоксина. Продолжается поиск источников фенольных соединений с противоопухолевой активностью, являющихся альтернативой лекарственному растительному сырью.

**Цель и задачи работы.** Цель настоящей работы – исследовать морфологические и физиологические особенности, состав и содержание фенольных соединений, в том числе подофиллотоксина, а также цитотоксическую активность суспензионных клеточных культур *Podophyllum peltatum* L. как источников сырья для получения противоопухолевых лекарственных препаратов, являющихся альтернативой лекарственному растительному сырью.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать морфологические характеристики и физиологические особенности роста суспензионных культур, полученных из почки, плода и корня растения.
2. Выбрать способ экстракции, позволяющий извлечь из биотехнологического сырья целевые фенольные соединения, определяющие цитотоксическую активность.
3. Выбрать метод определения цитотоксической активности.
4. Провести сравнительную оценку цитотоксической активности экстрактов клеточных культур и органов растений.
5. Исследовать состав и содержание фенольных соединений суспензионных культур и сравнить его с составом и содержанием фенольных соединений каллусных культур и органов растения.
6. Выбрать штамм суспензионной культуры, перспективный с точки зрения получения противоопухолевого лекарственного сырья, и провести идентификацию содержащихся в нем фенольных соединений на протяжении всего срока культивирования.

**Методология и методы исследования.** В работе использованы физические (световая микроскопия), физико-химические (ультраэффективная жидкостная хроматография), а также биологические методы (субкультивирование в закрытой системе в непрерывном режиме, расчет ростовых индексов, МТТ- и резаурин-тесты). Статистическая обработка экспериментальных данных проведена с использованием программы Microsoft Excel, сравнение групп данных - с применением U-критерия Манна-Уитни.

**Научная новизна работы.** Впервые описаны новые типы сырья с противоопухолевой активностью – суспензионные культуры *P. peltatum* L. ФГБНУ

ВИЛАР. Впервые обоснован выбор резазурин-теста (по сравнению с МТТ-тестом) для оценки цитотоксической активности экстрактов *P. peltatum* L. в отношении клеток *HeLa*. Для извлечения комплекса фенольных соединений из суспензионной культуры *P. peltatum* L. впервые был использован 80 % ацетон. Цитотоксический эффект ацетоновых экстрактов оказался выше, чем при использовании таких экстрагентов, как хлороформ, метиловый и этиловый спирт, фосфатный буферный раствор. Впервые в экстрактах органов растения и культур *P. peltatum* L. были идентифицированы производные эллаговой, галловой и кофейной кислот, проведено сравнение выхода подофиллотоксина с выходом других фенольных соединений. Впервые были получены данные по изменению состава фенольных соединений в суспензионной культуре из корня *P. peltatum* L. в зависимости от срока культивирования.

**Практическая значимость работы.** На основе полученных результатов даны критерии оптимизации процесса культивирования исследуемых культур клеток, предложены варианты усовершенствования клеточной культуры *P. peltatum* L. как продуцента фенольных соединений с цитотоксической активностью, предложен оптимальный способ экстракции и определения цитотоксической активности экстрактов. Экспериментальные данные и методические приемы, используемые в работе, введены в спецкурсы для студентов фармацевтического и медико-биологического факультетов РНИМУ имени Н.И. Пирогова.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Обнаружено, что клетки суспензионных культур из почки и корня близки по размеру, форме, располагаются у дна колбы, клетки из плода меньшего размера, круглые, равномерно распределены по всему объему питательной среды. Жизнеспособность клеток 14-суточных культур выше жизнеспособности клеток 28-суточных культур. Прирост биомассы суспензионных культур из плода и почки происходит быстрее, чем суспензионной культуры из корня.
2. Выявлено, что ацетоновые экстракты органов растения и клеточных культур понижают жизнеспособность клеток рака шейки матки *HeLa*.
3. В ацетоновых экстрактах органов растения и суспензионных культур идентифицированы фенольные соединения пяти классов: производные эллаговой, галловой, кофейной кислот, флавоноидов и подофиллотоксина. В каллусных культурах – производные эллаговой, галловой кислот и флавоноидов.
4. Определено, что и 14-, и 28-суточная суспензионная культура клеток, полученная из корня растения, понижает жизнеспособность клеток *HeLa* и при 72, и при 48 часах инкубации. Данная культура отобрана в качестве наиболее

перспективного противоопухолевого биотехнологического сырья, - при всех сроках культивирования в ней продуцируются биологически активные вещества с цитотоксической активностью.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 - Биотехнология по п. 7 (в части: системы выращивания клеточных культур растений и животных для направленного синтеза биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, биологически активных соединений), по п. 9 (в части: оценка качества и безопасности новых видов продуктов, полученных биотехнологическими методами; методы контроля подлинности биотехнологических продуктов).

**Апробация результатов.** Материалы диссертации были представлены на следующих научных конференциях и форумах: VI научная конференция «Молодые ученые и фармация XXI века» (Москва, 2018); Международная научная конференция «Метаболомика и качество жизни» (Москва, 2019); X и XI международный форум "Дни сада в Бирюлево" (Москва, 2019, 2020); VI, VII и VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации" (Электрогорск, 2019, 2020, 2021); VII и VIII научная конференция с международным участием "Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения" (Москва, 2019, 2020); II Международный симпозиум «Innovation in life sciences» (Белгород, 2020); Международная научная конференция "От растения до лекарственного препарата" (Москва, 2020); VIII Всероссийская научная конференция с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2020); XX Всероссийская конференция "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии" (Москва, 2020); III Международная конференция "Гармонизация подходов к фармацевтической разработке" (Москва, 2020); Юбилейная международная научная конференция "90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы" (Москва, 2021); Международная научно-практическая конференция "Разработка лекарственных средств - традиции и перспективы" (Томск, 2021); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Клиническая и экспериментальная фармакология: достижения в науке, практике, образовании» (Курск, 2021); Международная научная конференция «Агробиотехнология-2021» (Москва, 2021); Международная научно-практическая конференция имени Д.И. Менделеева (Тюмень, 2021).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликована 21 печатная работа, в том числе 5 работ в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ, из них 2 печатные работы, входящие в международную реферативную базу данных Scopus, 1 работа, входящая в международную реферативную базу WoS.

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие в разработке методов исследования, в реализации этих методов на протяжении всех этапов исследования, в анализе результатов.

**Достоверность** результатов исследования подтверждается их воспроизводимостью и корреляцией с применением независимых взаимодополняющих методов, а также их согласованностью с известными литературными данными.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.м.н. Федотчевой Т.А., заведующему лабораторией атомарно-молекулярной биорегуляции и селекции ФГБНУ ВИЛАР, к.с.-х.н. Балееву Д.Н., заместителю директора по науке ФГБНУ ВИЛАР, д.фарм.н., проф. Мизиной П.Г., к.б.н. Савиной Т.А., а также сотрудникам ФГБНУ ВИЛАР и РНИМУ им. Н.И. Пирогова за помощь и поддержку, ценные замечания и предложения.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 162 страницах печатного текста, состоит из введения, пяти глав, заключения, рекомендаций, выводов, списка литературы и восьми приложений. Работа содержит 7 таблиц, 46 рисунков и фотографий. Список использованной литературы включает 193 работы, в том числе 54 отечественных и 139 зарубежных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы и определены основные направления исследования.

**ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.** Представлен обзор литературных данных по теме исследований. Дана ботаническая характеристика растения *P. peltatum* L., описаны его экологические особенности. Показана значимость *P. peltatum* L. для современной фармацевтической промышленности, прежде всего, в качестве источника получения подофиллина, - комплексного экстракта с противоопухолевым эффектом. Рассмотрены преимущества биотехнологического сырья (калусных и суспензионных культур) перед растительным сырьем (корневища с корнями, листья) *P. peltatum* L. Указаны другие биотехнологические подходы к получению биологически активных веществ с цитотоксической активностью. Охарактеризованы основные противоопухолевые вещества, обнаруженные в *P. peltatum* L. (алкалоиды,

фенольные соединения). Приведены изученные механизмы противоопухолевого действия указанных веществ. Описаны физико-химические методы определения химического состава экстрактов *P. peltatum* L., а также способы оценки их цитотоксической активности.

**ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Объектами исследования являлись органы растения (корневища с корнями, листья) *P. peltatum* L., каллусные и суспензионные культуры, полученные из корня, почки и плода *P. peltatum* L. Растение и клеточные культуры входят в состав биоколлекций ФГБНУ ВИЛАР.

**Ростовые параметры суспензионных культур** оценивались на основе веса биомассы клеточных культур, определенного при девяти сроках культивирования: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45. Были рассчитаны: индекс роста, абсолютная и удельная скорость роста, время удвоения биомассы, экономический коэффициент.

**Морфологические характеристики клеток суспензионных культур** оценивались методом оптической микроскопии с использованием камеры Горяева. Цвет клеточных культур оценивался визуально на белом фоне.

**Жизнеспособность клеток суспензионных культур** определялась методом окрашивания метиленовым синим с последующим подсчетом живых неокрашенных и мертвых окрашенных клеток с использованием камеры Горяева.

**Экстракты органов растения и клеточных культур** были получены с использованием шести экстрагентов: калий-фосфатный буферный раствор, этиловый и метиловый спирт, хлороформ, ацетон, этилацетат. Первые четыре экстрагента приведены в научной литературе как экстрагенты, способные наиболее полно извлечь подофиллотоксин из растительного и биотехнологического сырья, ацетон - как экстрагент, способный извлечь комплекс фенольных соединений, этилацетат - как растворитель, использующийся для проведения дополнительной очистки от примесей при экстракции калий-фосфатным буферным раствором.

**Изучение химического состава экстрактов методом тонкослойной хроматографии** проводили на пластинках Silufol UV 254 с использованием элюирующей системы этиловый спирт : хлороформ и детекции серной кислотой. Идентификацию проводили по положению зоны адсорбции на хроматограмме и цвету зоны адсорбции при просмотре в ультрафиолетовом свете, при детекции по сравнению со стандартным веществом - подофиллотоксином.

**Изучение химического состава экстрактов методом газовой хроматографии** проводили на хромато-масс-спектрометре VarianGC-220MS (Varian Medical Systems UK, Великобритания) с масс-анализатором типа «ионная ловушка»



на кварцевой капиллярной колонке FactorFOUR VF-5ms с использованием в качестве газа-носителя гелия. Идентификацию разделенных компонентов проводили с использованием библиотеки масс-спектров. Качественную нормализацию осуществляли методом нормализации по площади пиков.

**Изучение химического состава экстрактов методом ультраэффективной жидкостной хроматографии** проводили на хроматографической системе Acquity UPLC (Waters Corporation, США), оснащенной детектором с фотодиодной матрицей. Использовали хроматографическую колонку Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (Waters, Ирландия) с предколонкой Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (Waters, Ирландия). Подвижная фаза (А) - 0,1 % муравьиная кислота в деионизованной воде, подвижная фаза (Б) – 100 % ацетонитрил. Элюирование в градиентном режиме. Скорость потока – 0,25 мл/мин. Детектирование при 280 нм ± 2 нм, запись спектра в диапазоне длин волн 190-500 нм. Инжектируемый объем образца – 1 мкл.

**Получили фибробласты. Культивировали клеточные линии рака шейки матки *HeLa* и лейкемические клетки *K562*** с использованием CO<sub>2</sub>-инкубатора N-Biotek (N-Biotek, Корея), ламинарного бокса SafeFastElite (Faster S.r.l., Dasit Group, Италия). Жизнеспособность, размеры и форму клеток, степень прикрепленности к поверхности культурального флакона оценивали с помощью инвертированного микроскопа Carl Zeiss (Zeiss AG, Германия) и камеры Горяева для счета форменных элементов крови (АО «Красногвардеец», Россия).

**Цитотоксическую активность экстрактов** органов и клеточных культур *P. peltatum* L. в отношении фибробластов, клеток *HeLa* и *K562* определяли двумя методами: МТТ- и резазурин-тестами. Жизнеспособность клеток определяли способом нормализации относительно отрицательного контроля (вместо экстракта – экстрагент), который принимали за 100 %. Жизнеспособность клеток 75 % считали граничным значением цитотоксической активности; 50 % и ниже – значениями, показывающими выраженный цитотоксический эффект.

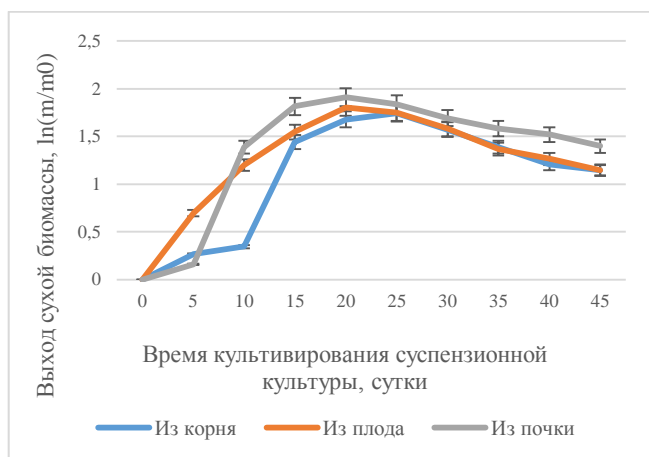
**Статистическую обработку результатов экспериментов**, полученных не менее чем в пяти повторностях, проводили с использованием программы Microsoft Excel. Значимость различий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**ГЛАВА 3. Усовершенствование клеточных культур *P. peltatum* L.** Период роста первичных каллусных культур из корня, почки и плода *P. peltatum* L. длился 60 суток. Для получения суспензионных культур каллусные клетки перенесли на жидкую питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением 3 % сахарозы,

нафтилуксусной и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислот. Через 4-6 недель образовались суспензионные культуры (индекс роста - 2,7; абсолютная скорость роста - 0,37 г/сут). Методом тонкослойной хроматографии идентифицировали следовые количества подофиллотоксина в культурах из почки и плода (Савина, 2003). Замена в составе питательной среды 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на кинетин и добавление никотиновой кислоты, Са-пантотената, тиамин изменило ростовые процессы клеток суспензионных культур (рис. 1, табл. 1).

Рисунок 1 - Логарифмическая кривая роста суспензионных культур *P. peltatum* L.\*



\*По оси ординат отложены значения натуральных логарифмов отношения ( $m/m_0$ ), где  $m$  и  $m_0$  – масса высушенной биомассы суспензионной культуры при данном сроке культивирования и начальная масса высушенной биомассы суспензионной культуры соответственно.

Таблица 1 - Ростовые параметры суспензионных культур *P. peltatum* L.

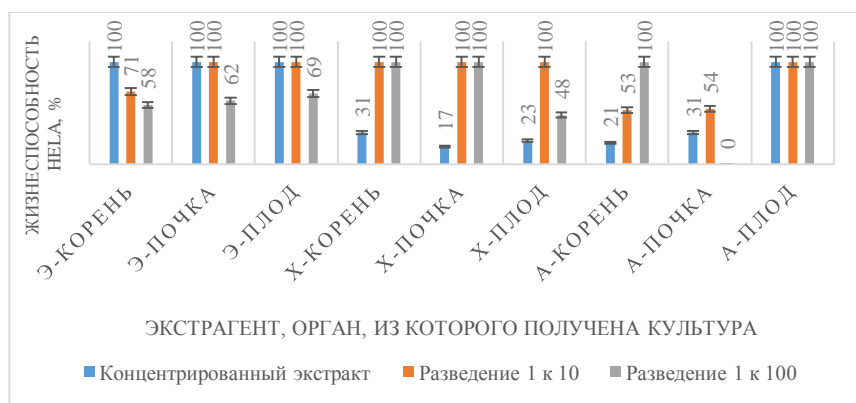
Параметр	Суспензионная культура		
	Из плода	Из почки	Из корня
Индекс роста, усл. ед.	5,08	4,50	3,33
Абсолютная скорость роста, г/сут	0,26	0,36	0,26
Удельная скорость роста, сут <sup>-1</sup>	0,25	0,23	0,13
Время удвоения биомассы, сут	2,77	3,01	5,32
Экономический коэффициент, усл. ед.	0,18	0,24	0,22

Данные по особенностям развития суспензии клеток в питательной среде подтверждаются индексами роста, удельными скоростями роста и временем удвоения биомасс (табл. 1). Все эти биотехнологические параметры показывают медленное развитие культуры из корня, быстрое развитие культуры из плода *P. peltatum* L.

Суспензионные культуры из корня и почки – крупнодисперсные, располагаются у дна колбы. Клетки из корня ярко-желтого цвета в 14 суток, ярко-желтого или темно-коричневого цвета в 28 суток, от 70×70 мкм до 100×100 мкм, круглые и овальные. Клетки из почки ярко-желтого цвета в 14 суток и темно-коричневого цвета в 28 суток, от 75×75 мкм до 75×100 мкм, овальные, удлиненные. Суспензионная культура из плода – мелкодисперсная, равномерно распределена по объему питательной среды. Клетки коричневатого-желтого цвета в 14 суток, болотного

цвета в 28 суток, 50×50 мкм, круглые. Жизнеспособность клеток в 14 суток составляет 90-100 %, в 28 суток - 70-80 %.

**ГЛАВА 4. Цитотоксическая активность экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L.** При проведении исследования условий экстракции были апробированы десять вариантов экстрагентов: калий-фосфатный буферный раствор (pH=7.0); калий-фосфатный буферный раствор (pH=7.0) с последующей экстракцией этилацетатом; метиловый спирт 100 %; метиловый спирт 80 %; метиловый спирт 80 % с последующей экстракцией дихлорметаном; этиловый спирт 96 %; этиловый спирт 50 %; этилацетат; хлороформ; ацетон 80 %. Экстракты на основе этилацетата, хлороформа, ацетона 80 % показали значимую цитотоксическую активность (рис. 2). Рисунок 2. Жизнеспособность клеток *HeLa* при инкубации с экстрактами 14-суточных суспензионных культур в течение 48 часов\*



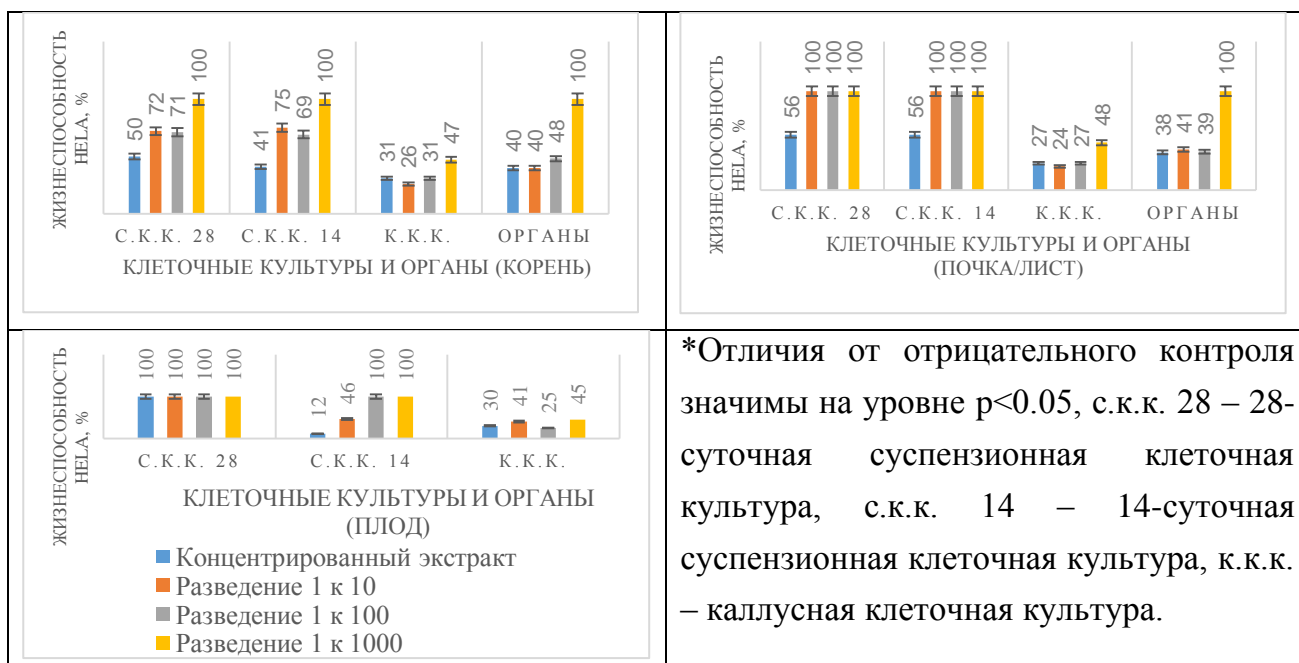
\*Отличия от отрицательного контроля значимы на уровне  $p < 0.05$ , Э – этилацетат, Х – хлороформ, А -ацетон 80 %.

Было обнаружено, что наибольшей цитотоксической активностью обладают экстракты 14-суточной культуры на основе ацетона 80 % и хлороформа. Причем ацетоновые экстракты культуры из корня и почки понижали жизнеспособность клеток *HeLa* при первых двух разведениях, хлороформные – только при использовании концентрированного экстракта. Поэтому ацетон 80 % был выбран в качестве основного экстрагента для проведения дальнейших исследований.

Цитотоксическая активность всех экстрактов суспензионных культур в отношении *HeLa* определялась двумя методами: МТТ- и резазурин-тестом. Было обнаружено, что две группы данных по жизнеспособности клеток - визуальные (определяемые через инвертированный микроскоп) и инструментальные (оптическая плотность, измеряемая на спектрофотометре), - не согласуются друг с другом при использовании МТТ-теста и согласуются при использовании резазурин-теста. Поэтому резазурин-тест был выбран в качестве основного метода определения цитотоксической активности экстрактов всех объектов (органы, каллусные и суспензионные культуры) в отношении всех трех клеточных линий (*HeLa*, *K562*, фибробласты). Обнаружено, что ацетоновые экстракты суспензионных культур

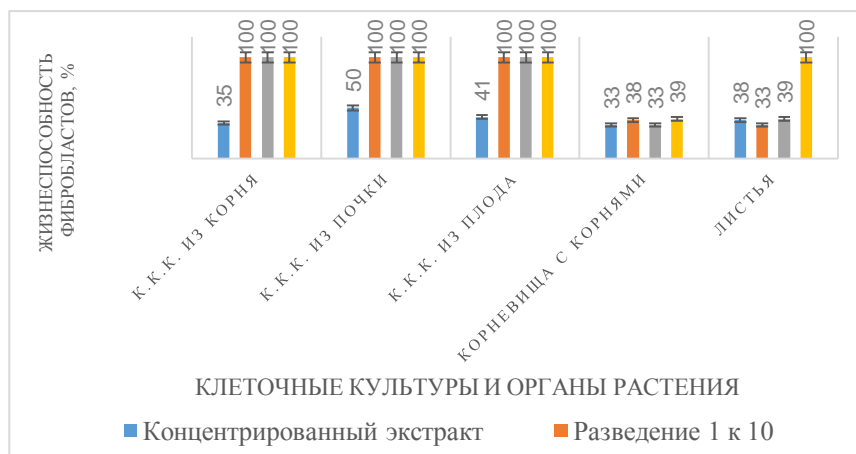
проявляют цитотоксическую активность только в отношении клеток *HeLa* (рис. 3), каллусных культур – в отношении *HeLa* и фибробластов (рис. 3 и 4), органов – в отношении всех трех клеточных линий (рис. 3, 4 и 5).

Рисунок 3. Жизнеспособность клеток *HeLa* при инкубации с ацетоновыми экстрактами клеточных культур и органов *P. peltatum* L. в течение 72 часов\*



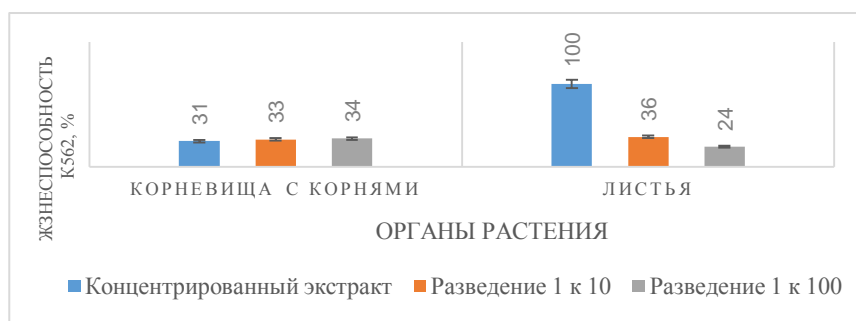
\*Отличия от отрицательного контроля значимы на уровне  $p < 0.05$ , с.к.к. 28 – 28-суточная суспензионная клеточная культура, с.к.к. 14 – 14-суточная суспензионная клеточная культура, к.к.к. – каллусная клеточная культура.

Рисунок 4. Жизнеспособность фибробластов при инкубации с ацетоновыми экстрактами органов и каллусных культур *P. peltatum* L. в течение 72 часов



\*Отличия от отрицательного контроля значимы на уровне  $p < 0.05$ , к.к.к. – каллусная клеточная культура.

Рисунок 5. Жизнеспособность клеток *K562* при инкубации с ацетоновыми экстрактами органов *P. peltatum* L. в течение 72 часов\*



\*Отличия от отрицательного контроля значимы на уровне  $p < 0.05$ .

Резазурин-тест экстрактов культуральной жидкости суспензионных клеточных культур не показал цитотоксическую активность. На основе этих результатов можно утверждать, что цитотоксически активные фенольные соединения находятся, прежде всего, внутри растительных клеток и не выделяются во внеклеточную жидкость.

**ГЛАВА 5. Физико-химический анализ экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L.** Тонкослойная хроматография растворов сухих экстрактов в 96 % этиловом спирте показала, что полученные образцы содержат большое количество соединений. В ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на пластинках были обнаружены зоны адсорбции с  $R_f$  около 0,44-0,47, соответствующие по положению и окраске (светло-голубая флюоресценция) подофиллотоксину. Судя по интенсивности окраски зон адсорбции, наибольшим выходом подофиллотоксина характеризуются экстракты, полученные с помощью хлороформа, этилацетата и ацетона.

**Методом газовой хроматографии** охарактеризован химический состав летучих веществ, входящих в состав метанольного экстракта суспензионной культуры *P. peltatum* L. Определено, что экстракты 14- и 28-суточных суспензионных культур *P. peltatum* L. содержат большое количество летучих веществ: азотсодержащих соединений и алкалоидов, эфиров жирных кислот, стероидов, углеводов, гликозидов, углеводов, кетонов и др. Культуры, полученные из корня, содержат наибольшее количество разных веществ в количестве более 1 % от общей массы.

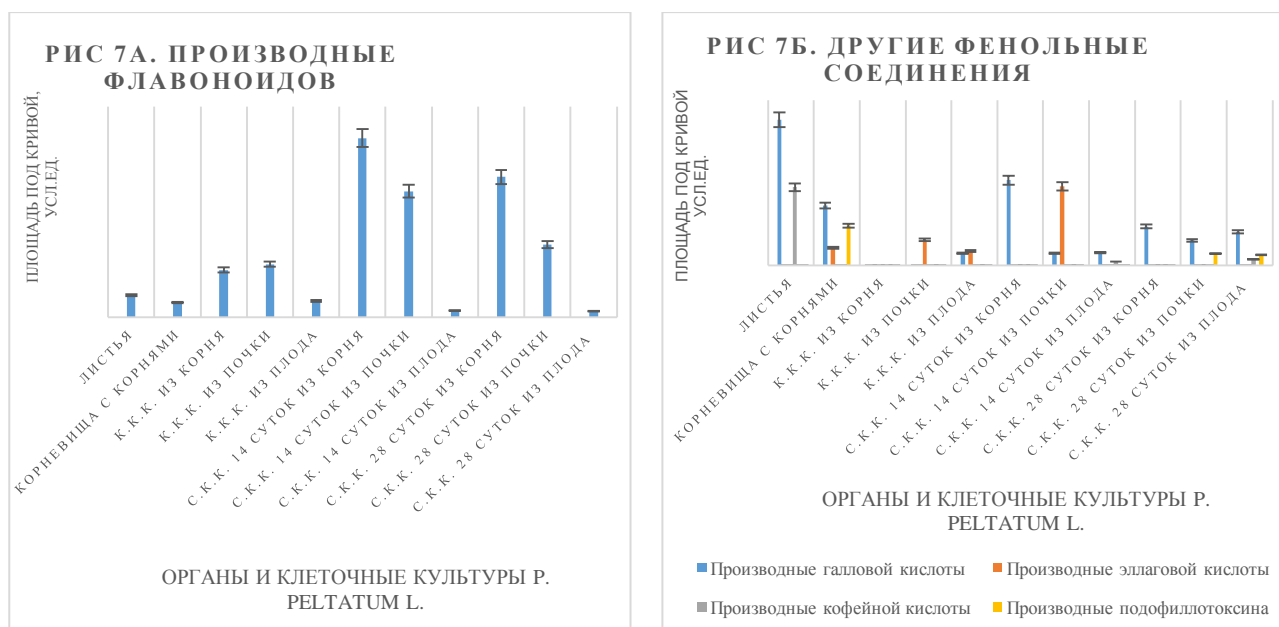
**Методом ультраэффективной жидкостной хроматографии** в ацетоновых экстрактах органов растения и клеточных культур *P. peltatum* L. были идентифицированы фенольные соединения пяти классов: производные эллаговой, кофейной и галловой кислот, подофиллотоксина и флавоноидов (рис. 7). Согласно научным данным противоопухолевую активность могут проявлять соединения любых пяти перечисленных классов: производные подофиллотоксина (Li, 2018; Chen, 2021), эллаговой (Guo, 2016; Li, 2018; Pani, 2020; Chen, 2021), кофейной (Tyszka-Czochara, 2017, 2018; Koraneekit, 2018), галловой (Hu, 2013; Zhao, 2013; Tan, 2015; Shi, 2016; Park, 2017; Aborehab, 2019) кислот, флавоноидов (Liu, 2020; Pani, 2020; Zhang, 2020;

Castillo-Bautista, 2021; Chen, 2021; Kluska, 2021; Luo, 2021; Pandey, 2021; Panji, 2021; Wang, 2021; Yu, 2021).

Наибольшее разнообразие групп фенольных соединений было обнаружено в экстрактах из органов интактного растения: в листьях были идентифицированы производные кофейной, галловой кислот и флавоноидов, в корневищах с корнями – производные эллаговой, галловой кислот, флавоноидов и подофиллотоксина (рис. 6).

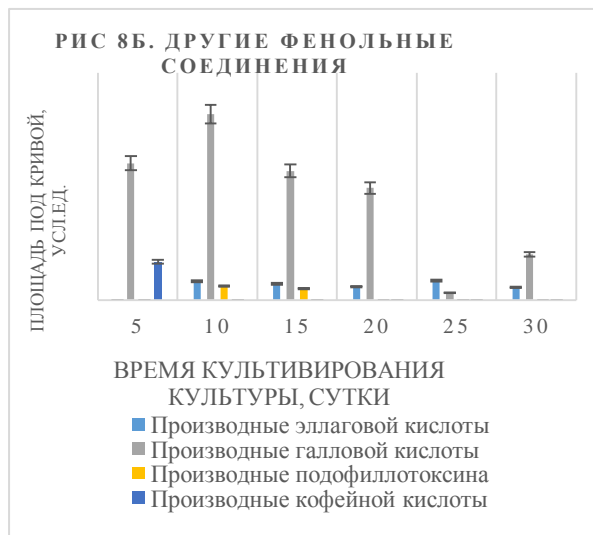
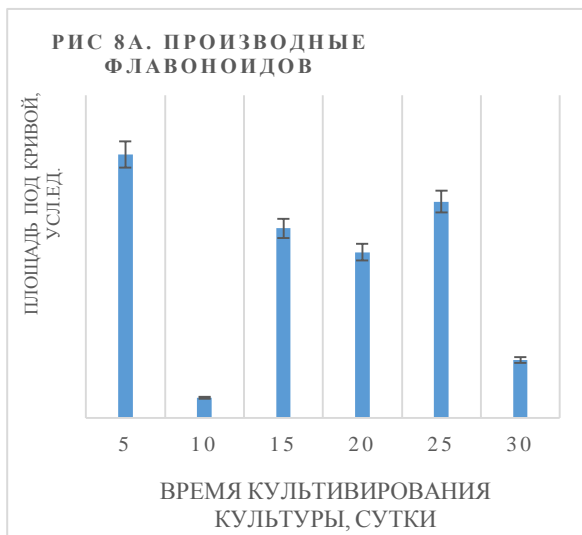
На основе полученных в исследовании данных (рис. 7) клеточные культуры из корня были выбраны в качестве наиболее перспективных объектов - потенциальных источников сырья с противоопухолевой активностью. Проведен анализ химического состава экстрактов этих культур на разных сроках культивирования (рис. 7).

Рисунок 6. Основные классы фенольных соединений ацетоновых экстрактов клеточных культур и органов *P. peltatum* L.\*



\*с.к.к. – суспензионная клеточная культура, к.к.к. – каллусная клеточная культура.

Рисунок 7. Изменение состава основных классов фенольных соединений ацетоновых экстрактов суспензионной культуры из корня в процессе культивирования



## РЕКОМЕНДАЦИИ

На основе данных по ростовым параметрам суспензионных культур *P. peltatum* L. ФГБНУ ВИЛАР предложены рекомендации по оптимизации режима и условий культивирования. На основе данных по цитотоксической активности экстрактов из десяти способов экстракции выбрана экстракция ацетоном 80 % и предложена в качестве основной методики извлечения экстрактивных веществ из органов растения и клеточных культур *P. peltatum* L.

На основе анализа химического состава экстрактов органов и клеточных культур предложены способы усовершенствования суспензионных культур *P. peltatum* L. как продуцентов фенольных соединений с цитотоксической активностью, которые могут применяться в онкологической практике.

Благодаря оптимизации процесса получения экстрактов культур *P. peltatum* L и возможностью его масштабирования, предложен альтернативный способ получения экстрактов с противоопухолевой активностью, позволяющий экономить природные и экологические ресурсы.

Результаты исследования внедрены в базовые и факультативные курсы фармацевтического и медико-биологического факультетов РНИМУ имени Н.И. Пирогова.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что клетки суспензионных культур из почки и корня близки по размеру, форме, располагаются у дна колбы, клетки из плода меньшего размера, круглые, равномерно распределены по всему объему питательной среды. Жизнеспособность клеток 14-суточных культур выше жизнеспособности клеток 28-

суточных культур. Прирост биомассы суспензионных культур из плода и почки происходит быстрее, чем суспензионной культуры из корня.

2. Благодаря высокой цитотоксической активности ацетоновых экстрактов в отношении клеток *HeLa* ацетон 80 % выбран в качестве основного экстрагента для извлечения фенольных соединений с цитотоксической активностью.

3. На основе сопоставления визуальных данных, полученных методом световой микроскопии, с результатами измерения оптической плотности, полученными на спектрофотометре, из двух методов определения цитотоксической активности (МТТ- и резазурин-тесты) резазурин-тест, как показывающий сходные результаты, выбран в качестве основного метода.

4. Ацетоновые экстракты органов растения подавляют жизнеспособность всех изученных клеток (*HeLa*, *K562* и фибробласты), каллусных культур – только клеток *HeLa* и фибробластов, суспензионных культур – только клеток *HeLa*.

5. В ацетоновых экстрактах органов растения и суспензионных культур идентифицированы фенольные соединения пяти классов: производные эллаговой, галловой, кофейной кислот, флавоноидов и подофиллотоксина. В каллусных культурах – производные эллаговой, галловой кислот и флавоноидов.

6. Определено, что и 14-, и 28-суточная суспензионная культура клеток, полученная из корня растения, понижает жизнеспособность клеток *HeLa* и при 72, и при 48 часах инкубации. Данная культура отобрана в качестве наиболее перспективного противоопухолевого биотехнологического сырья, - при всех сроках культивирования в ней продуцируются биологически активные вещества с цитотоксической активностью.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Китаева М.П. Изучение химического состава летучих веществ клеточной культуры *Podophyllum peltatum* / М.П. Китаева, Я.Ф. Копытько, Т.А. Федотчева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2020. - Т. 23. - № 5. - С. 45-53.

2. Китаева М.П. Влияние условий экстрагирования на состав смолы подофиллин, полученной из суспензионной культуры *Podophyllum peltatum* / М.П. Китаева, Т.А. Савина, Т.А. Федотчева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2020. - Т. 23. - № 7. - С. 30-34.

3. Китаева М.П. Состояние рынка традиционных противоопухолевых лекарственных средств растительного происхождения / М.П. Китаева // Разработка и



регистрация лекарственных средств. Научно-производственный журнал. - 2020. - Том 9. - № 4. - Приложение 1. - С. 80.

4. Китаева М.П. Цитотоксическая активность экстрактов, полученных из интактного растения и каллусной клеточной культуры *Podophyllum peltatum*, в отношении лейкемических клеток человека / М.П. Китаева, Т.А. Федотчева, А.В. Семейкин // Труды государственного Кубанского аграрного университета. - 2021. - № 4 (91). - С. 147-151.

5. Китаева М.П. Цитотоксическая активность экстрактов, полученных из интактного растения и клеточной культуры *Podophyllum peltatum*, в отношении клеток рака шейки матки / М.П. Китаева, А.А. Аксенов, Т.А. Федотчева, А.В. Семейкин, Н.Л. Шимановский // Химико-фармацевтический журнал. - 2022. - № 3(56). - С. 29-33.

#### **Публикации в других изданиях**

1. Китаева М.П. Современные подходы к получению подофиллотоксина / М.П. Китаева, Т.А. Федотчева, Т.А. Савина // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: Тезисы Международной научно-практической конференции. - М.: РУДН, 2018. – С. 93-94.

2. Китаева М.П. Современные биотехнологические подходы к получению подофиллотоксина / М.П. Китаева, Т.А. Савина, Т.А. Федотчева // Сборник трудов Шестой научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые и фармация XXI века». – М: ФГБНУ ВИЛАР, 2018. – С. 11-17.

3. Китаева М.П. Изучение клеточной культуры *Podophyllum peltatum* методом тонкослойной хроматографии / М.П. Китаева, Т.А. Федотчева, Т.А. Савина // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: сборник тезисов II Международной научно-практической конференции. - М.: РУДН, 2019. – С. 146-147.

4. Китаева М.П. Суспензионная клеточная культура как источник получения подофиллотоксина / М.П. Китаева, Т.А. Федотчева, Т.А. Савина // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции. В 2 томах. - Т. 1. - Орехово-Зуево: ГГТУ, 2019. – С. 89-91.

5. Китаева М.П. Современные методы анализа лекарственного растительного сырья, содержащего подофиллотоксин / М.П. Китаева, Т.А. Федотчева // VII научная конференция с международным участием "Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения": сборник научных трудов. - М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2019. - С. 202-207.

6. Китаева М.П. Лекарственное растительное сырье как источник получения противоопухолевых препаратов / М.П. Китаева // Innovations in life sciences: сборник материалов II международного симпозиума. – Белгород: ИД «БелГУ» НИУ «БелГУ», 2020. - С. 142-143.
7. Китаева М.П. Микроскопический анализ суспензионной клеточной культуры *Podophyllum peltatum* / М.П. Китаева, Т.А. Федотчева // Международная научная конференция "От растения до лекарственного препарата". Сборник научных трудов. - М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2020. - С. 165-170.
8. Китаева М.П. Исследование суспензионной клеточной культуры *Podophyllum peltatum* методом оптической микроскопии / М.П. Китаева, Т.А. Федотчева // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: 20-я Всероссийская конференция молодых учёных, сборник тезисов докладов (Москва, 27-29 октября 2020 г.). – М.: ФГБНУ ВНИИСБ, 2020. - С. 65.
9. Китаева М.П. Состояние рынка традиционных противоопухолевых лекарственных средств растительного происхождения / М.П. Китаева // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: сборник тезисов III Международной научно-практической конференции. – М.: РУДН, 2020. - С. 97-99.
10. Китаева М.П. Выбор метода для определения цитостатического действия экстрактов клеточной культуры *Podophyllum peltatum* / М.П. Китаева // Известия ГГТУ. Медицина. Фармация. Научно-практический журнал. - 2020. - № 4. - С. 152.
11. Китаева М.П. Берберин - биологически активное вещество с цитостатическими свойствами / М.П. Китаева // Сборник трудов Международной научной конференции молодых ученых "Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения". М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2020. - С. 385-392.
12. Кабанов Д.С. Использование желтого тетразолия в исследовании цитотоксического действия биологически активных веществ растений / Д.С. Кабанов, М.П. Китаева, Т.А. Федотчева // Сборник материалов юбилейной международной научной конференции "90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы". - М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2021. - С. 607-613.
13. Китаева М.П. Цитотоксическая активность комплексных экстрактов фенольных соединений, полученных из каллусных клеточных культур *Podophyllum peltatum*, в отношении лейкемических клеток человека / М.П. Китаева, Т.А. Федотчева, А.В. Семейкин // Разработка лекарственных средств - традиции и перспективы. Международная научно-практическая конференция (г. Томск, 13-16 сентября 2021 года): сборник материалов. - Томск: Изд-во СибГМУ, 2021. - С. 132-134.

14. Китаева М.П. Фенольные соединения, содержащиеся в клеточных культурах *Podophyllum peltatum* ФГБНУ ВИЛАР / М.П. Китаева, А.А. Аксенов // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: сборник материалов VIII Всероссийской научно-технической конференции с международным участием, посвященной Году науки и технологий (26 ноября 2021 года). – Орехово-Зуево: ГГТУ, 2021. — С. 137-141.
15. Кузнецова В.О. Алкалоиды, содержащиеся в растениях рода *Podophyllum* / В.О. Кузнецова, М.П. Китаева // Сборник материалов Международной научной конференции молодых ученых "Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения". - М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2021. С. 266-276.
16. Китаева М.П. Цитотоксическая активность ацетоновых экстрактов суспензионной культуры *Podophyllum peltatum* в отношении клеток *HeLa* / М.П. Китаева // Материалы международной научно-практической конференции имени Д.И. Менделеева, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Р.З. Магарила. Том 1. Химия и химическая технология. Биотехнология и продовольственная безопасность Энергетика, электротехника и приборостроение. - Тюмень: ТИУ, 2022. - С. 347-349.