

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных  
и ароматических растений»

На правах рукописи

**Китаева Мария Петровна**

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

1.5.6. Биотехнология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
д.м.н. Федотчева Т.А.

Москва – 2022

## УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

B5 - питательная среда Гамборга

HeLa - линия иммортализованных клеток рака шейки матки человека

K562 - линия лейкемических клеток человека

LSC - метод подсчета сцинтилляций в жидкой фазе

MCAT - малонил-КоА-трансацетилаза

mPMS - 5-метилфеназин метилсульфат

MTT - краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид

MTS - краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум

PMS - метилсульфат 5-метил-феназина

PES - этилсульфат феназина

QSAR-models – модели количественных соотношений между структурой и активностью

SASP - секреторный фенотип, связанный со старением

XTT - краситель 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксамид

WST - красители группы водорастворимых солей тетразолия

WST-1 - краситель группы водорастворимых солей тетразолия натрия 5-(2,4-дисульфофенил)-2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-2Н-тетразолий

2,4-Д - 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

АМФК - 5-аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа

АТФ - аденозинтрифосфат

ВПЧ - вирус папилломы человека

ГЖХ - газожидкостная хроматография

ГЖХ-МС - газожидкостная хроматография с масс-спектрометрией

ГХ - газовая хроматография

ДМСО - диметилсульфоксид

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

К.к.к. – каллусная клеточная культура

ЛРС - лекарственное растительное сырье

НЗР – нет значимых различий

НОК – нет значимых отличий от отрицательного контроля

НУК -  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота

С.к.к. – суспензионная клеточная культура

ТСХ - тонкослойная хроматография

УФ - ультрафиолетовый

УЭЖХ - ультраэффективная жидкостная хроматография

ЦНС - центральная нервная система

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Ботанические и экологические особенности растения <i>P. peltatum</i> L.	14
1.2. <i>P. peltatum</i> L. как лекарственное растение	15
1.3. Каллусные клеточные культуры, полученные из растения <i>P. peltatum</i> L.	18
1.4. Суспензионные культуры, полученные из растения <i>P. peltatum</i> L.	20
1.5. Другие подходы к получению биотехнологического сырья <i>P. peltatum</i> L.	24
1.6. Биологически активные вещества, входящие в состав органов растения и клеточных культур <i>P. peltatum</i> L.	26
1.7. Фенольные соединения <i>P. peltatum</i> L. с цитотоксической активностью	31
1.8. Физико-химические методы анализа фенольных соединений	34
1.9. Методы определения цитотоксической активности веществ	36
Заключение по обзору литературы	45
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. Объекты исследования	46
2.2. Исследование ростовых параметров суспензионных культур	49
2.3. Микроскопическое исследование суспензионных культур	50
2.4. Получение экстрактов органов растения и клеточных культур	51
2.5. Изучение химического состава экстрактов суспензионных культур методом тонкослойной хроматографии	54
2.6. Изучение химического состава экстрактов суспензионных культур методом газовой хроматографии	54
2.7. Изучение химического состава ацетоновых экстрактов методом ультраэффективной жидкостной хроматографии	55

2.8. Определение цитотоксической активности экстрактов клеточных культур МТТ-методом	56
2.9. Определение цитотоксической активности экстрактов клеточных культур резазурин-тестом	59
ГЛАВА 3. Усовершенствование клеточных культур <i>P. peltatum</i> L.	61
3.1. Первичные суспензионные культуры <i>P. peltatum</i> L.	61
3.2. Исследование ростовых параметров суспензионных культур <i>P. peltatum</i> L.	62
3.3. Морфофизиологические особенности суспензионных культур <i>P. peltatum</i> L.	68
Основные выводы по Главе 3	73
ГЛАВА 4. Цитотоксическая активность экстрактов клеточных культур <i>P. peltatum</i> L.	74
4.1. Получение и культивирование клеточных культур <i>HeLa</i> , <i>K562</i> и фибробластов	74
4.2. Получение экстрактов органов растения и клеточных культур <i>P. peltatum</i> L.	76
4.3. Цитотоксическая активность экстрактов органов растения и клеточных культур <i>P. peltatum</i> L.	81
Основные выводы по Главе 4	93
ГЛАВА 5. Физико-химический анализ экстрактов клеточных культур <i>P. peltatum</i> L.	94
5.1. Анализ экстрактов клеточных культур <i>P. peltatum</i> L. методом тонкослойной хроматографии	94
5.2. Анализ экстрактов клеточных культур <i>P. peltatum</i> L. методом газовой хроматографии	95
5.3. Анализ ацетоновых экстрактов органов растения и клеточных культур <i>P. peltatum</i> L. методом жидкостной хроматографии	99

5.4. Анализ ацетоновых экстрактов суспензионных культур, полученных из корня <i>P. peltatum</i> L., методом жидкостной хроматографии	103
Основные выводы по Главе 5	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
РЕКОМЕНДАЦИИ	111
ВЫВОДЫ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114
ПРИЛОЖЕНИЯ	136
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Акт о внедрении в учебный процесс результатов диссертационной (научной) работы	137
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Нормализованные по отрицательному контролю значения жизнеспособности клеток <i>HeLa</i> при инкубации в течение 48 часов с экстрактами суспензионных культур <i>P. peltatum</i> L.	138
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Нормализованные по отрицательному контролю значения жизнеспособности клеток <i>HeLa</i> при инкубации в течение 72 часов с ацетоновыми экстрактами органов и клеточных культур <i>P. peltatum</i> L.	139
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Нормализованные значения жизнеспособности клеток <i>HeLa</i> при инкубации в течении 48 и 72 часов с ацетоновыми экстрактами суспензионных культур <i>P. peltatum</i> L.	140
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Хроматограммы метанольного экстракта <i>P. peltatum</i> L., полученные методом ГЖХ-МС	141
ПРИЛОЖЕНИЕ 6. Хроматограммы ацетоновых экстрактов клеточных культур и органов растения <i>P. peltatum</i> L., полученные методом УЭЖХ	144
ПРИЛОЖЕНИЕ 7. Хроматограммы ацетоновых экстрактов суспензионных культур из корня <i>P. peltatum</i> L. при разных сроках культивирования, полученные методом УЭЖХ	155

ПРИЛОЖЕНИЕ 8. Относительное содержание фенольных соединений в ацетоновых экстрактах суспензионных культур из корня <i>P. peltatum</i> L., идентифицированных как минимум при двух сроках культивирования методом УЭЖХ	161
---	-----

## ВВЕДЕНИЕ

**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 (этопозида, этопфоса и тенипозида). 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 резазурин-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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Ботанические и экологические особенности растения *P. peltatum* L.

*Podophyllum peltatum* L. – растение семейства *Berberidaceae* Juss.

В рамках традиционной классификации род *Podophyllum* подразделяется на десять видов. Девять из них встречаются в тенистых листопадных лесах Юго-Восточной Азии и Гималаях, в том числе в горах на уровне субальпийского пояса на высоте 4500 м над уровнем моря. Один вид рода (*P. peltatum* L.) встречается в широколиственных лесах атлантического побережья востока Северной Америки [6, 13].

Филогеномный анализ, основанный на 63 генах, кодирующих белки пластомного происхождения, подтвердил монофилию подсемейства *Podophylloideae* и двух его основных родов (*Dysosma*, *Diphylleia*), причем *P. peltatum* L. оказался ближе к *Diphylleia*, чем к самому раннему расходящемуся виду группы *Sinopodophyllum hexandrum* [184].

В рамках современной классификации выделяют три рода, связанных с традиционным родом *Podophyllum*: *Podophyllum* L. (включает один вид – *P. peltatum* L.), *Synopodophyllum* T.S. Ying (включает один вид – *P. hexandrum* Royle), *Dysosma* Woodson (включает 7 видов) [13, 159].

*P. peltatum* L. – длиннокорневищное многолетнее тенелюбивое растение. Образует быстро разрастающиеся заросли. Состоит из ползучего, горизонтального, цилиндрического, коленчатого корневища и гладкого, прямостоячего стебля высотой до 50 см и более. На верхушке стебля формируется 2-3 длинночерешковых пальчато-разделенных темно-зеленых листа и одиночный крупный белый цветок до 5 и более см в диаметре. Растение образует плод – сливообразную сочную желтоватую или оранжево-красную ягоду. Плод не дает семена в российских условиях – отмирает на ранних этапах развития [13].

Растение характеризуется длительным периодом вегетации (более 6 месяцев) - с конца апреля и до установления снежного покрова. Образует бутоны

в конце апреля, через неделю после появления побегов. В конце мая или в начале июня зацветает (на две недели) [13].

*P. peltatum* L. обладает высокодекоративными свойствами, представлен в коллекциях ботанических садов Москвы, Санкт-Петербурга, Ростова-на-Дону, Пензы, Петрозаводска, Новосибирска, Екатеринбурга, Уфы, Заполярья [2, 12, 13, 20, 23, 32, 40, 50, 184].

*P. peltatum* L. - микоризное растение. Доля коры в корне составляет 98 % [5].

В присутствии активированного угля получено меньшее количество биомассы *P. peltatum* L. из-за влияния дождевого червя *Lumbricus terrestris* и конкурентного взаимодействия с листьями травянистого растения *Alliaria petiolata*. Без активированного угля не было конкурентного эффекта листьев *A. petiolata*. Содержание азота в листьях было выше, а концентрация CO<sub>2</sub> в листьях была ниже в присутствии *L. terrestris* [76].

Одно из распространенных заболеваний *P. peltatum* L. – повреждение ржавчинными грибами *Puccinia podophylli* (*Allodus podophylli*) семейства *Pucciniaceae* [122].

Исследуются взаимодействия *P. peltatum* L. с эпифитными бактериями [14], влияние животных (белохвостого оленя *Odocoileus virginianus* и енотов *Procyon lotor*) на расселение семян растения [128].

Листья и корневища с корнями токсичны из-за содержащихся в них фенольных соединений и алкалоидов. Плоды, содержащие витамины, используются для приготовления варенья [13].

### **1.2. *P. peltatum* L. как лекарственное растение**

В 60-80-х годах XX века проводились исследования растений рода *Podophyllum* в Ленинградской, Московской, Львовской, Полтавской областях, в Крыму, в Лимбажском районе Латвийской ССР [26, 28]. Был изучен химический состав корневищ с корнями и листьев растений этого рода [28].

Фармакопейная статья ФС 42-1475-89 «Подофилла корневища с корнями» [51], изданная в 1989 году, - последнее официальное российское издание, в котором рассматривался *P. peltatum* L. и сырье из него. Лекарственное растительное сырье (ЛРС) «Подофилла корневища с корнями» - это куски горизонтальных цилиндрических красно-бурых снаружи, беловатых на изломе корневищ длиной около 10 см и до 1 см в поперечнике, со сладковатым вкусом, оставляющим горьковато-острое послевкусие, без запаха [26].

Из корневищ с корнями *P. peltatum* L. получают подофиллин (*Podophyllum*) - смолу подофилла (*Resina Podophylli*) [26]. Подофиллин есть в государственной фармакопее СССР VII (1934 год, статья 425) [9] и VIII (1952 год, статья 452) [10]. По данным фармакопей СССР [9, 10] и фармакопейной статьи [51] подофиллин – это желтоватый или буровато-серый аморфный порошок, который получают в результате осаждения водой спиртового экстракта. Он имеет своеобразный аромат и горький вкус. Плохо растворим в воде, эфире и сероуглероде. Хорошо растворим в спирте, горячих едких щелочах и аммиаке.

Испытания сырья на подлинность: окрашивание раствора хлорного железа в бурый цвет, осаждение спиртового раствора подофиллина водой.

Испытание сырья на чистоту (свобода от примесей *P. hexandrum* Royle): при добавлении раствора основного ацетата свинца получают оранжево-желтый осадок (*P. hexandrum* Royle дает в такой реакции красно-оранжевый осадок); к спиртовому раствору препарата добавляют концентрированную серную кислоту, получая желтое или зелено-желтое окрашивание (*P. hexandrum* Royle дает красно-бурое окрашивание).

Количественное определение подофиллина – извлечение хлороформом и затем петролейным эфиром. Хранится подофиллин по Списку Б (с осторожностью) в хорошо закупоренной банке оранжевого стекла. Высшая разовая доза подофиллина составляет 0,1 г, высшая суточная доза – 0,3 г.

За рубежом *P. peltatum* L. представлен в Немецкой гомеопатической фармакопее 1985 и 2000 годов [85, 86], фармакопеех США USP 32-NF 25 и 32-



NF-27 [172, 173], французской фармакопее 1989 года [138]. В американских фармакопеех [85, 86], британской фармакопее 2009 года [156] и фармакопее Аргентины 2003 года [83] есть статьи по подофиллину.

Другие способы идентификации экстракта *P. peltatum* L. в зарубежных фармакопеех: получение красного окрашивания раствора при добавлении резорцинола или соляной кислоты [85]; получение красного окрашивания при добавлении цинка или магния и соляной кислоты [85, 86]; тонкослойная хроматография на пластинках, рассчитанных на длину волны 254 нм [85, 86].

Основное действующее вещество подофиллина - фенилтетрагидронафталиновый лигнан подофиллотоксин (рис. 1.1.) [3].

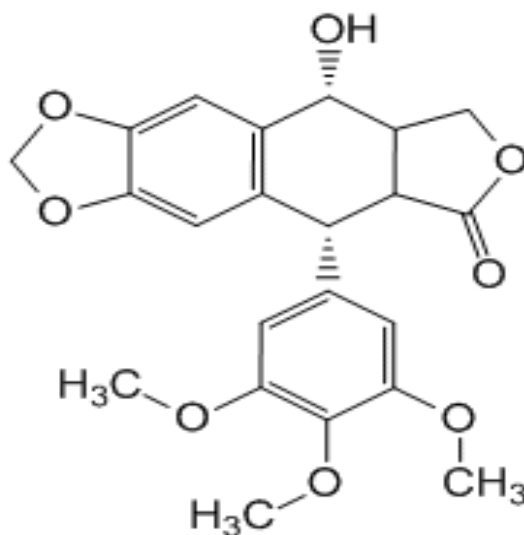


Рисунок 1.1. – Структурная формула подофиллотоксина [139]

Лекарственные препараты этопозид, этопофос и тенипозид – полусинтетические производные подофиллотоксина [25, 48]. Они применяются при раке легкого, желудка, мочевого пузыря, мозга, яичек, нейробластоме, болезни Ходжкина, лимфомах, лимфогранулематозе, остром нелимфоцитарном лейкозе, остроконечных генитальных кондиломах [25].

ЛРС «Подофилла щитовидного листа» - это высушенные листья *P. peltatum* L., собранные в период цветения или плодоношения. Цельное сырье – светло-зеленые простые, округлые листья, опушенные с нижней поверхности, диаметром до 30 см с черешком длиной до 40 см, со слабым запахом и горьковатым вкусом. Измельченное сырье – светло-зеленые кусочки листьев и

черешков, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм, со слабым запахом [28].

### 1.3. Каллусные клеточные культуры, полученные из растения

#### *P. peltatum* L.

Преимущества клеточных культур перед интактным растением:

1. возможность культивировать исчезающие виды (как, например, *P. hexandrum* Royle, один из источников подофилотоксина наряду с *P. peltatum* L.);
2. независимость от сезонности (урожай возобновляемого сырья - листьев - получают только 1-2 раза в год, невозобновляемого сырья - корневищ с корнями – один раз в 4-5 лет);
3. независимость от климата и географических условий;
4. решение проблемы сокращения посевных площадей в хозяйственном обороте;
5. возможность получать присущие интактному растению биологически активные вещества и контролировать их количество посредством внесения предшественников (фенилаланина, например, в случае с клеточной культурой *P. peltatum* L.), регуляторов роста (в том числе, метилжасмоната), воздействия на клеточную культуру физическими факторами (в том числе, ультрафиолетом, светом разной длины волны);
6. возможность получать *in vitro* новые биологически активные вещества, не идентифицированные в интактном растении (в том числе, методами клеточной и генной инженерии);
7. возможность использования клеточных культур для биотрансформации промежуточных веществ в конечные продукты [47, 82, 107, 121].

В качестве сырья для получения биологически активных соединений используют, прежде всего, суспензионную клеточную культуру. Ее получают методом глубинного культивирования из каллусной клеточной культуры. Преимущество суспензионной культуры перед каллусной в медицинской биотехнологии растений состоит в возможности масштабирования жидкой

культуры от лабораторных (50-500 мл) до промышленных масштабов, что позволяет получать большее количество биомассы и, значит, большее количество биологически активных веществ. Получение каллусной культуры – этап в биотехнологической процедуре, предшествующий получению суспензионной культуры [21, 30, 54].

Каллусная культура – это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток [30, 54]. *In vitro* первичный каллус получают из тканей органов растений (эксплантов) на твердой питательной среде в пробирках и чашках Петри. Для поддержания роста каллуса его часть раз в 3-6 недель переносят на свежую питательную среду. Этот процесс называется субкультивированием, сам каллус, поддерживаемый в культуре *in vitro* – пассируемым, а процесс культивирования каллуса - поверхностным [30].

Для получения каллусной культуры необходимо присутствие в питательной среде двух фитогормонов: ауксинов, запускающих процесс дедифференцировки клетки, и цитокининов, обеспечивающих пролиферацию дедифференцированных клеток [54].

Культивируемая *in vitro* каллусная ткань обычно окрашена в белый, желтоватый или светло-зеленый цвета. При длительном культивировании в каллусных клетках накапливаются фенольные соединения, окисляющиеся в хиноны, что придает этим клеткам темно-коричневую окраску. Внесение антиоксидантов в питательную среду позволяет избавиться от влияния фенольных соединений, способных тормозить рост каллусной ткани [54].

По критерию плотности расположения клеток выделяют три типа каллусной ткани: 1) рыхлую – клетки с большим содержанием воды, способные объединяться в небольшие агрегаты; 2) средней плотности – у этих клеток хорошо выражены меристематические очаги; 3) плотную – эти клетки способны стать клетками камбия и проводящей системы [54].

И каллусные, и нормальные растительные клетки устойчивы к факторам среды и способны синтезировать вторичные метаболиты. У каллусных культур появляются новые специфические белки, уменьшается количество белков,

характерных для фотосинтезирующих клеток, активируется пентозофосфатный путь. При этом они более гетерогенны по возрасту, физиологическому состоянию и генотипу, имеют более длительный клеточный цикл, потребляют меньше кислорода [54].

Растения могут быть дикорастущими или культивируемыми в условиях открытого грунта. Помимо этого, в качестве источника эксплантов могут рассматриваться растения, полученные *in vitro* методом микроклонального размножения. Вторые предпочтительны: выращивание растений в условиях *in vitro* позволяет избавиться от вирусной, бактериальной и грибковой инфекции, которые обычно являются причиной выбраковки эксплантов на ранних этапах процесса получения каллусной культуры [54].

Первая каллусная культура, синтезирующая подофиллотоксин, была получена Karkade в 1981 году из *P. peltatum* L. [82]. Позже культуры каллусных клеток были созданы на основе других растений, способных синтезировать подофиллотоксин: *P. hexandrum* Royle, *P. pleianthum*, *Juniperus chinensis*, *Linum persicum*, *L. album*, *Anthriscus sylvestris*, *Callitris drummondii*, *Hyptis suaveolens* [27, 48, 82, 107].

#### **1.4. Суспензионные культуры, полученные из растения *P. peltatum* L.**

Суспензионные клеточные культуры получают из каллусных клеток или, что реже, из эксплантов на жидкой питательной среде. Во втором случае используют ферменты, позволяющие получить из растительных тканей отдельные изолированные клетки. Такой способ культивирования называется глубинным. Суспензионные культуры растут в колбах на шейкерах, обеспечивающих равномерный доступ к кислороду и питательным веществам. Для поддержания роста раз в 2-3 недели часть клеток суспензии (инокулюм) помещают на свежую питательную среду.

Физиологическое состояние клеток определяют параметрами их жизнеспособности, скоростью прироста биомассы, активностью деления клеток. Жизнеспособность определяют при помощи красителей типа метиленового

синего, эозина, окрашивающих мертвые клетки и не способных проникнуть через плазматическую мембрану клеточной оболочки живых клеток. Скорость прироста биомассы определяют по изменению веса сырой или сухой биомассы клеток или по изменению плотности клеток (число клеток в 1 мл) и визуализируют в виде S-образной кривой (рис. 1.2.) [21, 30, 54].

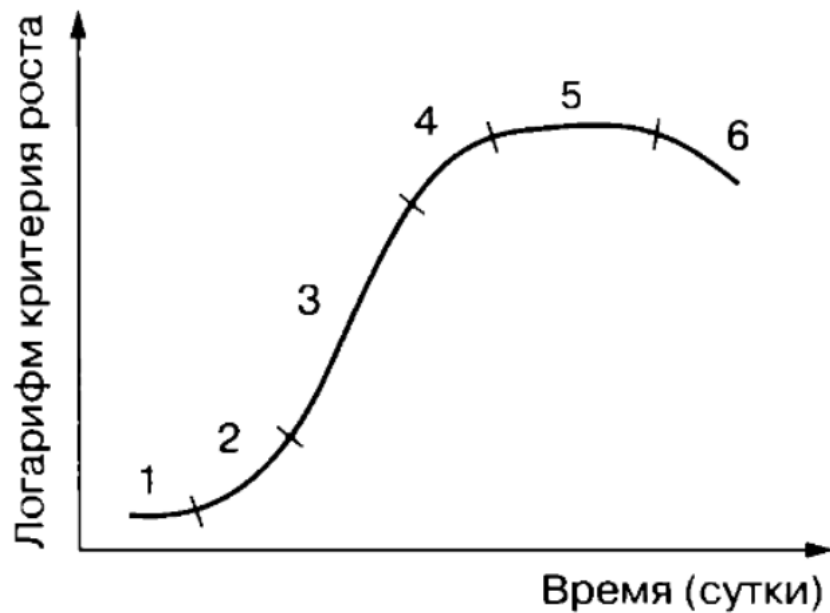


Рисунок 1.2. - Кривая роста культивируемых клеток [21]

Фазы роста: 1 – лаг-фаза, 2 – фаза ускорения роста, 3- фаза экспоненциального роста, 4 – фаза замедления роста, 5- стационарная фаза, 6 - фаза деградации

Выделяют следующие фазы роста суспензионной культуры: 1) латентная фаза (лаг-фаза) – рН питательной среды достигает оптимальных для жизнедеятельности культуры значений, клетки адаптируются к новым условиям, прироста биомассы нет, но при этом высока интенсивность дыхания, максимален уровень энергии, происходит синтез ДНК, РНК, белков; 2) фаза ускорения роста - переходное состояние между фазой 1 и 2; 3) логарифмическая (экспоненциальная) фаза – ускорение прироста биомассы, клетки, в основном, небольшого размера, меристематического типа, рН культуральной жидкости достигает минимальных за весь цикл роста значений; 4) фаза замедления роста – скорость роста и уровень дыхания понижается, часть клеток дифференцируются, синтезируются вторичные метаболиты; 5) стационарная фаза – плотность и

масса клеток удерживается на одном уровне; б) фаза деградации –уменьшается общая биомасса клеток [21, 30, 54].

Суспензии растительных клеток используются в исходном (высушенная или живая биомасса) и переработанном виде. Из них получают ценные пищевые и лекарственные биологически активные вещества (вторичные метаболиты, которые обычно образуются в биохимических процессах организма растения). Помимо этого, из суспензии растительных клеток получают изолированные протопласты. Технология культивирования клеток описывает две возможные системы – закрытую (изначально все компоненты помещаются внутрь системы) или открытую (компоненты поступают в систему в разные моменты времени по мере необходимости) [54].

Периодическое культивирование *P. hexandrum* Royle с использованием оптимизированной среды в 3-литровом биореакторе позволило получить выход биомассы и подофиллотоксина 21,4 г/л и 13,8 мг/л через 24-26 дней соответственно. Повышение прироста клеток до 53 г/л и накопление внутриклеточного подофиллотоксина до 48,8 мг/л было достигнуто через 60 дней, когда биореактор работал в режиме культивирования с непрерывным удержанием клеток [70, 82].

При оценке химического состава суспензионной культуры, полученной из растений *P. peltatum* L., *P. hexandrum* Royle, *L. album*, *L. nodiflorum*, *L. mucronatum*, *C. drummondii* было обнаружено, что наибольшее количество подофиллотоксина (48,8 мг/л) синтезируется в 21-суточной культуре *P. emodi*. 21-суточная культура *P. peltatum* L. синтезировала 27 мг/л, 15-суточная культура *P. emodi* - 24.3 мг/л подофиллотоксина [82, 107].

В ряде исследований обнаружено, что культура клеток *P. peltatum* L. синтезирует большее количество подофиллотоксина при облучении красным светом [82], а также при добавлении в питательную среду метилжасмоната [82]. При периодическом культивировании выход подофиллотоксина был минимален (13,8 мг/л), при непрерывном – максимален (48,8 мг/л) [82].

Для получения подофиллотоксина *in vitro* были применены новые межвидовые системы совместного культивирования с использованием «волосатых корней» *Linum flavum* и клеточных суспензий *P. hexandrum* Royle. «Волосатые корни» и суспензии совместно культивировали в среде Линсмайера-Скуга в колбах с двойным встряхиванием и двойных биореакторах. В отдельных экспериментах было показано, что использование в качестве предшественника кониферина является эффективной стратегией увеличения накопления подофиллотоксина в суспензиях *P. hexandrum* Royle. Поскольку корни *L. flavum* являются естественным источником кониферина, «волосатые корни», полученные из растений этого вида, использовались в совместном культивировании с *P. hexandrum* Royle. По сравнению с суспензиями *P. hexandrum* Royle, культивируемыми отдельно во встряхиваемых колбах или биореакторах, концентрации подофиллотоксина в совместно культивируемых клетках *P. hexandrum* Royle были увеличены на 240 % и 72 % в системах с двумя встряхиваемыми колбами и двойными биореакторами, соответственно. Доступность и стабильность кониферина в среде являются наиболее вероятными факторами, ограничивающими синтез подофиллотоксина в сокультуре [112].

Было исследовано влияние основных ингредиентов среды (углевода, источника азота и фосфата) на выход подофиллотоксина в суспензионных культурах *P. hexandrum* Royle. Среди всех изученных сред (Гамборга В5, Эриксона, Мурасиге—Скуга, Нитча, Стрита и Уайта) среда Мурасиге-Скуга привела к самому высокому росту и накоплению подофиллотоксина. Было обнаружено, что оптимален уровень азота 60 мМ с комбинацией солей аммония и нитрата в соотношении 1:2. Наивысший уровень подофиллотоксина был получен при 60 г глюкозы/л и 1,25 мМ фосфата через 30 дней [70].

### 1.5. Другие подходы к получению биотехнологического сырья *P. peltatum* L.

Был разработан четырехступенчатый мультиферментный каскад для получения в *E. coli* (-)-матайрезинола из (+)-пинорезинола. Была доказана эффективность пятиэтапной мультиферментной биотрансформации (-)-матайрезинола в (-)-дезоксиподофиллотоксин с выходом 98 % при концентрации 78 мг/л. Оценили расширение этого каскада до шестой стадии, ведущей к (-)-эпиподофиллотоксину. С этой целью семь ферментов были объединены в восстановленном пути с участием трех монооксигеназ цитохрома P450 растений [78].

Линии «волосатых корней» *Linum flavum* были созданы из кусочков гипокотыля с использованием *Agrobacterium rhizogenes* штаммов LBA 9402 и ATCC 15834. Оба штамма были эффективны для трансформации. Индукция фенотипа «волосатых корней» была более стабильной при использовании штамма ATCC 15834. Оценили влияние питательной среды, факторов роста, предшественников на выход подофиллотоксина и его производных (6-метокси-подофиллотоксин, дезоксиподофиллотоксин). Наибольший выход подофиллотоксина был получен в среде Гамборга. Обработка метилжасмонатом и добавление феруловой кислоты увеличили выход лигнанов арилтетралина [143].

Обнаружено два преимущества культуры «волосатых корней» перед суспензионной культурой: она генетически более стабильна, а также синтезирует в три раза больше подофиллотоксина [82].

*Aspergillus niger* и *Syngonium podophyllum* использовались для очистки сточных вод. Для определения влияния *A. niger* на накопление урана и антагонизм уранового стресса *S. podophyllum* была создана комбинированная система *S. podophyllum* - *A. niger*, и были проведены эксперименты по гидропонной рекультивации с урансодержащими сточными водами. Результаты показали, что биоаугментация *A. niger* может увеличить биомассу *S. podophyllum* на 5-7 %, обратить вспять процесс восстановления U(VI), индуцированный *S. podophyllum*, и увеличить коэффициент биоконцентрации и фактор



транслокации *S. podophyllum* в уран на 35-41 и 0,01-0,06 соответственно, тем самым улучшив восстановление урана в сточных водах. Кроме того, *A. niger* может способствовать иммобилизации клеточной стенки и субклеточной компарментализации урана в корне *S. podophyllum*, снижать фитотоксичность урана, поступающего в клетки корня, и ингибировать отток кальция из клеток корня, тем самым снимая стрессовое воздействие урана на *S. podophyllum* [69].

Еще один биотехнологический способ получения биологически активных веществ растений – это биотрансформация, в данном случае предшественников в подофиллотоксин и 5-метоксиподофиллотоксин [64, 82, 167, 168, 169, 179]: клеточная культура *L. flavum* осуществляла биотрансформацию дезоксиподофиллотоксина и L-фенилаланина в 2,38 % 5-метоксиподофиллотоксина и его гликозида [82, 168, 169]; клеточная культура *P. hexandrum* Royle - кониферилового спирта, кониферина и дезоксиподофиллотоксина в 2,87 % подофиллотоксина и его гликозид [64, 82, 167, 168]; клеточная культура *F. intermedia* - дезоксиподофиллотоксин в 5-метоксиподофиллотоксин [82, 179].

Kim и Sagowska исследовали особенности культивирования (длительность, концентрации фитогормонов) при микроклональном размножении *P. peltatum* L. [99, 145]. Разработана схема быстрого получения большого количества микроклонов путем культивирования *in vitro* корней, почек и семян *P. peltatum* L. [82, 107]. Moraes-Cerdeira показала, что содержание подофиллотоксина в растениях, полученных из почек и семян *in vitro*, было сходным с содержанием, найденным в растениях, выросших в природных условиях [125, 126].

Anbazhagan с коллегами обнаружили, что в адвентивных корнях содержится больше подофиллотоксина, чем в эмбриогенных клетках, определили оптимальные концентрации компонентов питательной среды для их роста [59].

### 1.6. Биологически активные вещества, входящие в состав органов растения и клеточных культур *P. peltatum* L.

В корневищах подофилла щитовидного обнаружены смолистые вещества, в которых растворены кристаллические соединения, являющиеся лигнанами. Большая их часть является производными подофиллотоксина (рис. 1.1.) или пельтатинов (рис. 1.3.) [26].

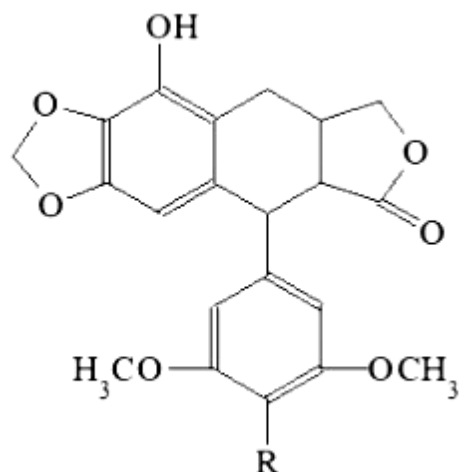


Рисунок 1.3. – Пельтатины [26]

Из корневищ *P. peltatum* L. разными способами экстрагирования удается извлечь около 8 %, из корневищ *P. hexandrum* Royle - в пределах 6-20 % смолы подофиллин, состоящей из агликонов (как правило, не растворимых в воде) и гликозидов (растворимых в воде) лигнанов. Помимо подофиллотоксина в смоле подофиллин идентифицированы дезокси - и дигидроподофиллотоксин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -пельтатин и кверцетин [100].

Подофиллин применяется в медицине в форме 25 % масляного раствора для лечения папилломатоза и кондиломатоза, в форме настоек и экстрактов как слабительное, желчегонное, противоглистное и рвотное средство [100]. При введении экстрактов этих растений в субтоксических дозах наблюдается угнетение деятельности центральной нервной системы (ЦНС), в ходе которого нарушается двигательная активность, учащается дыхание и возможны судороги [142].

Противоопухолевый эффект подофиллина достигается, прежде всего, за счет действия на опухолевые клетки подофиллотоксина [55] и его изомеров ( $\alpha$ -

и  $\beta$ -пелллатина, диметилподофиллотоксина), которые тормозят клеточное деление на стадии метафазы. Обнаружено избирательное цитотоксическое действие подофиллотоксина в отношении опухолевых (а не физиологически нормальных) клеток [60, 72].

Обнаружена противоопухолевая активность соединений растений рода *Podophyllum* в отношении злокачественных заболеваний кожи [72], молочной железы [87], легких [178] и ротовой полости [75].

В растениях рода *Podophyllum* были идентифицированы алкалоиды - производные изохинолина [149], индола и пиперидина [181]. С помощью масс-спектрометрии, генноинженерных методов и методов биоинформатики были получены доказательства того, что родственные виды *P. hexandrum* Royle и *P. peltatum* L. используют ранее неизвестный метаболический путь апорфиновых алкалоидов. Комплексный анализ генетического материала подземных и надземных органов этих растений позволил идентифицировать, локализовать и количественно оценить такие апорфиновые алкалоиды как магнофлорин, коритуберин и мурицинин [181].

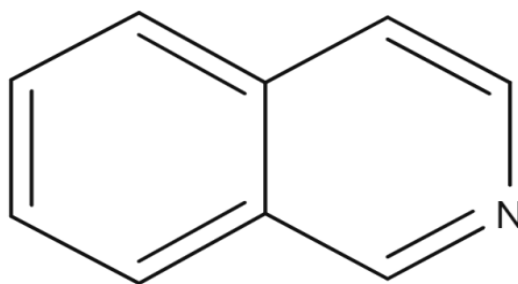


Рисунок 1.4. - Структурная формула изохинолина [149]

Среди изохинолиновых алкалоидов (рис. 1.4.) наибольший интерес исследователей привлекают протоберберины и апорфиновые алкалоиды. К протоберберинам относятся: берберин, канадин, офиокарпин, мекамбридин, коридалин [116]. Апорфиновых алкалоидов (рис. 1.5.), к настоящему моменту выделено более 85. К ним относятся: глауцин, коридин, лириоденин, апоморфин, нуциферин и другие [180].

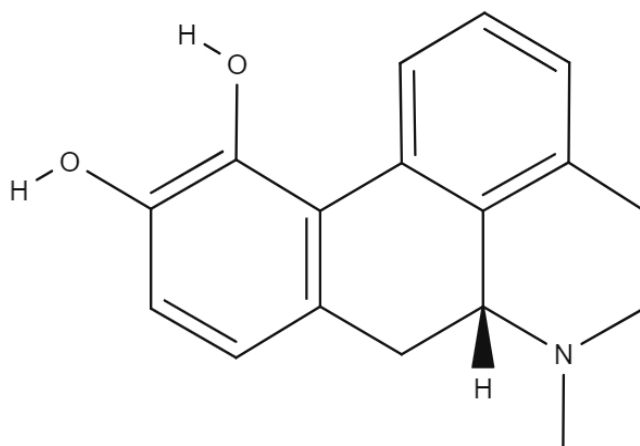


Рисунок 1.5. - Структурная формула апоморфина - исходного соединения всех апорфиновых алкалоидов [180]

Коритуберин (рис. 1.6.) является предшественником и промежуточным продуктом биосинтеза магнофлорина [119]. Оба этих алкалоида обнаруживаются в растениях рода *Podophyllum*. Их количество в органах растений обратно пропорционально.

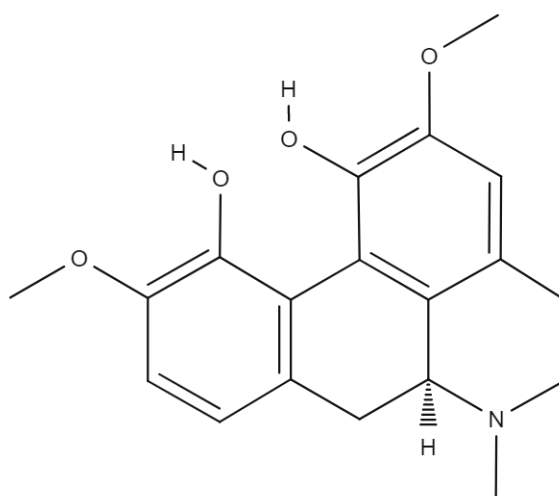


Рисунок 1.6. - Структурная формула коритуберина [53]

Коритуберин играет большую роль в блокировании биосинтеза жирных кислот и является ингибитором липоксигеназы (схожим действием обладает оксиберберин) [53] или малонил-КоА-трансацилазы (МСАТ) белка - носителя ацила бактерий, устойчивых к лекарственным препаратам [141, 147], и может быть использован в качестве антибактериального агента, воздействуя на МСАТ

в качестве мишени. Другие апорфиновые алкалоиды взаимодействуют с МСАТ аналогично коритуберину и тоже могут выступать в качестве потенциальных неконкурентных ингибиторов МСАТ [141]. Помимо этого, было обнаружено цитотоксическое действие коритуберина и протоберберинов в отношении линии клеток *SMMC-7721*, производных *HeLa* [111].

Магнофлорин (рис. 1.7.) предотвращает раннее прогрессирование атеросклероза [129], проявляет противовоспалительное [118], гипотензивное действие, являясь ганглионарным блокатором [106], обнаруживает противоопухолевую [52, 120], противовирусную [39] и противогрибковую [127] активность, также обладает антидиабетическими [118], антиоксидантными и иммуномодулирующими [52] свойствами, улучшает когнитивные способности, не оказывая при этом угнетающего действия на ЦНС [123], усиливает чувствительность к доксорубину клеток рака молочной железы [105].

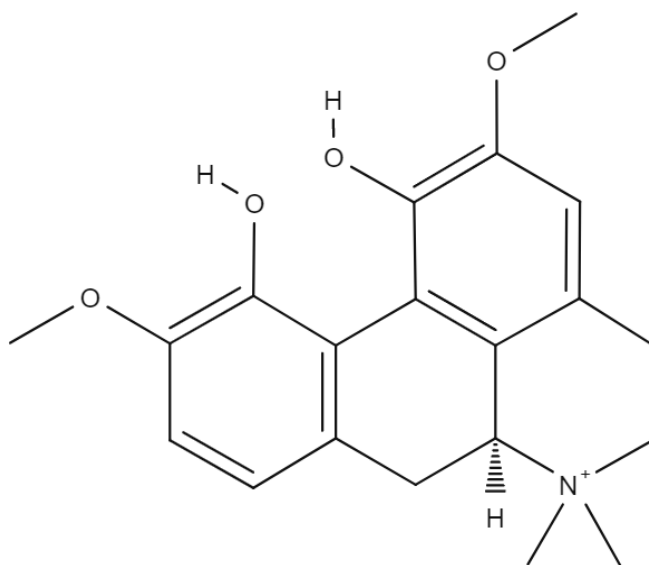


Рисунок 1.7. - Структурная формула магнофлорина [115]

Магнофлорин участвует в активации макрофагов, что усиливает провоспалительный эффект, который инициируется липополисахаридами. Схожее действие магнофлорина можно наблюдать при остром повреждении легких, вызванного липополисахаридами [115]. Магнофлорин защищает липопротеины высокой плотности во время окислительного стресса [153],

является ингибитором активации NF- $\kappa$ B и агонистом  $\beta$ 2-адренергического рецептора, а также действует как ингибитор  $\alpha$ -тирозины [65].

Мурицинин (рис. 1.8.) - малоизученный апорфиновый алкалоид. На основании значения его константы диссоциации кислоты рKa считается ярко выраженным основным соединением. Обнаружен в человеческом организме, а также в различных растениях [68].

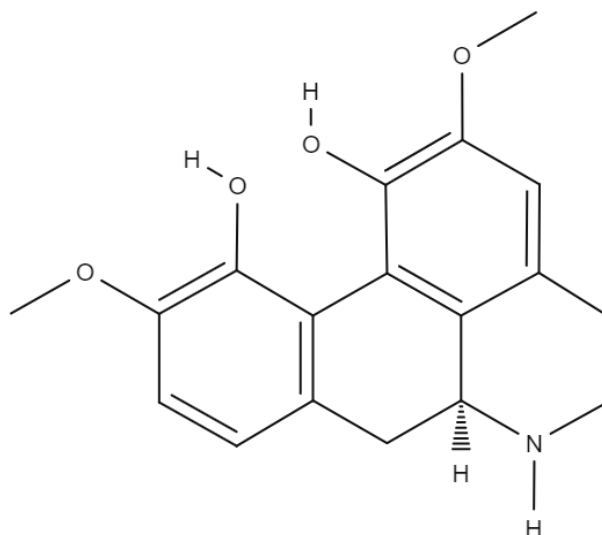


Рисунок 1.8. - Структурная формула мурицинина [68]

В плане противоопухолевых свойств берберин (рис. 1.9.) является наиболее перспективным соединением группы протоберберинов [32]. Он также оказывает противовоспалительное действие [154], является распространенным лекарством при желудочно-кишечной инфекции [31], средством профилактики сердечно-сосудистых заболеваний [131], остеопороза [124], противодействует развитию атеросклероза, ингибируя накопление холестерина в создающих атеросклеротические бляшки пенистых клетках путем подавления активности комплекса AP-1 и активации пути Nrf2/HO-1 [98], способствует излечению гепатита [103], используется для снижения уровня холестерина [176] и других жиров в крови при гиперлипидемии [90, 177], а также для контроля артериального давления [95], действует как противовирусное [155], антиаритмическое [91, 183] и противомикробное [80] средство. Изучается способность берберина к увеличению продолжительности жизни [84].

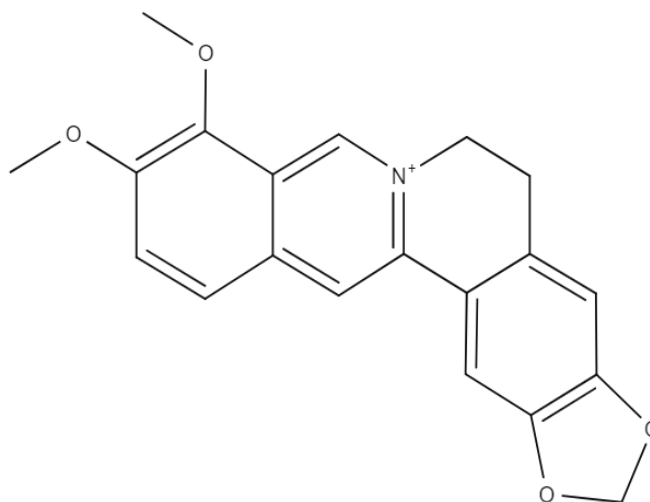


Рисунок 1.9. - Структурная формула берберина [31]

### 1.7. Фенольные соединения *P. peltatum* L. с цитотоксической активностью

В качестве целевых противоопухолевых биологически активных веществ растений можно рассматривать различные классы фенольных соединений: фенольные кислоты, флавоноиды, лигнаны, стильбены.

Механизм противоопухолевого действия полифенолов связан с рядом процессов, происходящих в клетке:

- они стимулируют апоптоз и старение клетки;
- регулируют аутофагию;
- ингибируют пролиферацию и миграцию опухолевых клеток;
- вызывают клеточный стресс за счет увеличения количества активных форм кислорода и снижения количества антиоксидантов;
- взаимодействуют с другими противоопухолевыми соединениями;
- преодолевают множественную лекарственную устойчивость;
- влияют на метилирование ДНК и модификацию гистонов;
- регулируют экспрессию некодирующих микроРНК;
- ингибируют SASP (Senescence-associated secretory phenotype) секреторный фенотип, связанный со старением;
- образуют особую микросреду, предотвращающую развитие опухоли [100].

Обычно цитотоксическая активность полифенолов ниже, чем цитотоксическая активность синтетических химиотерапевтических средств. Но при этом и меньше проявлены побочные эффекты, вызванные воздействием соединений на здоровые клетки и ткани организма. При этом в ряде случаев полифенолы дают заметный синергический эффект при совместном применении с традиционными химиотерапевтическими средствами [73]. Фенольные соединения (так же, как и алкалоиды) являются вторичными метаболитами растений, которые синтезируются в шикиматном биосинтетическом пути (рис. 1.10.) [60, 73].

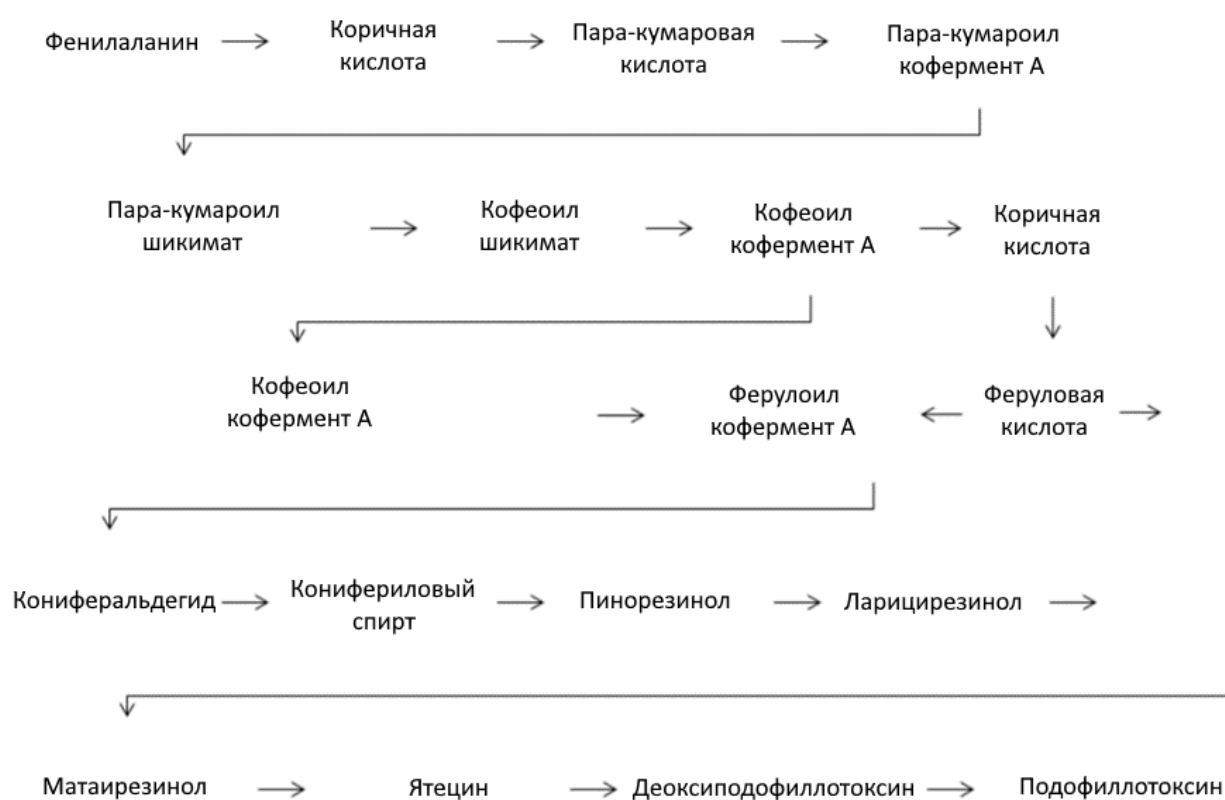


Рисунок 1.10. - Синтез подофиллотоксина в растении [60]

Лактоновый лигнан арилтетралина подофиллотоксин, впервые выделенный Подвысоцким из *P. peltatum* L. в 1880 году, является основным противоопухолевым соединением растений рода *Podophyllum* [60, 66, 77, 135, 152, 157, 176, 182, 188, 189, 190, 192]. В его синтезе в качестве ферментов принимают участие феруловая кислота и метилендиоксизамещенная коричная кислота (рис. 1.10.) [60, 182]. Противоопухолевое действие подофиллотоксина связано с тем, что он предотвращает сборку тубулина в микротрубочки, вызывая



апоптоз, ингибирует топоизомеразу II посредством индукции разрывов цепи ДНК [60, 135, 188, 189, 190]. Полусинтетические производные подофиллотоксина, такие как этопозид, тенипозид и этопофос, обладают ингибирующей активностью в отношении топоизомеразы II ДНК, которая предотвращает повторное лигирование ДНК [60, 66, 152, 176, 192].

Подофиллотоксин - противовирусное средство при лечении острых кондилом, вызванных вирусом папилломы человека (ВПЧ) [60, 157].

Производные подофиллотоксина показали выраженную цитотоксическую активность в отношении ряда линий опухолевых клеток человека - *HL-60*, *A-549*, *HeLa* и *HCT-8* [60, 157]. Подофиллотоксин также активирует проапоптотический сигнальный путь стресса эндоплазматического ретикулума [60, 77].

Подофиллотоксин и его производные, другие лигнаны сходного химического строения, содержащиеся в растении *P. peltatum* L., активно изучаются, начиная с 1880 года. Помимо лигнанов в *P. hexandrum* Royle, растения одного из ближайших к *P. peltatum* L. вида, были идентифицированы флавоноиды кемпферол (рис. 1.11.) и кверцетин (рис. 1.12.). Кемпферол количественно определяли в свободной (8,01 и 2,42 мкг/мг) и связанной (17,54 и 8,13 мкг/мг) формах, кверцетин - в свободной (4,5 мкг/мг) и связанной формах (6,17 мкг/мг) [113].

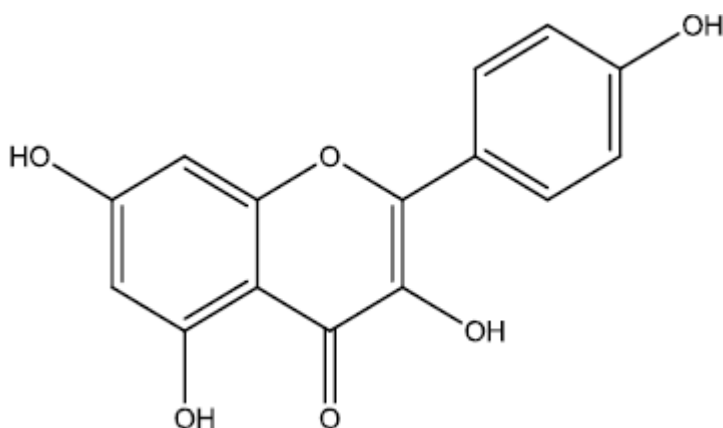


Рисунок 1.11. – Структурная формула кемпферола [113]

Кверцетин воздействует на опухолевые клетки *HeLa* посредством модулирования метаболизма лактат-пирувата [133]. Он снижает жизнеспособность клеток рака шейки матки, останавливает клеточный цикл в

фазе G2/M, вызывает апоптоз клеток, а также ингибирует миграцию и инвазию клеток [73].

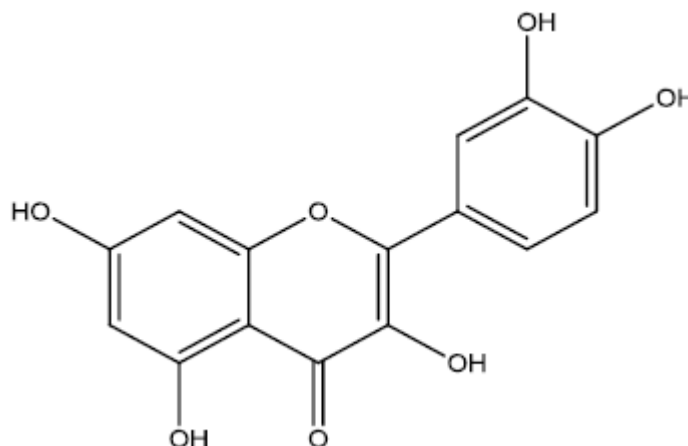


Рисунок 1.12. – Структурная формула кверцетина [113]

Остальные группы фенольных соединений, входящие в состав *P. peltatum* L., не исследованы. Важно понять, какие вещества синтезируются в растении, чтобы, воздействуя на биосинтетические пути, суметь получить биотехнологическим путем клеточные культуры, позволяющие синтезировать большие количества целевых противоопухолевых соединений.

### 1.8. Физико-химические методы анализа фенольных соединений

Хроматографические методы (ТСХ, ГХ, ВЭЖХ) позволяют идентифицировать подофиллотоксин и другие соединения с цитотоксической активностью, а также оценить их количество в ЛРС.

ТСХ – простой скрининговый метод, позволяющий получить первичное представление о составе экстрактов. Но он недостаточно точен. Несколько соединений сходного строения могут выходить в одной и той же зоне хроматограммы. ВЭЖХ позволяет идентифицировать вещества с высокой степенью точности. Но требует дорогостоящего оборудования и высокой квалификации специалиста, работающего на нем. Ультраэффективная жидкостная хроматография (УЭЖХ) является модификацией ВЭЖХ, характеризующейся меньшим временем анализа и более высокой эффективностью разделения благодаря использованию сорбентов с размером частиц от 1,5 до 2 мкм [8].

ГХ позволяет идентифицировать летучие соединения, входящие в состав экстрактов.

Предварительная пробоподготовка растительного и биотехнологического сырья *P. peltatum* L. для проведения ТСХ предусматривает несколько вариантов экстракции - этиловым спиртом при нагревании с последующим высушиванием полученного экстракта и перерастворением его в метиловом спирте [57]; хлороформом с последующим высушиванием и перерастворением в этиловом спирте [29]. Для разделения веществ используют пластинку с силикагелем, выдерживаемую в элюирующих системах из смеси хлороформа и этанола 23:1 [29] или смеси ацетонитрила и воды 4:6 [57]. В качестве детектирующего вещества выступает концентрированная серная кислота 50 %. Второй вариант детекции – ультрафиолетовый свет при длине волны 210 нм. Для количественного анализа содержания подофиллотоксина используется метод денситометрии [29].

Предварительная пробоподготовка сырья для идентификации подофиллотоксина методом ВЭЖХ предусматривает следующие варианты экстракции:

1. метиловым спиртом 100 % в течении 24 часов при температуре 4-6 °С;
2. 25мМ калий-фосфатным буферным раствором (рН=7.0) в течение 1 часа с последующей очисткой этилацетатом;
3. этиловым спиртом 96 % при 60 °С в течении 30 минут;
4. метиловым спиртом 80 % в течение 1 часа с последующей очисткой дихлорметаном [29, 57].

Хроматографирование проводится в двух вариантах: либо в обратнофазном режиме в системе растворителей ацетонитрил : вода : метиловый спирт : гептан 30:40:25:5 [57], либо в градиентном режиме в системе ацетонитрил : вода. Детектирование осуществляется при длине волны 280 или 290 нм. [187].

Пробоподготовка для анализа летучих соединений *P. peltatum* L. – экстракция метиловым спиртом в течение 24 часов [14]. Очистка от апиола,

который образует кристаллы при понижении температуры, производится путем замораживания метанольного экстракта при температуре – 20 °С [24]. Подофиллотоксин определяли на капиллярной колонке при повышении температуры со скоростью 10 °С/мин с 70 до 280 °С [14, 102].

Газожидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ГЖХ-МС) используется для идентификации и количественного определения лигнанов с использованием высокотемпературных программ и хроматографических колонок с максимальной рабочей температурой не менее 360 °С [102]. Однако, во время анализа ГЖХ-МС подофиллотоксин, дезоксиизоподофиллотоксин, 4'-диметилэпиподофиллотоксин, эпиизоподофиллотоксин подвергаются пиролизу, в процессе которого образуются вещества, мешающие определению исходных фенольных соединений [175]. Поэтому более надежным методом анализа лигнанов является ВЭЖХ [61].

ГЖХ-МС позволила определить подофиллотоксин, жирные кислоты и их этиловые эфиры (9-гексадекановую, гексадекановую, 9,12-октадекадиеновую, октадец-9-еновую), сахароза, эфиры фталевой кислоты, ситостерол в составе экстракта корня *P. hexandrum* Royle на основе этилового спирта [109].

К настоящему моменту в результате ряда экспериментов подобраны условия идентификации и количественного определения подофиллотоксина и других фенольных соединений хроматографическими методами (ТСХ, ВЭЖХ, ГХ, ГЖХ), которые позволяют получить достоверные данные о химическом составе ЛРС *P. peltatum* L.

### **1.9. Методы определения цитотоксической активности веществ**

Опухолевые заболевания относятся к категории социально-значимых заболеваний [35-37]. По данным Росстата в списке заболеваний, приводящих к смерти, они занимают второе место после сердечно-сосудистых заболеваний [15, 35-37]. Наиболее частые диагнозы в онкологической медицинской практике это следующие виды рака: кожи (13 %), молочной железы (11 %), дыхательной системы (10 %), ободочной кишки и предстательной железы (по 7 %), желудка

(6 %), прямой кишки, лимфатической и кроветворной системы (по 5 %), тела матки и почки (по 4 %), поджелудочной железы, шейки матки и мочевого пузыря (по 3 %), яичников (2 %) [15, 35-37].

Для лечения рака используют пять базовых групп препаратов: алкилирующие соединения, антиметаболиты, препараты растительного происхождения, антибиотики и прочие антинеопластические препараты [34]. Основные группы биологически активных веществ с противоопухолевым действием, получаемые из ЛРС, – это фенольные соединения и их производные (этопозид, тенипозид, этопофос), алкалоиды и их производные (винбластин, винкристин, виндезин) и полисахариды [25, 40]. Источником получения указанных биологически активных веществ могут быть не только растения (дикорастущие и культивируемые), но и культуры клеток (калусных и суспензионных, биоинженерные продукты).

Шведский ученый, цитолог Бйёрн Эквалл в 1983 сформулировал концепцию базовой токсичности, в которой описал необходимость и возможность использования клеточных тест-систем как альтернативу экспериментам на животных [16, 19]. В России впервые явно обратили внимание научной общественности на вопрос замены доклинических опытов на животных тестами *in vitro* в 1987 году. Тогда в рамках Съезда токсикологов была создана секция по альтернативным методам моделирования токсичности [17].

Бйёрн Эквалл выделил три типа цитотоксичности, которые должны учитываться и при исследовании *in vivo*, и при исследовании *in vitro*. Базовая цитотоксичность подразумевает неблагоприятное воздействие химических веществ на общие для всех клеток структуры и функции. Органоспецифическая цитотоксичность проявляется как неблагоприятное влияние на структуры и функции, специфические для определенных клеток тканей и органов. Внеклеточная токсичность предполагает, что при отсутствии воздействия на клетки идет неблагоприятное действие на весь организм посредством влияния на внеклеточные процессы. [16]. Часть тестов *in vitro* позволяют получить

адекватную оценку генотоксичности и мутагенеза веществ. Но при этом многие из них невозможно использовать для точного прогноза влияния *in vivo* [16, 17].

Выделяют четыре группы методов оценки цитотоксичности: 1) прямой подсчет клеток и колоний; 2) оценка целостности цитоплазматической мембраны; 3) оценка метаболической активности клеток; 4) оценка синтеза ДНК [16, 45].

Первая группа методов подразумевает измерение оптической плотности лизатов клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым, спектрофотометрическим методом [16, 58]. При работе с биопленками, образованными разными видами бактерий, взаимодействующими между собой, большую воспроизводимость, специфичность и меньшую токсичность дает краситель сафранин [162].

Вторая группа методов включает: окрашивание суспензии клеток метиленовым синим, который при проникновении в цитоплазму клеток через поврежденную мембрану способен абсорбироваться на ядерных белках [16]; оценку выхода в среду цитозольного фермента лактатдегидрогеназы, участвующего в превращении пирувата в лактат при повреждении клеточной оболочки [16, 17]. Кристаллический фиолетовый и метиленовый синий используются в традиционном микробиологическом тесте для определения принадлежности бактерий к одной из двух групп – грамположительным или грамотрицательным – окрашивание по Граму [162]. Метиленовый синий позволяет определить жизнеспособность протопластов и клеток бактерий, а также определить величину отрицательного заряда на поверхности протопластов [4].

Третья группа методов предполагает оценку следующих процессов: восстановления тетразолия до формазана, восстановления резазурина до резорурфина, протеазной активности клеток, синтеза и распада внутриклеточного АТФ [16].

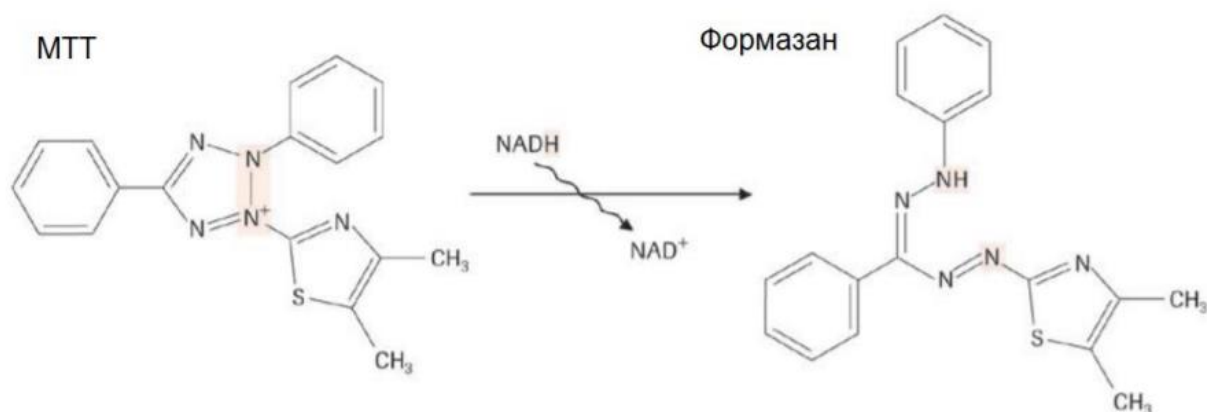


Рисунок 1.13. - Реакция восстановления МТТ до формаза [16]

Для первой подгруппы методов используются следующие варианты тетразолия: положительно заряженный МТТ (бромид-3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия), проникающий в живые клетки, в которых под действием митохондриальных дегидрогеназ [16] и ферментов липидных клеточных структур, включая эндосомный и лизосомный компартмент и плазматическую мембрану [7, 61, 150, 151] восстанавливается до фиолетового формаза (рис. 1.13.) [16]; МТС (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум) (рис. 1.14.), ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксамид) (рис. 1.15.) и отрицательно заряженные водорастворимые соли тетразолия (WST) (рис. 1.16.), использующиеся с промежуточным акцептором электронов. Жизнеспособность клеток определяют посредством измерения оптической плотности раствора формаза при длине волны 500-600 нм [16].

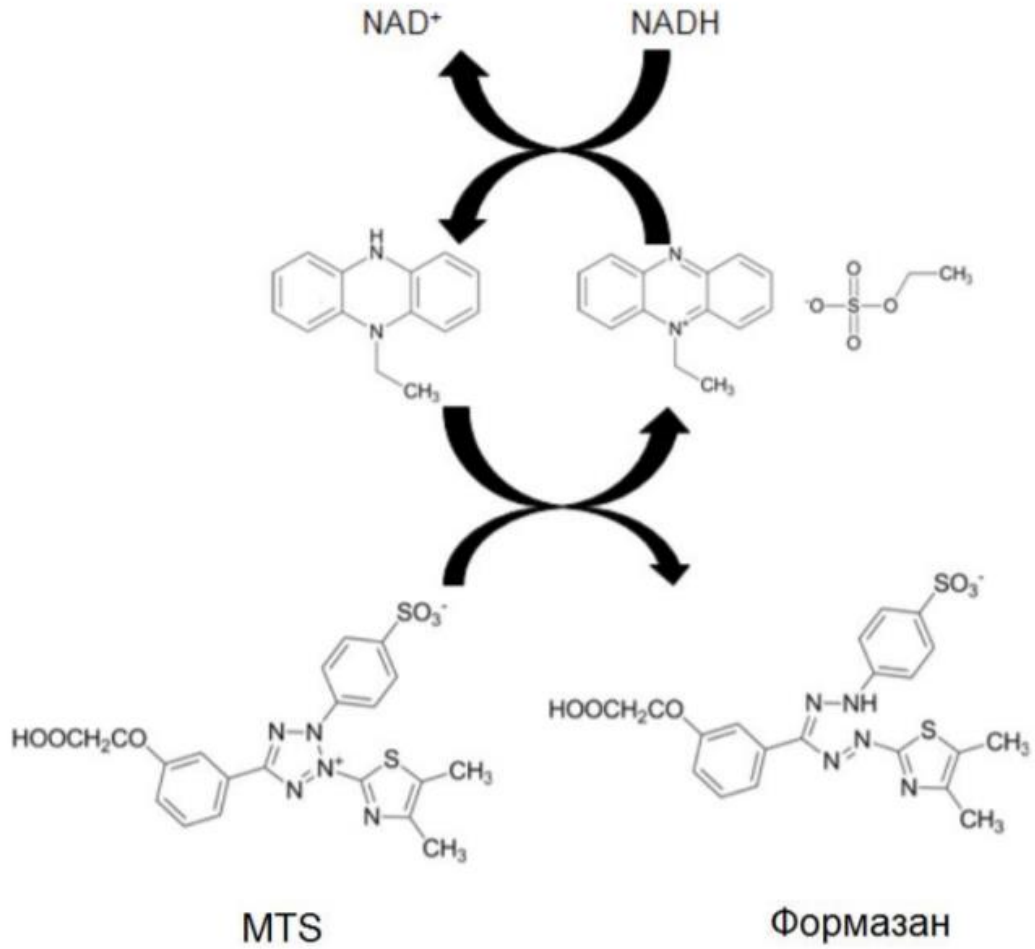


Рисунок 1.14. - Реакция восстановления МТС до формазана [16]

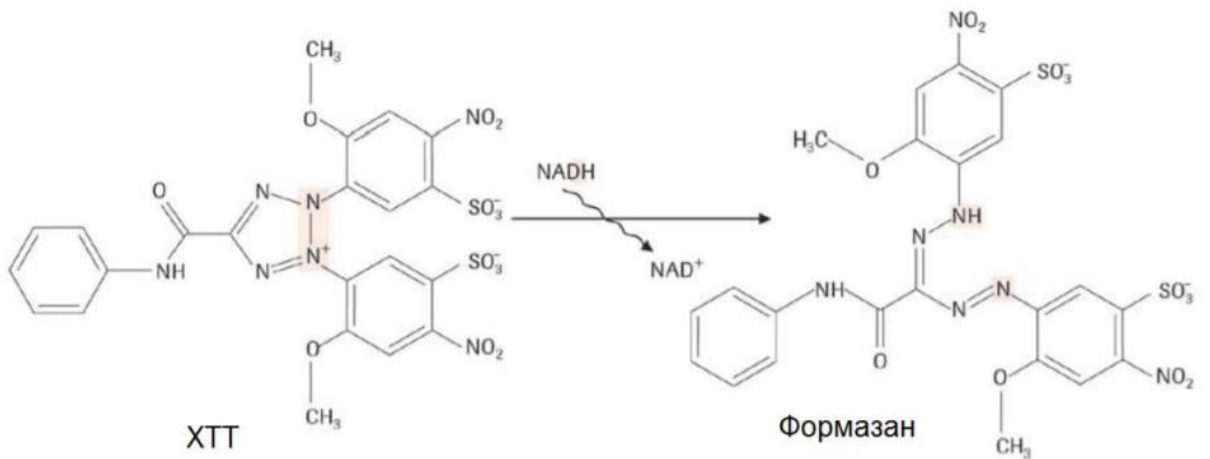


Рисунок 1.15. - Реакция восстановления ХТТ до формазана [16]



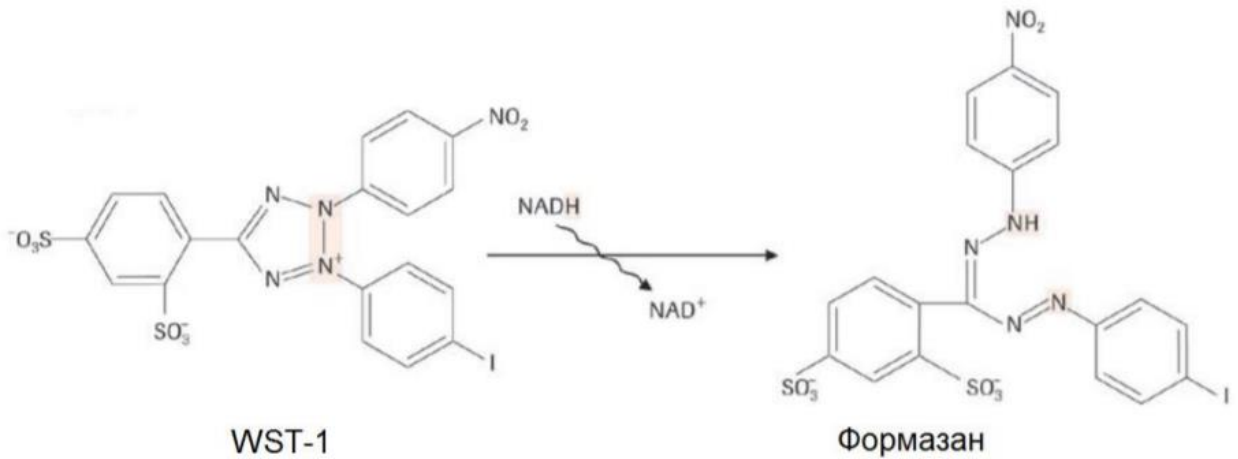


Рисунок 1.16. - Реакция восстановления WST до формазана [16]

Для проведения МТТ-теста необходимо растворение формазана в органических растворителях: диметилсульфоксид (ДМСО), смесь HCl-изопропанол [1, 7, 16], раствор натрия додецилсульфата [16, 104], диоксан, циклогексан, тетрагидрофуран, диметилформамид [16, 150]. Необходимо учитывать, что растворители тоже являются цитотоксичными. В частности, 0,5-1,0 % ДМСО понижает жизнеспособность мышинных фибробластов *L929* при инкубации в течение 48 часов [49].

MTS, ХТТ и WST дают на выходе водорастворимый окрашенный продукт, поэтому из процесса исключается стадия, связанная с растворением кристаллов формазана в органическом растворителе [7, 16]. Из-за их гидрофильности и отрицательного заряда они непроницаемы для клеток [150]. Они восстанавливаются на поверхности клетки или на уровне плазматической мембраны [62]. Все сульфированные соли тетразолия дают водорастворимые формазаны в сочетании со следующими акцепторами электронов: mPMS (5-метилфеназин метилсульфат) [62], PMS (метилсульфат 5-метил-феназина), PES (этилсульфат феназина) [140], менадион [63, 150]. Для повышения чувствительности краситель MTS используется в сочетании PMS или PES [62, 151]. Краситель WST-1 (натрия 5-(2,4-дисульфофенил)-2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-2Н-тетразолий) содержит йодный остаток и накапливается в плазматической мембране [62, 150]. WST-1 более устойчив в присутствии акцептора электронов mPMS [62]. Красители MTS и WST добавляются

напрямую в культуру клеток, показывают хорошую воспроизводимость и высокую чувствительность [159]. Помимо этого, есть неудобство в использовании МТТ-теста, связанное с необходимостью полного удаления культуральной среды на стадии растворения кристаллов формазана. Это трудновыполнимо при анализе суспензионных культур [1].

Факторы, которые необходимо учитывать при подборе и адаптации методик оценки цитотоксической активности: особенности культивирования клеточной линии, количество клеток, время адаптации, объем добавляемых веществ, время инкубации [63]. При восстановлении МТТ в формазан максимальное количество клеток не должно выходить за рамки линейного участка кривой зависимости оптической плотности от числа метаболически активных клеток. При низких плотностях клеток они проявляют повышенную чувствительность по отношению к действию токсических веществ, а при высокой плотности клеток их часть оказывается недоступной для токсических веществ [63, 161].

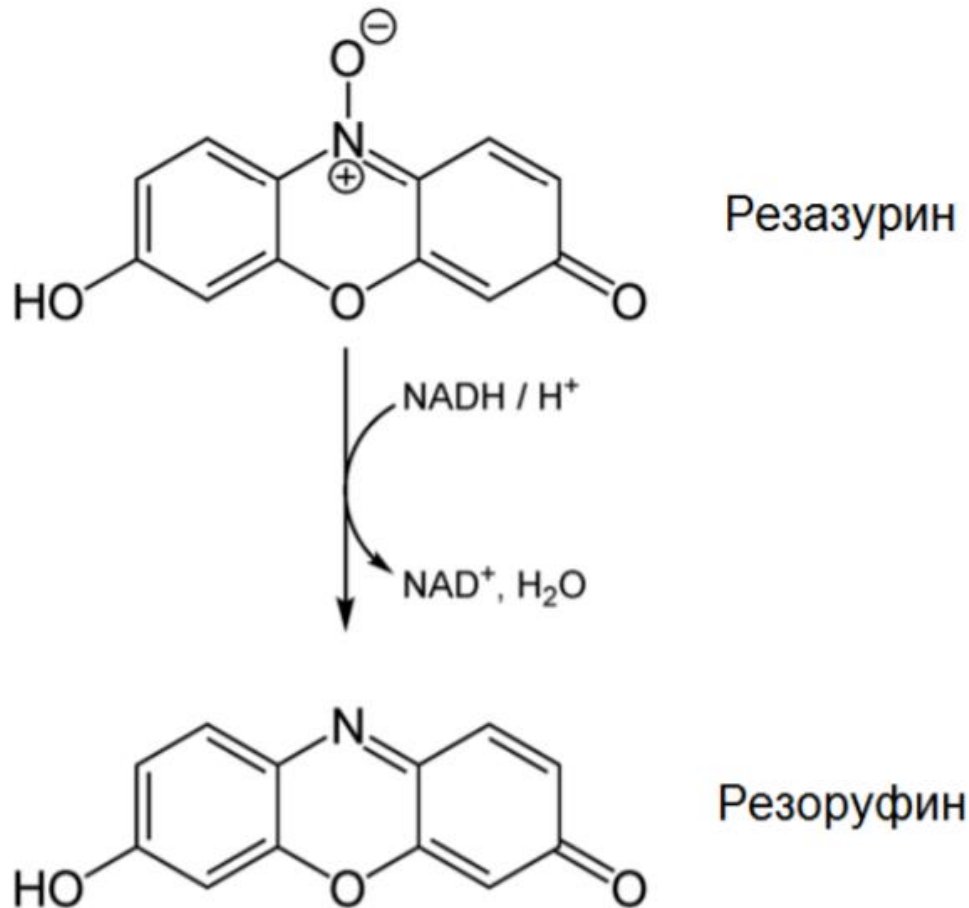


Рисунок 1.17. - Реакция восстановления резазурина до резорурфина [16]

Резазурин-тест основан на способности живых клеток восстанавливать голубой нефлуоресцирующий резазурин до розового флуоресцентного резорурфина (рис. 1.17.). Резорурфин определяют колориметрически или флуориметрически [1, 7, 16, 104, 140, 150, 151]. Резазурин восстанавливают митохондриальные дегидрогеназы, цитоплазматические цитохромы и дегидрогеназы, микросомальные ферменты, ферменты дыхательной цепи, акцепторы электронов. МТТ восстанавливают только митохондриальные дегидрогеназы и ферменты липидных органелл [1, 7, 16, 140, 150, 151]. Процедура резазурин-теста быстрее и проще, чем процедура МТТ-теста - она не содержит этапа растворения кристаллов формазана в органическом растворителе. Резазурин-тест не разрушает клетки: в отличие от МТТ-теста, при котором внутри клеток образуются кристаллы формазана и повреждают их. Клетки остаются живыми и с ними можно продолжать работу. Можно работать

с суспензионными культурами [7, 140]. При исследовании взаимодействия красителя резазурина и МТТ-красителя с тремя ингибиторами гликолиза (2-дезоксиглюкоза, 3-бромпируват и лонидамин) резазурин-тест показал большую стабильность и воспроизводимость результатов по определению цитотоксической активности, меньший разброс данных оптической плотности, чем МТТ-тест, легко различимое визуальное изменение цвета окрашивания [108, 140, 160].

В тестах на протеазную активность глицилфенилаланил-аминофторкумарин (GF-AFC) проникает в живые клетки. Цитоплазматическая аминопептидаза отщепляет глицин и фенилаланин, открывая аминофторкумарин и запуская в итоге флуоресцентный сигнал, отражающий количество жизнеспособных клеток [16].

В четвертой группе методов используются радиоактивно меченные нуклеозиды. Их количество, внедренное в клеточную ДНК, оценивается посредством метода подсчета сцинтилляций в жидкой фазе LSC (liquid scintillation counter) [16].

Созданы компьютерные программы для прогнозирования токсичности соединений – QSAR-models (Quantitative Structure-Activity Relationship) – модели количественных соотношений между структурой и активностью [17].

## Заключение по обзору литературы

Представлен обзор литературных данных по теме исследования. Дана ботаническая характеристика растения *Podophyllum peltatum* L. и описаны его экологические особенности. На основе фармацевтических и медицинских свойств *P. peltatum* L. показана значимость этого растительного сырья для современной фармацевтической промышленности. Прежде всего, в качестве источника получения подофиллина - сложного комплексного экстракта с противоопухолевым эффектом. Рассмотрены преимущества биотехнологического сырья - каллусных и суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L. - перед растительным сырьем (корневища с корнями, листья). Обозначены найденные ранее способы усовершенствования клеточных культур *P. peltatum* L. для получения большего количества целевых веществ: подбор режима культивирования, регуляторов роста, изменение состава питательной среды, облучение светом определенной длины волны. Указаны другие биотехнологические подходы к получению биологически активных веществ с цитотоксической активностью: микроклональное размножение, сокультивирование, биотрансформация, культура «бородатых корней». Подробно охарактеризованы основные противоопухолевые вещества, обнаруженные в *P. peltatum* L.: алкалоиды (протоберберины, апорфины), фенольные соединения (лигнаны, флавоноиды). Приведены изученные механизмы действия на опухоли указанных веществ. Описаны преимущества и недостатки физико-химических методов определения химического состава экстрактов *P. peltatum* L., а также способов выявления их цитотоксической активности.

## 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова в период с 2018 по 2021 год.

### 2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись:

1. корневища с корнями и листья *P. peltatum* L.;
2. каллусные клеточные культуры, полученные из корня, почки и плода *P. peltatum* L.;
3. суспензионные клеточные культуры, полученные из корня «Рр(к), 94 ВИЛАР», почки «Рр(п), 94 ВИЛАР» и плода «Рр(пл), 95 ВИЛАР» *P. peltatum* L.

Растение и клеточные культуры входят в состав биоколлекций ФГБНУ ВИЛАР: «Лекарственные и ароматические растения защищенного и открытого грунта» [44], «Клеточные штаммы лекарственных растений, штаммы паразитарной и сапрофитной культуры спорыньи» [42].

Органы растений (корневища с корнями, листья) собрали в сентябре 2019 года. Корневища с корнями отмыли от земли, порезали на куски 5 см. Растительное сырье высушили при температуре 26 °С в течение 7 суток. Высушенное растительное сырье хранили в бумажных крафт-пакетах.

Каллусную клеточную культуру (поверхностное культивирование) выращивали на твердой питательной среде Мурасиге-Скуга (табл. 2.1.), в чашках Петри, в термостате, при постоянной температуре 26 °С, без освещения в течение 30 суток. Клеточную биомассу высушивали при температуре 26 °С в течение 7 суток. Высушенное биотехнологическое сырье хранили в бумажных крафт-пакетах [46].

Суспензионную клеточную культуру (глубинное культивирование) выращивали на жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга (табл. 2.1.) в колбах вместимостью 500 мл, расположенных на качалке с эллиптической траекторией качания, совершающей 98-100 об/мин, при постоянной температуре 26 °С, без освещения в течение 30 суток. Высушенное биотехнологическое сырье хранили в бумажных крафт-пакетах [46].

Таблица 2.1. – Состав питательных сред для поверхностного и глубинного культивирования клеток *P. peltatum* L.

№	Компоненты питательной среды	Количество компонента, мг/л (если не указано иное)	
		Поверхностное культивирование	Глубинное культивирование
Макроэлементы			
1	Нитрат аммония $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	1650
2	Хлорид кальция двухводный $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	330	440
3	Сульфат магния семиводный $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370
4	Гидрофосфат калия $\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170
5	Нитрат калия $\text{KNO}_3$	1900	1900
Микроэлементы			
6	Состав раствора микроэлементов: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Борная кислота <math>\text{H}_3\text{BO}_3</math> - 6,2 мг/л;</li> <li>• Хлорид кобальта шестиводный <math>\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}</math> - 0,025 мг/л;</li> <li>• Сульфат меди (II) пятиводный</li> </ul>	1 мл/л	1 мл/л

	<p><math>\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math> – 0,025 мг/л;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Сульфат цинка семиводный <math>\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> – 86 мг/л;</li> <li>• Сульфат марганца (II) моноводный <math>\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}</math> – 24,1 мг/л;</li> <li>• Йодид калия KI – 0,83 мг/л;</li> <li>• Молибдат натрия двухводный <math>\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math> – 0,25 мг/л;</li> <li>• дистиллированной воды <math>\text{H}_2\text{O}</math> до 1 л.</li> </ul>		
Раствор хелатного железа			
7	<p>Натрий железная соль этилендиаминтетрауксусной кислоты NaFe-ЭДТА</p> <p>Состав:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> - 5,57 г/л;</li> <li>• <math>\text{Na}_2</math>-ЭДТА (Трилон Б) - 7,45 г/л;</li> <li>• дистиллированной воды <math>\text{H}_2\text{O}</math> до 1 л.</li> </ul>	5 мл/л	5 мл/л
Витамины			
8	Никотиновая кислота	-	0,5
9	Са-пантотенат	2	2
10	Тиамин	2	2
Регуляторы роста			
11	НУК	1	1



12	Кинетин	0,5	0,5
Углеводы			
13	Сахароза	30 г/л	30 г/л
Желирующий агент (для твердой питательной среды)			
14	Агар	6 г/л	-

## 2.2. Исследование ростовых параметров суспензионных культур

Оборудование: рН-метр Mettler Toledo (Mettler Toledo, США); ламинарный бокс SafeFastElite (Faster S.r.l., Dasit Group, Италия); весовой модуль Sartorius CPA 225D (Sartorius, Германия), роторный испаритель RV 05 basic-1 ИКА (ИКА-Werke, Германия).

Для биотехнологической характеристики суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L., определяющей особенности роста и развития клеток, культивировали суспензию клеток в течение 45 суток. На 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 и 45 сутки культивирования снимали с пяти колб культуру, отделяли биомассу от культуральной жидкости под вакуумом, взвешивали исходное влажное сырье, высушивали в течение 7 суток при температуре 26 °С, взвешивали высушенное сырье, рассчитывали статистические данные по пяти повторностям (по 5 колбам) – выборочное среднее и стандартное отклонение в программе Microsoft Excel. Сравнимые выборки были проверены на нормальность с помощью критерия хи-квадрат. Распределение данных не соответствует нормальному. Поэтому значимость различий веса биомассы суспензионных клеточных культур на разных сроках культивирования определяли с помощью непараметрического статистического U-критерия Манна-Уитни.

Рассчитывали ростовые параметры суспензионных клеточных культур:

- индекс роста, по формуле  $I=(m_{\max}-m_0)/m_0$ , где  $m_0$  и  $m_{\max}$  – масса культуры в начале культивирования и в фазе максимального прироста биомассы соответственно;
- абсолютная скорость роста (г/сут), по формуле  $dm/dt$ , где  $dm$  и  $dt$  – изменение массы и изменение времени соответственно;

- удельная скорость роста ( $\text{сут}^{-1}$ ), по формуле  $\mu=(dm/dt)/m$ , где  $dm$  и  $dt$  – изменение массы и времени соответственно, а  $m$  – масса культуры в конечный момент времени;
- время удвоения биомассы (сут), по формуле  $\tau=\ln 2/\mu=0,692/\mu$ , где  $\mu$  - удельная скорость роста;
- экономический коэффициент, по формуле  $Y=(m_{\max}-m_0)/s_0$ , где  $m_0$  и  $m_{\max}$  – масса культуры в начале культивирования и в фазе максимального прироста биомассы соответственно, а  $s_0=30$  г сахарозы на 1 литр питательной среды (3 %) [33].

С помощью рН-метра определяли исходную кислотность жидкой питательной среды, а также кислотность суспензионных клеточных культур на каждом изучаемом сроке культивирования (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 и 45 суток). Измерения делали в пяти повторностях (в пяти колбах). Рассчитывали выборочное среднее и стандартное отклонение в программе Microsoft Excel. Сравнимые выборки были проверены на нормальность с помощью критерия хи-квадрат. Распределение данных не соответствует нормальному. Поэтому значимость различий кислотности суспензионной клеточной культуры от кислотности питательной среды определяли с помощью непараметрического статистического U-критерия Манна-Уитни.

### 2.3. Микроскопическое исследование суспензионных культур

Реактивы: дистиллированная вода, метиленовый синий (ООО «Диаэм», Россия).

Оборудование: оптический микроскоп МББ-1А с бинокулярной насадкой АУ-26 (АО «ЛОМО», Россия); рН-метр Mettler Toledo (Mettler Toledo, США); камера Горяева для счета форменных элементов крови (АО «Красногвардеец», Россия); дистиллятор Ultrapure TYPE 1 Direct-Q 3 UV (Sigma-Aldrich, США); ламинарный бокс SafeFastElite (Faster S.r.l., Dasit Group, Италия).

Для морфологической характеристики суспензионных клеточных культур использовали два основных метода: визуальный осмотр; оптическая

микроскопия. Препараты живых клеток рассматривались через оптический микроскоп с бинокулярной насадкой при 90-кратном увеличении. Для определения размеров клеток применялась камера Горяева, содержащая квадраты двух размеров: 200×200 мкм; 50×50 мкм.

Жизнеспособность клеток определялась по методу окрашивания 0,1 % метиленовым синим: взвесить 10 мг порошка метиленового синего, растворить в 10 мл воды; в ламинарном боксе из колбы с суспензионной клеточной культурой с помощью пластиковой пипетки на 1 мл с отрезанным носиком (для того, чтобы в пробу попали и крупные агрегаты клеток) стерильно отобрать пробу суспензии клеток; на предметное стекло пипеткой нанести каплю клеточной суспензии, рядом - каплю раствора метиленового синего, капли смешать и накрыть покровным стеклом, через минуту стекло просмотреть под микроскопом и подсчитать количество окрашенных в голубой цвет клеток – при просмотре не менее 500 клеток. Жизнеспособность культуры – это процент неокрашенных клеток к общему числу просмотренных клеток [33].

#### **2.4. Получение экстрактов органов растения и клеточных культур**

Реактивы: дистиллированная вода, калия дигидрофосфат (ООО ТД «Химмед», Россия), дикалия гидрофосфат (ООО ТД «Химмед», Россия), этиловый спирт 96 % (ООО ТД «Химмед», Россия), метиловый спирт 100 % (ЗАО «Вектон», Россия), этилацетат (ООО ТД «Химмед», Россия), дихлорметан (ООО ТД «Химмед», Россия), хлороформ (ООО ТД «Химмед»), ацетон (ЗАО «Экос-1», Россия).

Оборудование: дистиллятор Ultrapure TYPE 1 Direct-Q 3 UV (Sigma-Aldrich, США); pH-метр Mettler Toledo (Mettler Toledo, США); весовой модуль Sartorius CPA 225D (Sartorius, Германия), вибротельница Retsch MM400 (Retsch, Германия), шейкер REAX top (Heidolph, Германия), концентратор Labconco CentriVar DNA (Labconco, США), центрифуга Eppendorf 5430 R (Eppendorf, Германия); роторный испаритель RV 05 basic-1 ИКА (ИКА-Werke, Германия).

Для проведения экстракции органов растения (корневища с корнями, листья), каллусных и суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L. использовали 6 растворителей: калий-фосфатный буферный раствор [28, 187], этиловый спирт [11, 18, 29], метиловый спирт [13, 24, 187], хлороформ [22, 29], ацетон [81], этилацетат [187]. Первые четыре растворителя - это экстрагенты, которые указывались, как наиболее предпочтительные для получения экстрактов из растений и клеточных культур, содержащих подофиллотоксин [29, 187]. Ацетон выбран как экстрагент, предпочтительный для получения комплекса фенольных соединений [81]. Этилацетат присутствует в технологиях получения экстрактов, содержащих подофиллотоксин, как промежуточный экстрагент, позволяющий достичь большей чистоты экстракта при экстракции фосфатным буферным раствором [187].

Калий-фосфатный буферный раствор получали в соответствии с подразделом «Фосфатный буферный раствор рН 7,0 (3)» фармакопейной статьи ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» Государственной фармакопеи РФ XIV [8]: 5,0 г калия дигидрофосфата и 11,0 г дикалия гидрофосфата растворить в 900,0 мл воды; довести рН до 7,0 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты разведённой 10 % или раствора натрия гидроксида разведённого 8,5 %; довести объём раствора водой дистиллированной до 1000,0 мл.

Экстракция калий-фосфатным буферным раствором: 1 г измельченного сырья залить 20 мл калий-фосфатного буферного раствора (рН=7,0); экстрагировать 60 минут при температуре  $50 \pm 5$  °С при постоянном перемешивании; отделить извлечение от сырья при помощи бумажного фильтра; к фильтрату в делительной воронке добавить этилацетат в соотношении 1:1; интенсивно встряхивать в течение 10 минут; отделить органическую фазу; этилацетат выпарить при пониженном давлении в роторном испарителе; взвесить полученный густой смолообразный экстракт [28].

Для сравнения дополнительно проводили экстракцию сырья калий-фосфатным буферным раствором без стадии очистки полученного жидкого

экстракта этилацетатом, после экстракции также выпаривали экстрагент (калий-фосфатный буферный раствор) и определяли массу сухого экстракта.

Экстракция этиловым спиртом: 1 г измельченного сырья залить 10 мл этилового спирта; экстрагировать 60 минут при температуре 60 °С при постоянном перемешивании; полученный жидкий экстракт выпарить под вакуумом на роторном испарителе; определить массу сухого экстракта [187].

Использовали два варианта экстракции: в качестве экстрагента 50 [18] или 96 % [11] этиловый спирт.

Экстракция метиловым спиртом: 1 г измельченного сырья залить 10 мл метилового спирта; оставить на 1 сутки; полученный жидкий экстракт выпарить под вакуумом на роторном испарителе; определить массу сухого экстракта [14]. Другой вариант экстракции метиловым спиртом предполагает выдерживание в течение 2 суток с последующей очисткой от апиола, кристаллизующегося при охлаждении, вымораживанием [24]. Третий вариант метанольной экстракции предполагает применение 80 % метилового спирта (с 20 % дистиллированной воды) в качестве экстрагента с последующей очисткой водно-дихлорметановой смесью (по 4 мл каждой жидкости), отделением органического слоя и выпаривания его под вакуумом до сухого экстракта [187]. В рамках исследования провели три экстракции: 1) метиловым спиртом 100 %; 2) метиловым спиртом 80 %; 3) метиловым спиртом 80 % с последующей очисткой дихлорметаном.

Экстракция хлороформом: 1 г измельченного сырья залить 10 мл хлороформа; оставить на 1 сутки; полученный жидкий экстракт выпарить под вакуумом на роторном испарителе; определить массу сухого экстракта [29]. Экстракцию этилацетатом провели таким же образом, только хлороформ заменили на этилацетат.

Экстрагирование комплекса фенольных соединений ацетоном: в пробирках взвесить навески сырья 30 мг, измельчить на вибрмельнице, добавить 1 мл 80 % ацетона, экстрагировать при постоянном перемешивании на шейкере в течение 60 минут, центрифугировать 10 минут при 20000 g,

полученный жидкий экстракт слить в новые пробирки, выпарить в концентрате до сухого остатка [81].

## **2.5. Изучение химического состава экстрактов суспензионных культур методом тонкослойной хроматографии**

Реактивы: этиловый спирт 96 % (ООО ТД «Химмед», Россия), хлороформ (ООО ТД «Химмед», Россия).

Стандарт: подофиллотоксин (Sigma-Aldrich, США).

Оборудование: денситометр Sorbfil (ООО «ИМИД», Россия).

Непосредственно перед проведением испытаний сухой экстракт, полученный из 1 г сырья, растворяли в 1 мл этилового спирта 96 %.

Скрининг на присутствие подофиллотоксина в экстрактах осуществляли методом ТСХ на пластинках со слоем силикагеля Silufol UV 254.

Хроматографирование проводили в системе: хлороформ - этиловый спирт 96 % в соотношении 23:1.

В качестве раствора сравнения использовали 0,5 % раствор подофиллотоксина.

Детекция зон адсорбции проводили раствором 50 % серной кислоты с последующим нагреванием при температуре 100-105 °С в течение 10 минут [29].

## **2.6. Изучение химического состава экстрактов суспензионных культур методом газовой хроматографии**

Реактивы: метиловый спирт 100 % (ЗАО «Вектон», Россия).

Оборудование: хромато-масс-спектрометр VarianGC-220MS (Varian Medical Systems UK, Великобритания).

ГЖХ-МС анализ экстрактов на основе метилового спирта 100 % [24] осуществляли на хромато-масс-спектрометре VarianGC-220MS с масс-анализатором типа «ионная ловушка».

Хроматографическое разделение компонентов пробы проводилось на кварцевой капиллярной колонке FactorFOUR VF-5ms (30 м × 0,25 мм). Газ-

носитель – гелий с постоянной скоростью потока 1,0 мл/мин. В инжектор хроматографа при температуре 200 °С вводилось по 1 мкл пробы.

Идентификацию разделенных компонентов проводили с использованием библиотеки масс-спектров NIST08 Mass Spectral Library и алгоритмов сравнения программного обеспечения Varian.

Количественная оценка осуществлялась методом нормализации по площади пиков.

## **2.7. Изучение химического состава ацетоновых экстрактов методом ультраэффективной жидкостной хроматографии**

Реактивы: вода деионизованная с электрическим сопротивлением 18,2 МОм•см (Merck, Millipore, Direct-Q3).

Оборудование: хроматограф Waters Acquity UPLC (Waters Corporation, США), весовой модуль Sartorius CPA 225D (Sartorius, Германия), шейкер REAX top (Heidolph, Германия), концентратор Labconco CentriVar DNA (Labconco, США), центрифуга Eppendorf 5430 R (Eppendorf, Германия), система очистки воды Millipore Direct-Q® 3 UV Water Purification System (Merck KGaA, Германия).

Разделение фенольных соединений, входящих в состав ацетонового экстракта [81], проводилось на хроматографической системе Acquity UPLC (Waters Corporation, США) оснащенной детектором с фотодиодной матрицей (Waters Corporation, США).

Хроматографическая колонка Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (50×2,1 мм, 1,7 μm, Waters, Ирландия), с предколонкой Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (5×2,1 мм, 1,7 μm, Waters, Ирландия).

Подвижная фаза (А) - 0,1 % муравьиная кислота в деионизованной воде, подвижная фаза (Б) – 100 % ацетонитрил.

Элюирование в градиентном режиме: 0-0,5 мин (1% В), 0,5-2,2 мин (1-30 % В), 2,2-7,5 мин (30-35 % В), 7,5-8,5 мин (35-1 % В), 8,5-9,5 мин (1 % В).

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.

Идентификация веществ проводилась при сравнении времени удерживания и спектра пиков хроматограмм образцов изучаемых экстрактов с временем удерживания и спектров пиков хроматограмм стандартных веществ. Также учитывались спектры веществ, опубликованные в научной литературе.

В указанных ранее условиях хроматографирования были получены хроматограммы для следующих стандартных веществ: подофиллотоксин, кверцитин, стахиурин, эпикатехин, кофейная кислота, нарингенин, галловая кислота, пентагалоилглюкоза, эллаговая кислота, пара-кумаровая кислота.

## **2.8. Определение цитотоксической активности экстрактов клеточных культур МТТ-методом**

Реактивы: тиазол ил синий тетразолий бромид (МТТ) (ООО «Диаэм», Россия), питательная среда DMEM жидкая с глутамином и глюкозой 1 г/л (ООО НПП «ПанЭко», Россия), питательная среда RPMI-1640 жидкая с глутамином (ООО НПП «ПанЭко»), фетальная сыворотка телят (Biosera, Франция), гентамицина сульфат (ЗАО «Мосагроген», Россия), амфотерицин В (ОАО «Синтез», Россия), раствор Версена (ООО НПП «ПанЭко», Россия), трипсина раствор 0,25 % (ООО НПП «ПанЭко», Россия), диметилсульфоксид (АО «Татхимфармпрепараты», Россия).

Клеточные линии: *HeLa* (клетки рака шейки матки, Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН), *K562* (лейкемические клетки, Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН), фибробласты. Все клеточные линии входят в состав биоколлекции «Клеточные штаммы человека» ФГБНУ ВИЛАР [43].

Оборудование: планшетный фотометр Dynex Technologies (Dynex Technologies, США), весовой модуль Sartorius CPA 225D (Sartorius, Германия), шейкер REAX top (Heidolph, Германия), CO<sub>2</sub>-инкубатор N-Biotek (N-Biotek,



Корея), ламинарный бокс SafeFastElite (Faster S.r.l., Dasit Group, Италия), инвертированный микроскоп Carl Zeiss (Zeiss AG, Германия), лабораторный холодильник Pozis (АО «ПОЗиС», Россия), автоклав ВК-75 (ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», Россия), камера Горяева для счета форменных элементов крови (АО «Красногвардеец», Россия); дистиллятор Ultrapure TYPE 1 Direct-Q 3 UV (Sigma-Aldrich, США); шейкер-инкубатор ELMi ST-3M (Elmi, Латвия).

Для проведения цитотоксического анализа из полученного экстракта получали четыре разведения экстракта: 1:0, 1:10, 1:100 и 1:1000. Высушенные экстракты взвешивали – определяли общую массу комплекса фенольных соединений.

Для получения базового статистического описания (выборочное среднее, стандартное отклонение) результатов использовали Microsoft Excel. Для сравнения результатов эксперимента с данными по отрицательному контролю (вместо экстракта – физиологический раствор, раствор этилового спирта или ДМСО) использовали непараметрический статистический U-критерий Манна-Уитни.

Процедура проведения МТТ-теста:

1. Клетки *HeLa* и фибробласты культивируют в среде DMEM (с глутамином) с добавлением 10 % фетальной сыворотки телят, гентамицина и амфотерицина В в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С до образования монослоя. Клетки *K562*, в отличие от *HeLa* и фибробластов, культивируют в среде RPMI с добавлением 20 % фетальной сыворотки телят.
2. Для получения клеточной суспензии *HeLa* и фибробластов монослой клеток трипсинизируют (для отделения белковых нитей клеток от адгезивного покрытия внутренней поверхности флакона) с последующей инактивацией трипсина добавлением полной питательной среды с сывороткой. Клеточную суспензию *K562* получают добавлением питательной среды с сывороткой, без этапа трипсинизации.

3. Подсчёт клеток производят в камере Горяева. Общее количество клеток в суспензии должно составлять  $1 \cdot 10^5$  клеток/мл.
4. Во все лунки 96-луночного планшета с помощью 8-канального дозатора и стерильных наконечников, тщательно ресуспендируя, вносят 180 мкл суспензии клеток в свежей питательной среде.
5. В стерильных эппендорфах на 1,5 мл готовят разведения анализируемых соединений в стерильном физиологическом растворе, спиртовом растворе или диметилсульфоксиде.
6. В каждую лунку планшета с клетками вносят по 20 мкл приготовленных растворов исследуемых соединений. Исследование проводят в четырех повторностях. В лунки отрицательного контроля планшета вместо анализируемых соединений вносят аналогичные объемы растворителя (физиологический раствор, спиртовой раствор или диметилсульфоксид).
7. После внесения исследуемых веществ клетки культивируют в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 48 и 72 часов.
8. В ванночке для многоканального дозатора готовят раствор МТТ-красителя: 2 мл питательной среды + 10 мг МТТ-красителя (5 мг/мл) на один 96-луночный планшет. Приготовленную реакционную смесь вносят в объеме 20 мкл в каждую лунку планшета и инкубируют в  $\text{CO}_2$  инкубаторе 2 часа.
9. По истечении времени инкубации культуральную среду с исследуемыми соединениями с осторожностью, стараясь не задевать клетки, удаляют, в каждую лунку планшета вносят по 200 мкл диметилсульфоксида и инкубируют 5-10 минут. Появившееся фиолетовое окрашивание детектируют на планшетном фотометре при 570 нм.
10. Рассчитывают процент жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке относительно лунок отрицательного контроля, жизнеспособность которых принимают за 100 % [16].

## 2.9. Определение цитотоксической активности экстрактов клеточных культур резазурин-тестом

Реактивы: резазурин (Sigma-Aldrich, США), питательная среда DMEM жидкая с глутамином и глюкозой 1 г/л (ООО НПП «ПанЭко», Россия), питательная среда RPMI-1640 жидкая с глутамином (ООО НПП «ПанЭко»), фетальная сыворотка телят (Biosera, Франция), гентамицина сульфат (ЗАО «Мосагроген», Россия), амфотерицин В (ОАО «Синтез», Россия), раствор Версена (ООО НПП «ПанЭко», Россия), трипсина раствор 0,25 % (ООО НПП «ПанЭко», Россия).

Клеточные линии: *HeLa* (клетки рака шейки матки, Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН), *K562* (лейкемические клетки, Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН), фибробласты. Все клеточные линии входят в состав биоколлекции «Клеточные штаммы человека» ФГБНУ ВИЛАР [43].

Оборудование: планшетный фотометр Dynex Technologies (Dynex Technologies, США), весовой модуль Sartorius CPA 225D (Sartorius, Германия), шейкер REAX top (Heidolph, Германия), CO<sub>2</sub>-инкубатор N-Biotek (N-Biotek, Корея), ламинарный бокс SafeFastElite (Faster S.r.l., Dasit Group, Италия), инвертированный микроскоп Carl Zeiss (Zeiss AG, Германия), лабораторный холодильник Pozis (АО «ПОЗиС», Россия), автоклав ВК-75 (ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», Россия), камера Горяева для счета форменных элементов крови (АО «Красногвардеец», Россия); дистиллятор Ultrapure TYPE 1 Direct-Q 3 UV (Sigma-Aldrich, США); шейкер-инкубатор ELMi ST-3M (Elmi, Латвия).

Для проведения цитотоксического анализа из полученного экстракта получали четыре разведения экстракта: 1:0, 1:10, 1:100 и 1:1000. Высушенные экстракты взвешивали – определяли общую массу комплекса фенольных соединений.

Для получения базового статистического описания (выборочное среднее, стандартное отклонение) результатов использовали Microsoft Excel. Для

сравнения результатов эксперимента с данными по отрицательному контролю (вместо экстракта – физиологический раствор, раствор этилового спирта или ДМСО) использовали непараметрический статистический U-критерий Манна-Уитни.

Процедура проведения резазурин-теста отличается только на этапе 8. Этапы 1-7 и 9-10 идентичны этапам 1-7 и 9-10 в МТТ-тесте. Этап 8: в ванночке для многоканального дозатора готовят раствор резазурин-красителя - 1 мл питательной среды + 2 мг МТТ-красителя (2 мг/мл) на один 96-луночный планшет. Приготовленную реакционную смесь вносят в объеме 10 мкл в каждую лунку планшета и инкубируют в CO<sub>2</sub>-инкубаторе 24 часа [16].

## ГЛАВА 3. Усовершенствование клеточных культур *P. peltatum* L.

### 3.1. Первичные суспензионные культуры *P. peltatum* L.

Первичные каллусные культуры из эксплантов (корня, почки и плода растения *P. peltatum* L.) обладали достаточно низкой интенсивностью нарастания биомассы - период роста длился около 60 суток. В процессе культивирования клетки экскретировали в питательную среду вещества (предположительно – фенольные соединения), скапливающиеся в районе клеточной колонии и тормозящие ее рост. Для решения возникшей проблемы каллусные клетки перенесли в жидкий питательный субстрат с минеральным составом по прописи Мурасиге-Скуга, с 3 % содержанием сахарозы, с добавлением кинетина (регулятор роста растений – природный цитокинин), нафтилуксусной (НУК, регулятор роста растений - синтетический ауксин) и 2,4-дихлорфеноксисукусной (2,4-Д, регулятор роста растений – синтетический ауксин) кислот. Диссоциация каллусной массы началась сразу. Через 4-6 недель образовалась суспензионная культура, состоящая из мелких 1-10-клеточных агрегатов. Период продуктивного нарастания полученных клеточных линий составлял 20-25 суток, индекс роста - 2,7, абсолютная скорость роста – 0,37 г/сут. Рост суспензионных культур всех линий в режиме субкультивирования был стабилен. Воздействие ингибирующих факторов не отмечалось. Первичное исследование экстрактов клеточных культур методом ТСХ позволило идентифицировать следовые количества подофиллотоксина в экстрактах суспензионных клеточных культур, полученных из почки и плода [46].

### 3.2. Исследование ростовых параметров суспензионных культур

#### *P. peltatum* L.

Экспериментальная выборка образцов суспензионной клеточной культуры при каждом сроке культивирования была представлена 5 повторностями – 5 колб по 500 мл, заполненные на 100 мл питательной средой и 25 мл 15-суточной суспензией клеток (инокулюм). Всего 50 колб для 10 сроков культивирования.

Различия в массе высушенной биомассы суспензионных клеточных культур двух последовательных сроков культивирования, у разных культур при одном сроке культивирования, а также кислотности суспензионных клеточных культур при каждом сроке культивирования с кислотностью питательной среды определялись по непараметрическому статистическому U-критерию Манна-Уитни.

Результаты взвешивания высушенных суспензий клеток (среднее и стандартное отклонение) представлены в табл. 3.1.

Таблица 3.1. - Масса высушенной биомассы суспензионных клеточных культур

#### *P. peltatum* L.

Сутки	Масса высушенной биомассы клеточных культур, г/л		
	Плод	Почка	Корень
0	1,04±0,08	1,60±0,40	1,96±0,52
5	2,08±0,40	1,52±0,64	1,92±0,64
10	3,44±0,24	5,20±0,56	2,08±0,48
15	4,88±0,40	8,00±0,64	6,24±2,32
20	6,32±0,56	8,80±0,64	7,92±1,84
25	6,00±0,08	8,16±0,48	8,48±1,04
30	5,04±0,08	7,05±0,64	7,12±0,72
35	4,08±0,16	6,32±0,55	5,92±1,36
40	3,68±0,16	5,94±0,40	4,96±0,40
45	3,28±0,08	5,27±0,55	4,64±0,96

Различия с указанием уровня значимости в массе высушенной биомассы суспензионных клеточных культур между культурами, снятыми в двух последовательных сроках культивирования, представлены в табл. 3.2.

Таблица 3.2. – Различия между двумя сроками культивирования суспензионной культуры *P. peltatum* L.

Сроки культивирования, сутки	Уровень значимости различий		
	С.к.к. <sup>1</sup> из плода	С.к.к. из почки	С.к.к. из корня
0-5	$p \leq 0,01$	НЗР <sup>2</sup>	$p \leq 0,05$
5-10	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	НЗР
10-15	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,05$
15-20	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,05$	НЗР
20-25	НЗР	НЗР	НЗР
25-30	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,05$
30-35	$p \leq 0,01$	НЗР	НЗР
35-40	$p \leq 0,01$	НЗР	НЗР
40-45	$p \leq 0,01$	НЗР	НЗР

<sup>1</sup>С.к.к. – суспензионная клеточная культура, <sup>2</sup>НЗР – нет значимых различий.

У суспензионной клеточной культуры, полученной из корня *P. peltatum* L., обнаружили плавное и медленное нарастание клеточной массы до 20 суток, а затем столь же плавное и медленное понижение общей клеточной массы (нет значимых различий в данных между последовательными сроками культивирования).

У суспензионной культуры, полученной из почки растения, обнаружили довольно быстрое нарастание массы со значимыми различиями между данными по 5 и 10, 10 и 15, 15 и 20 суткам культивирования, удержание похожего значения биомассы в течение 20-25 суток культивирования, и затем довольно плавное понижение массы (нет значимых различий в данных между последовательными сроками культивирования).

У суспензионной культуры, полученной из плода растения, обнаружены: довольно быстрое и резкое нарастание массы высушенной биомассы до 20 суток

(на уровне значимости  $p \leq 0,01$ ), период удержания стабильной массы 20-25 суток (нет значимых различий между данными по 20 и 25 суткам культивирования), довольно быстрое и резкое уменьшение массы высушенной биомассы с 25 до 45 суток культивирования.

Характеристика по фазам роста (рис. 3.1.) полностью повторяет сравнительную характеристику, связанную с нарастанием биомассы, описанную ранее.

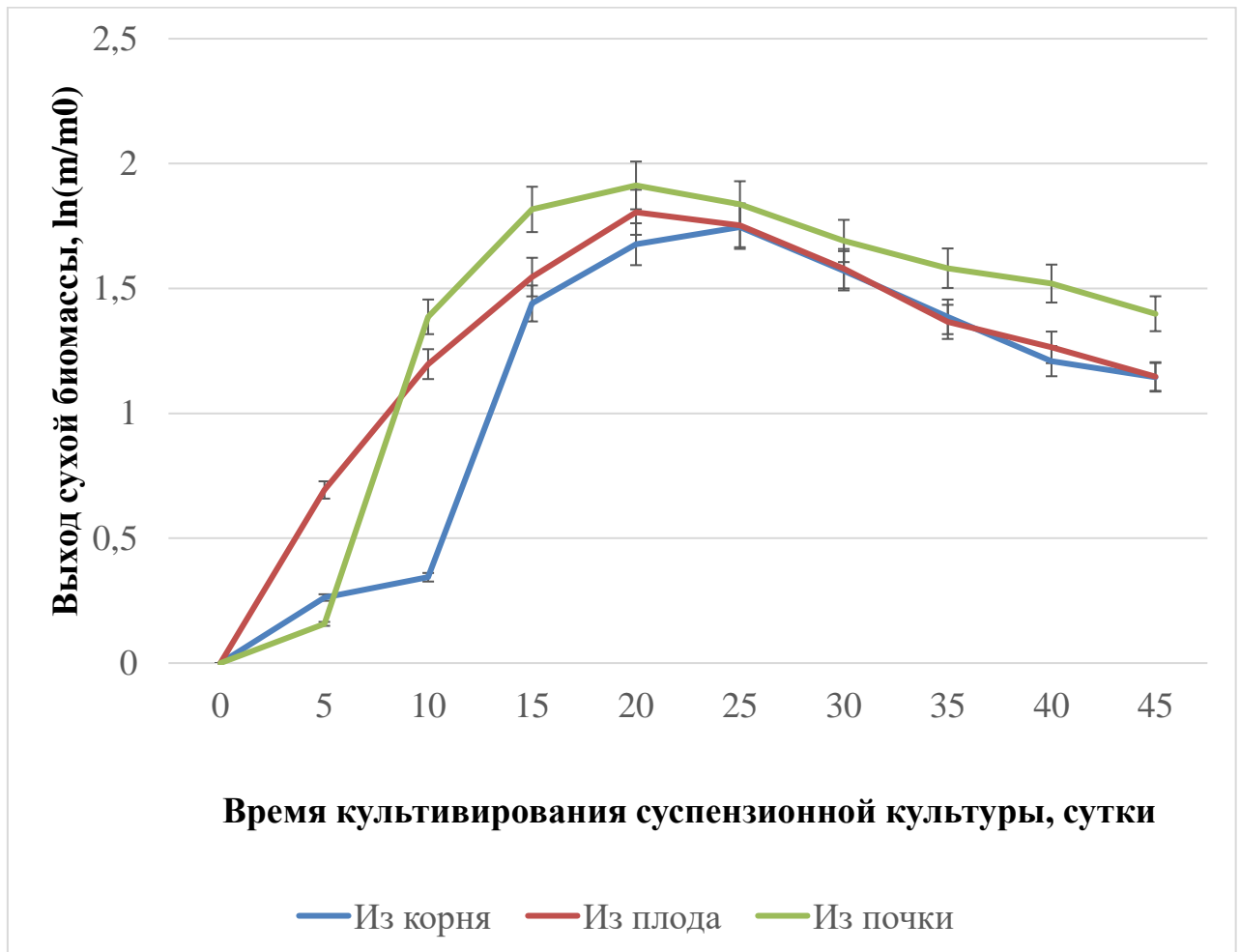


Рисунок 3.1. - Логарифмическая кривая роста суспензионных культур  
*P. peltatum* L.\*

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



Таблица 3.3. – Различия между суспензионными культурами *P. peltatum* L., полученными из разных органов, при одном сроке культивирования

Сроки культивирования, сутки	Уровень значимости различий		
	Корень-Плод	Корень-Почка	Плод-Почка
0	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$
5	НЗР <sup>1</sup>	НЗР	НЗР
10	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$
15	НЗР	НЗР	$p \leq 0,01$
20	НЗР	$p \leq 0,01$	НЗР
25	$p \leq 0,01$	НЗР	$p \leq 0,01$
30	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$
35	$p \leq 0,01$	НЗР	$p \leq 0,05$
40	$p \leq 0,01$	НЗР	$p \leq 0,01$
45	$p \leq 0,01$	НЗР	$p \leq 0,01$

<sup>1</sup>НЗР – нет значимых различий.

Прирост биомассы клеточных культур, полученных из почки и корня, а также из почки и плода, значительно различаются при большей части сроков культивирования. Прирост биомассы корня и почки оказывается очень близким почти при всех сроках культивирования, кроме 0 (добавление инокулюма), 10, 20 и 30 суток.

Латентная фаза (1), при которой нет явного роста биомассы, у клеточной культуры из плода совсем не выражена, так же, как и фаза ускорения роста (2). Сразу начинается фаза экспоненциального роста (3) и длится до 15 суток. Латентная фаза (1) у клеточных культур из корня и почки длится до 5 суток. Далее у культуры из корня идет полноценная фаза ускорения роста (2), а у культуры из почки – фаза экспоненциального роста (3) – с 5 до 15 суток. У культуры из корня фаза экспоненциального роста (3) идет с 10 до 15 суток. Фаза замедления роста (4) у всех культур проходит с 15 до 20 суток. Стационарная фаза (5) у всех – с 20 по 25 суток. Далее идет фаза деградации (6) у всех культур с 25 суток.

Данные по особенностям развития суспензии клеток в питательной среде, подтверждаются индексами роста, удельными скоростями роста и временем удвоения биомасс (рис. 3.2.).

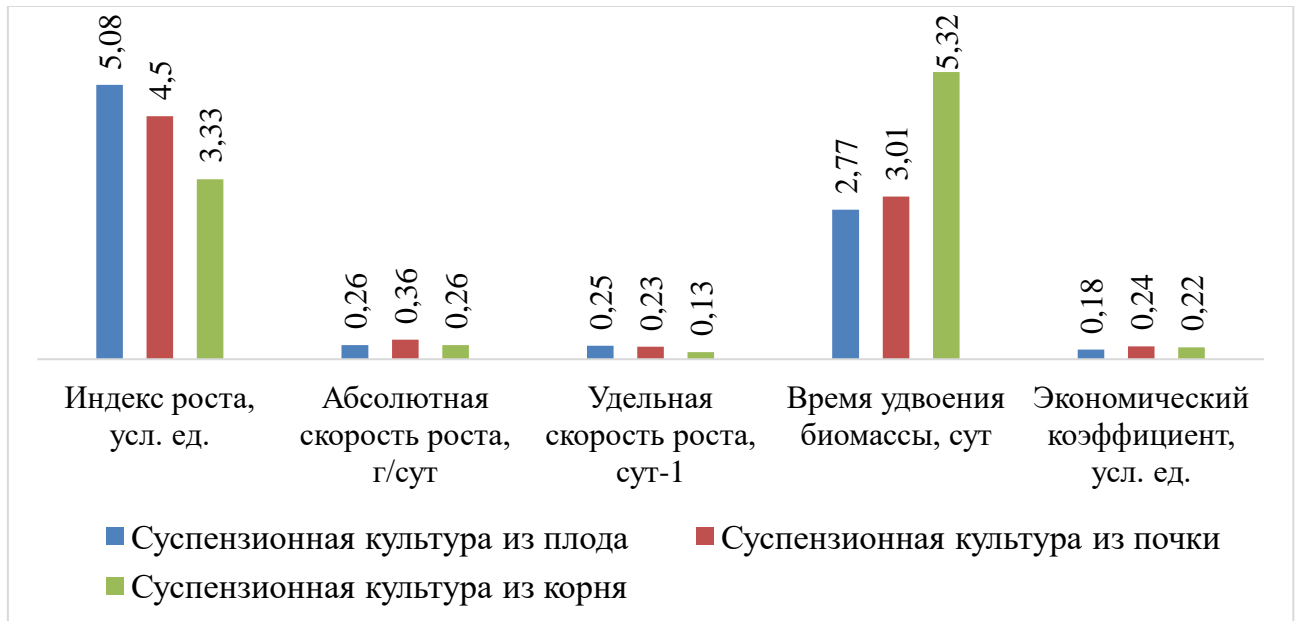


Рисунок 3.2. - Ростковые параметры суспензионных культур *P. peltatum* L.

Все эти биотехнологические параметры показывают медленное и плавное развитие культуры, полученной из корня, быстрое развитие культуры, полученной из плода *P. peltatum* L. Коэффициент удельной скорости роста показывает, что культура, полученная из плода, увеличивается в сутки на 25 %, из почки – на 23 %, из корня – на 13 %. Коэффициент времени удвоения биомассы показывает, что культуры, полученные из плода и почки, удваиваются в массе за 3 суток, а культура, полученная из корня, – за 5 суток.

Экономический коэффициент на рис. 3.2. показывает, что 18, 24 и 22 % субстрата клетки, полученные из плода, почки и корня, соответственно используют на конструктивный обмен (построение биомассы), а остальную часть субстрата используют на энергетический обмен (дыхание) [33].

Данные по кислотности суспензионных культур разного срока культивирования приведены на рис. 3.3. Изначальная кислотность жидкой питательной среды составляет  $5,58 \pm 0,05$ . При добавлении 25 мл инокулюма (суспензия клеток при сроке культивирования 15 суток) к 100 мл питательной среды общее значение рН понижается.

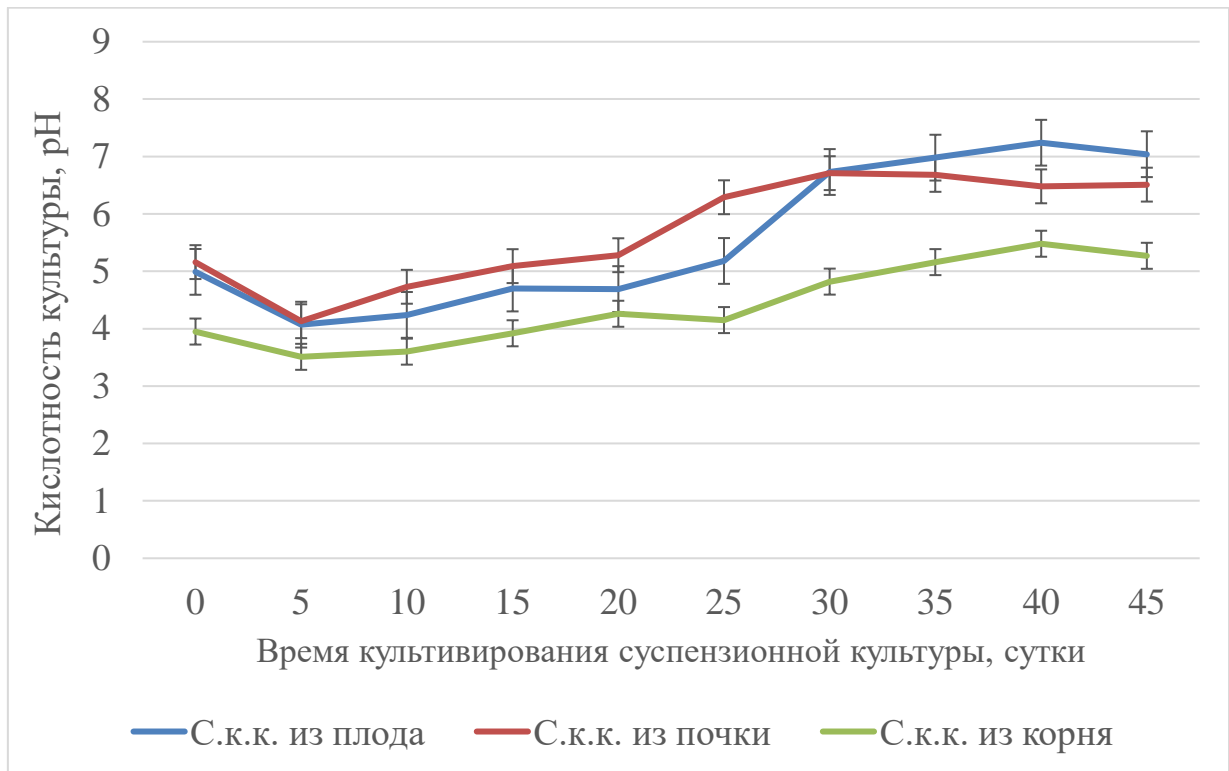


Рисунок 3.3. - Кислотность суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L.\*

\*С.к.к. – суспензионная клеточная культура. рН суспензионной культуры из корня на 35 и 40 сутки не имеет значимых отличий от рН питательной среды. рН суспензионной культуры из почки на 0 и 20 сутки, из корня на 0, 15 и 30 сутки отличается от рН питательной среды на уровне значимости  $p \leq 0,05$ . рН всех остальных суспензионных культур отличаются от рН питательной среды на уровне значимости  $p \leq 0,01$ .

Кислотность понижается к 5 суткам до 3,51-4,13. Различия уровня кислотности значимы для культур, полученных из корня и почки ( $p \leq 0,01$ ), корня и плода ( $p \leq 0,01$ ), не значимы для культур, полученных из почки и плода.

Затем рН опять повышается и достигает примерных значений кислотности чистой питательной среды без инокулюма к 20 суткам (культура из почки), 25 суткам (культура из плода) и 40 суткам (культура из корня).

Далее в суспензионных культурах из почки и плода идет повышение рН, смещение в щелочную сторону, а в культуре из корня рН понижается. Кислотность удерживается примерно на одном уровне: для суспензионной культуры из корня в 10-15 суток и 20-40 суток (нет значимых различий между следующими друг за другими пятидневными периодами); для суспензионной

культуры из почки в 30-35 суток и 40-45 суток (нет значимых различий); для суспензионной культуры из плода в 15-20 и 30-35 суток (нет значимых различий) (рис. 3.3.).

### 3.3. Морфофизиологические особенности суспензионных культур

#### *P. peltatum* L.

Визуальное исследование суспензионных клеточных культур, полученных из разных частей растения *P. peltatum* L. (корень, почка, плод) в разные фазы роста (14 и 28 суток) выявило, что они имеют разный цвет (рис. 3.4.).

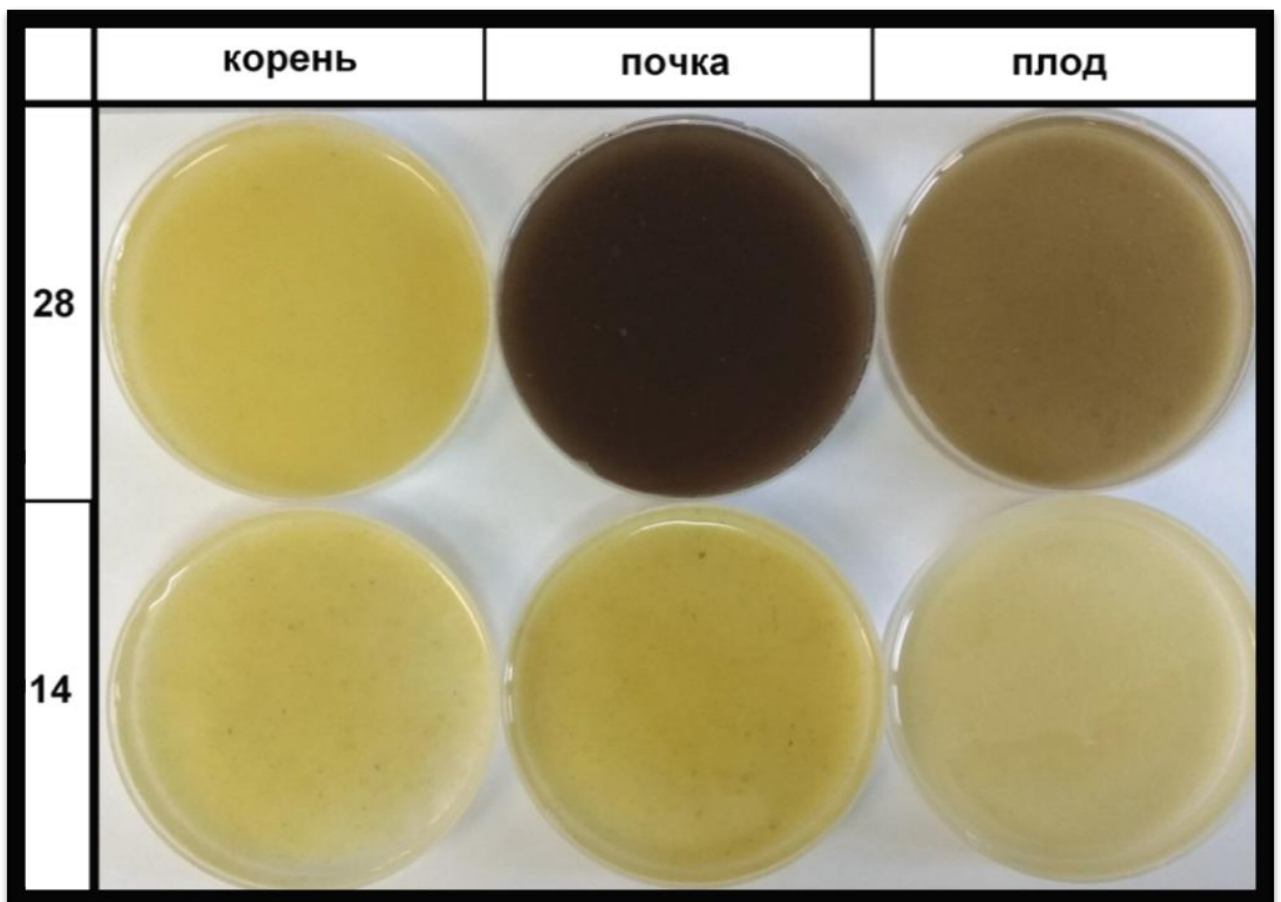


Рисунок 3.4. – Цвет 14- и 28-суточной суспензионных культур, полученных из корня, почки и плода *P. peltatum* L.

14 суток – время культивирования, связанное с активным ростом и размножением клеток. Именно в этот срок производится пересадка инокулюма на свежую питательную среду. Предполагается, что в этот срок клетки наиболее адаптивны и легко переносят изменение условий культивирования, связанные с

переносом на свежую питательную среду. В это время культивирования все суспензионные клеточные культуры – яркие, светло-желтые. Они отличаются по оттенкам желтого цвета: наиболее насыщенный желтый цвет проявляется у культуры, полученной из почки; чистый желтый цвет проявляется у культуры, полученной из корня; охристый цвет проявляется у культуры, полученной из плода.

28 суток – время культивирования, связанное с замедлением всех процессов, прекращением роста и развития, разрушением клеток и выделением вторичных метаболитов, связанных со стрессом и старением. В это время культивирования суспензионные клеточные культуры, полученные из почки и плода, – темно-коричневые, суспензионная культура, полученная из корня, остается насыщенно желтой, либо становится темно-коричневой, как культура, полученная из почки. Культура, полученная из почки – наиболее темная. У культуры, полученной из плода, – более мягкий, коричневато-желтый (болотный) цвет.

Суспензионная клеточная культура из корня – крупнодисперсная. Клетки разного размера, неравномерно распределены по объему суспензии. Основная масса клеток находится у дна колбы. Размер клеток клеточной культуры корня варьирует от  $70 \times 70$  мкм до  $100 \times 100$  мкм. По форме клетки круглые и овальные (рис. 3.5.).

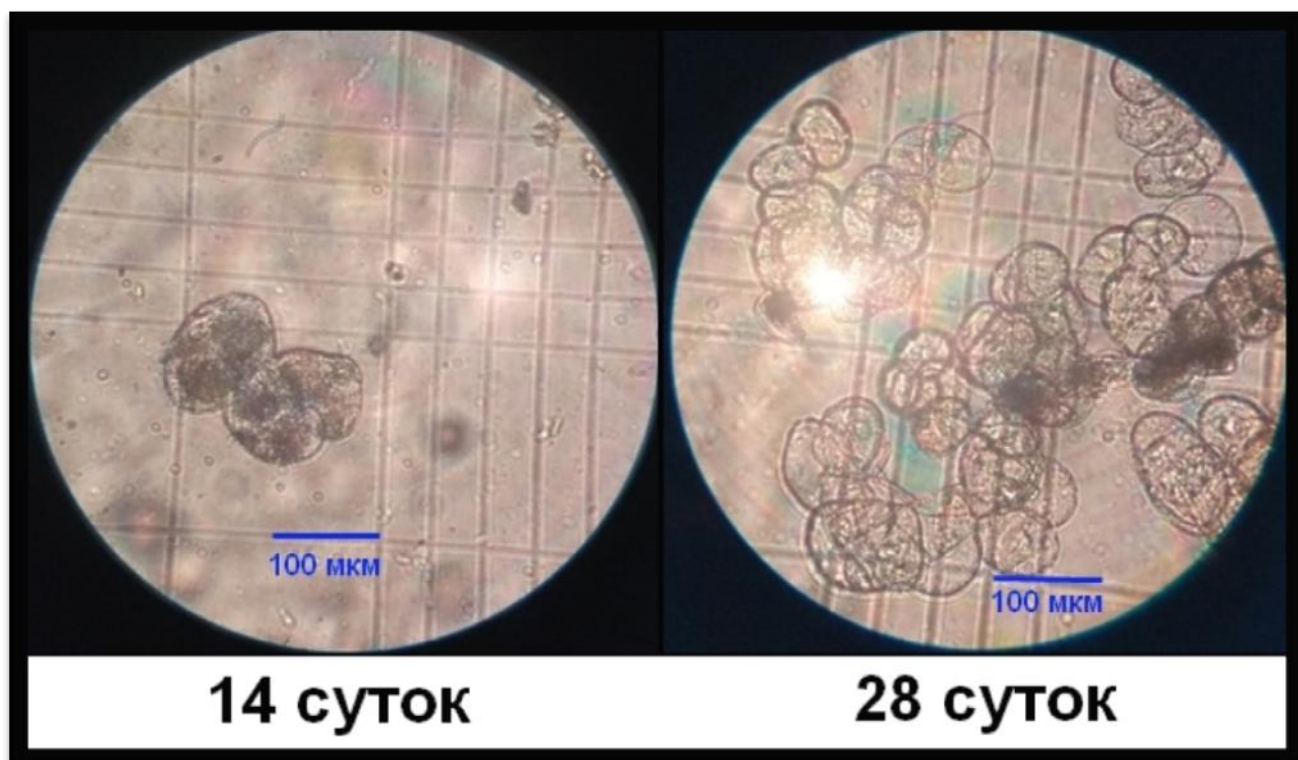


Рисунок 3.5. – Клетки суспензионной культуры, полученной из корня

*P. peltatum* L.

Суспензионная клеточная культура, полученная из почки так же, как и культура, полученная из корня, - крупнодисперсная. Клетки разного размера, неравномерно распределены по объему суспензии. Основная масса клеток находится у дна колбы. Размер клеток клеточной культуры почки варьирует от  $75 \times 75$  мкм до  $75 \times 100$  мкм. По форме клетки овальные, удлиненные (рис. 3.6.).

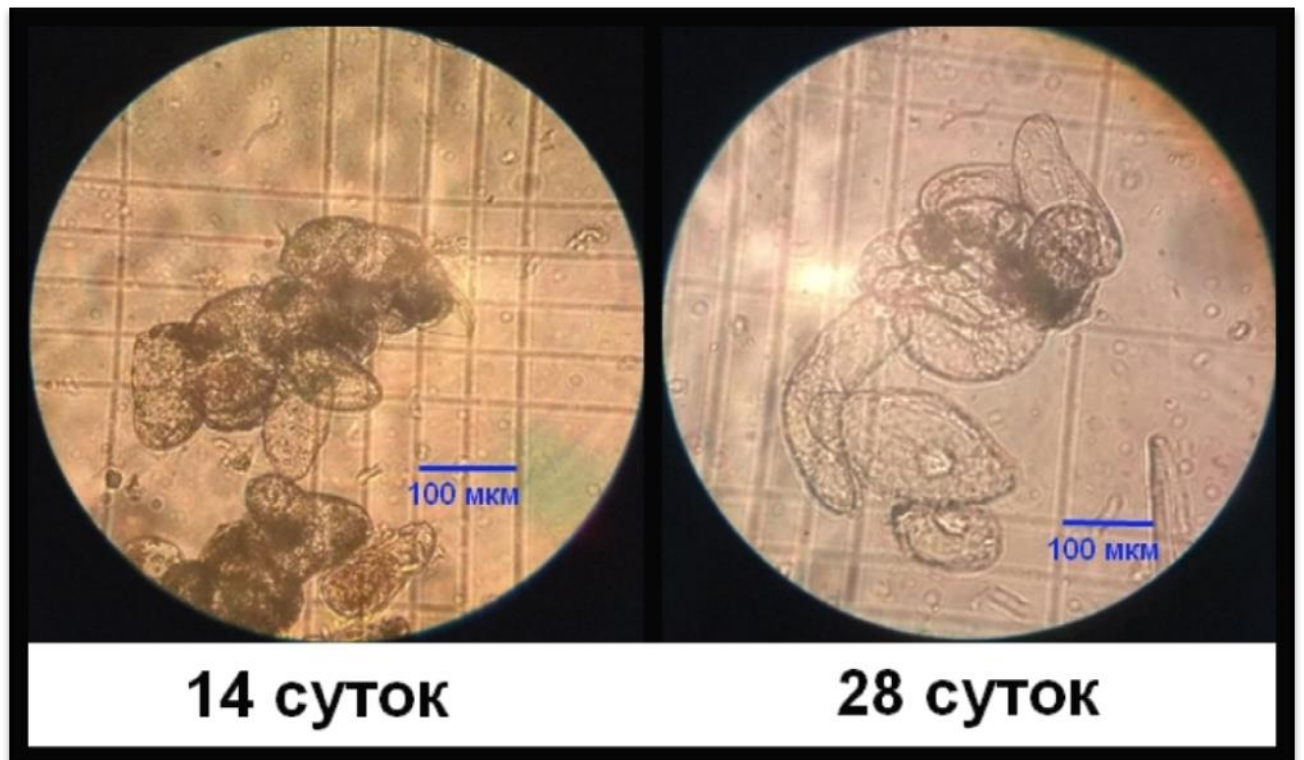


Рисунок 3.6. – Клетки суспензионной культуры, полученной из почки

*P. peltatum* L.

В отличие от суспензионных культур, полученных из корня и почки, суспензионная клеточная культура, полученная из плода, мелкодисперсная. Клетки примерно одного размера, равномерно распределены по объему суспензии. Размер клеток клеточной культуры плода составляет  $50 \times 50$  мкм. По форме клетки преимущественно округлые (рис. 3.7.).

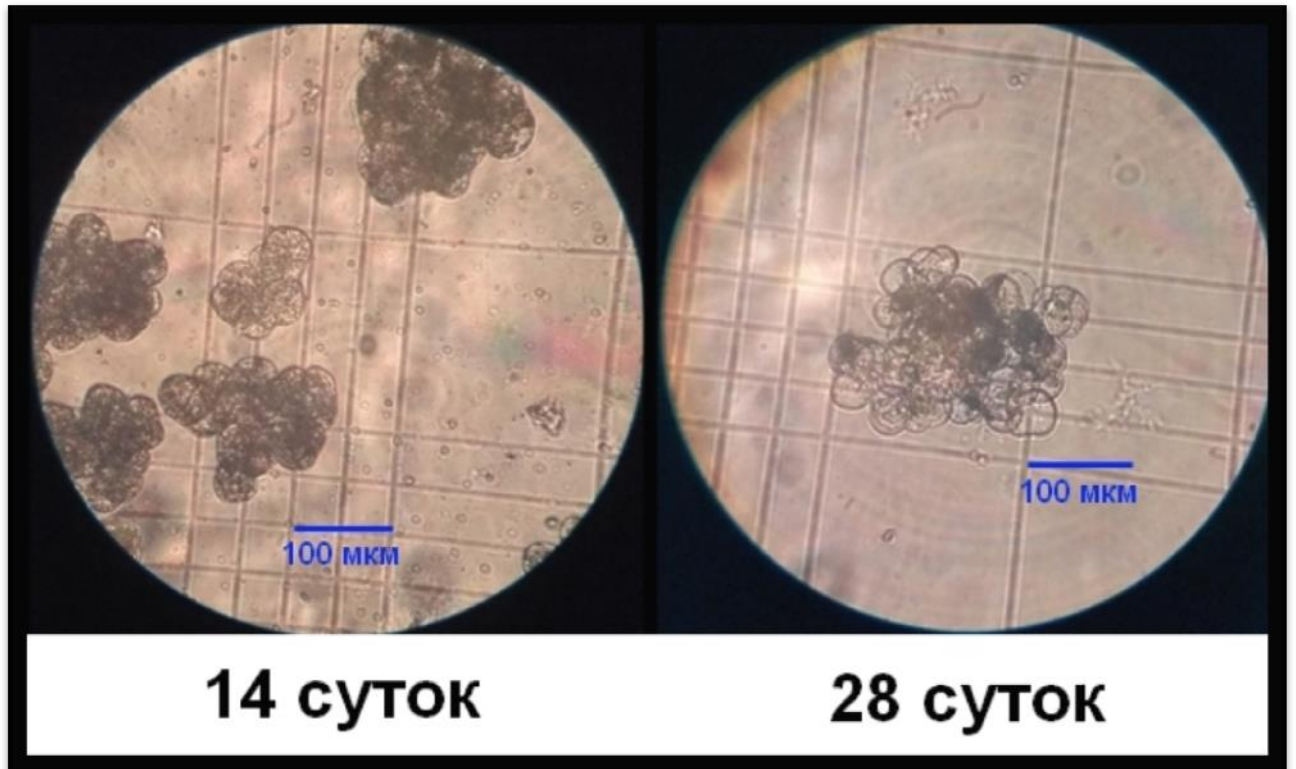


Рисунок 3.7. – Клетки суспензионной культуры, полученной из плода *P. peltatum* L.

Жизнеспособность клеток в 14-суточной клеточной культуре составляет 90-100 %. Жизнеспособность клеток в 28-суточной клеточной культуре составляет 70-80 %. На рис. 3.8. приведены окрашенные в синий цвет мертвые клетки и неокрашенные живые клетки.

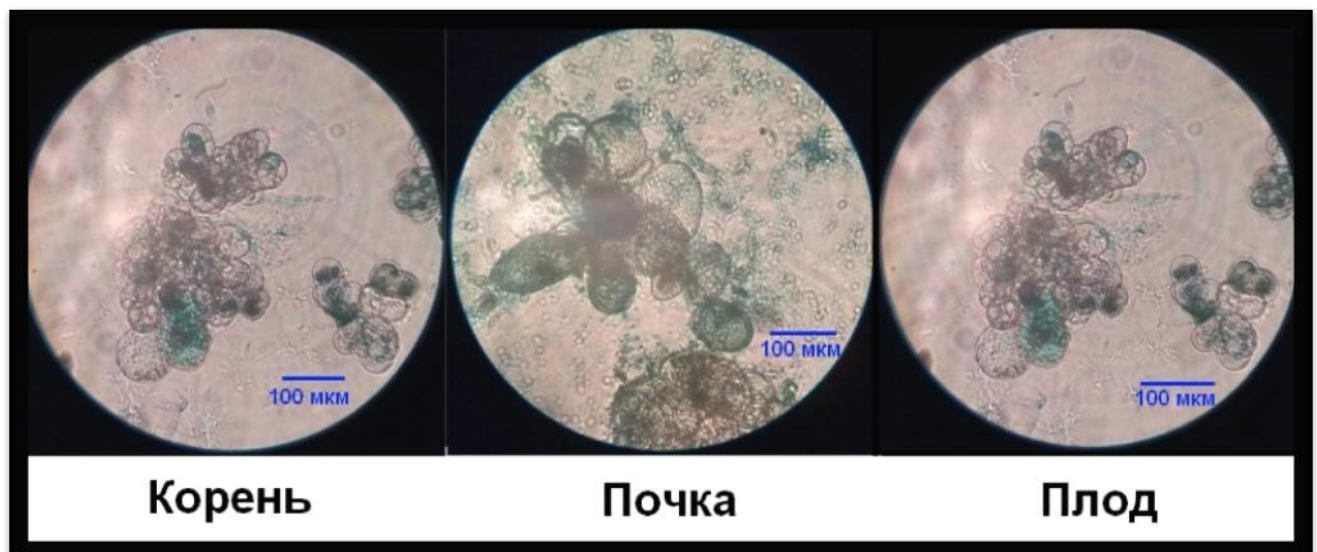


Рисунок 3.8. – Клетки 28-суточной клеточной культуры плода *P. peltatum* L., окрашенные метиленовым синим 0,1 %



### Основные выводы по Главе 3

На основе проведенного морфологического исследования клеточных культур обнаружено, что сходным строением обладают суспензионные культуры из корня и почки *P. peltatum* L.: клетки из корня - круглые и овальные, от 70×70 мкм до 100×100 мкм; клетки из почки - овальные, удлиненные, от 75×75 мкм до 75×100 мкм; и те, и другие неравномерно распределены по всему объему питательной среды, преимущественно располагаются у дна колбы. Суспензия клеточной культуры из плода равномерно распределена по всему объему питательной среды, состоит из клеток примерно одинакового размера (50×50 мкм) и формы (округлые).

Есть различия в цвете культур, полученных из разных органов, а также культур в два разных срока культивирования (14 и 28 суток): 14-суточные клеточные культуры из корня и почки ярко-желтого цвета, из плода - коричневатого-желтого цвета; 28-суточная клеточная культура из корня двух цветов - ярко-желтого или темно-коричневого, из почки - темно-коричневая, из плода - болотного цвета.

Определено, что жизнеспособность клеток 14-суточных клеточных культур составляет 90-100 %, 28-суточных клеточных культур – 70-80 %.

По ростовым характеристикам культуры, полученные из почки и плода оказываются сходными. Биомасса суспензионной культуры, полученной из плода, увеличивается в сутки на 25 %, из почки – на 23 %, из корня – на 13 %. Биомассы культур, полученных из плода и почки, удваиваются в массе за 3 суток, а культура, полученная из корня, – за 5 суток. Логарифмическая кривая роста биомассы тоже показывает значимые ( $p < 0,05$  или  $p < 0,01$ ) различия данных по суспензионным клеточным культурам, полученным из корня, с данными по суспензионным клеточным культурам, полученным из почки и плода. Кривые прироста биомассы клеточных культур из плода и почки оказываются сходными (при уровне значимости  $p < 0,05$  или  $p < 0,01$ ).

## ГЛАВА 4. Цитотоксическая активность экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L.

### 4.1. Получение и культивирование клеточных культур *HeLa*, K562 и фибробластов

Получение фибробластов:

1. выделение тканей новорожденных крыс;
2. помещение их на питательную среду DMEM, содержащую 10 % фетальной сыворотки телят, гентамицин (защита культуры от бактериальной инфекции), амфотерицин В (защита культуры от грибковой инфекции);
3. инкубация при температуре 37 °С в среде, содержащей 5 % CO<sub>2</sub> в течение недели до получения монослоя на адгезивной поверхности культурального флакона;
4. пассирование клеточной культуры – пересадка на свежую питательную среду того же состава – 1 раз в неделю.

Возможно 4-6 пассажей; оптимальная плотность 1.0x10<sup>5</sup> клеток/мл.

Клеточная линия *HeLa* – линия иммортализованных клеток рака шейки матки человека, полученная 8 февраля 1951 года. Образует монослой.

Культивирование клеток клеточной линии *HeLa*:

1. инкубация в культуральных флаконах с адгезивным покрытием, горизонтально – на широкой поверхности флакона (чтобы увеличить поверхность, занимаемую монослоем) при температуре 37 °С в среде, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>;
2. пассирование клеточной культуры – трипсинизация клеток для их отделения от адгезивной поверхности и перевода клеточной культуры в суспензионную форму;
3. пересадка на свежую питательную среду DMEM, содержащей 10 % фетальной сыворотки телят (источник аминокислот), гентамицин (защита культуры от бактериальной инфекции), амфотерицин В (защита культуры от грибковой инфекции) – 1 раз в неделю.

Возможно неограниченное количество пассажей. Оптимальная плотность клеточной линии клеток *HeLa* составляет  $1.0 \times 10^5$  клеток/мл.

Клеточная линия K562 – клетки хронической миелогенной лейкемии человека. Образует суспензию.

Культивирование клеток клеточной линии K562:

1. инкубация в культуральных флаконах вертикально при температуре 37 °С в среде, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>;
2. пассирование клеточной культуры – пересадка на свежую питательную среду RPMI, содержащей 20 % фетальной сыворотки телят (источник аминокислот), гентамицин (защита культуры от бактериальной инфекции), амфотерицин В (защита культуры от грибковой инфекции) – 1 раз в неделю.

Возможно неограниченное количество пассажей. Оптимальная плотность клеток клеточной линии K562 составляет  $1.0 \times 10^5$  клеток/мл.

Криоконсервация клеточных культур:

1. центрифугирование клеточной суспензии для разделения клеток и культуральной жидкости;
2. удаление культуральной жидкости;
3. вливание до 500 мкл фетальной сыворотки телят в культуральный флакон;
4. помещение полученной суспензии клеток в криопробирку на 1,8-2 мл.

Оптимальная плотность клеток в криопробирке при криоконсервации клеточных культур составляет  $3.0-7.0 \times 10^6$  клеток/мл.

## 4.2. Получение экстрактов органов растения и клеточных культур

### *P. peltatum* L.

При проведении исследования по оптимизации условий экстракции были апробированы десять вариантов экстрагентов:

1. калий-фосфатный буферный раствор (рН=7.0) [28];
2. калий-фосфатный буферный раствор (рН=7.0) с последующей экстракцией этилацетатом [28];
3. метиловый спирт 100 % [24];
4. метиловый спирт 80 % [187];
5. метиловый спирт 80 % с последующей экстракцией дихлорметаном [187];
6. этиловый спирт 96 % [11];
7. этиловый спирт 50 % [18];
8. этилацетат [187];
9. хлороформ [28];
10. ацетон 80 % [81].

На рис. 4.1. и 4.2. приведены данные по выходу сухого экстракта, полученного разными способами экстрагирования. Наибольший выход сухого экстракта был получен при использовании в качестве экстрагента калий-фосфатного буферного раствора – 30-39 %.



Рисунок 4.1. – Выход сухого экстракта при экстракции 28-суточных суспензионных культур *P. peltatum* L. разными экстрагентами\*

\*КФБР – калий-фосфатный буферный раствор, С.к.к. – суспензионная клеточная культура.

Параллельно с определением выхода сухих экстрактов в исследовании определялась их цитотоксическая активность. Результаты оценки цитотоксической активности приведены в разделе 4.3.

Было обнаружено, что наибольшей цитотоксической активностью при средних значениях выхода сухого экстракта обладают экстракты, полученные при использовании в качестве экстрагента ацетона 80 %. Поэтому этот экстрагент был выбран в качестве основного для проведения дальнейших исследований. В том числе, и для исследования экстрактов органов растения, каллусных культур и культуральной жидкости суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L.

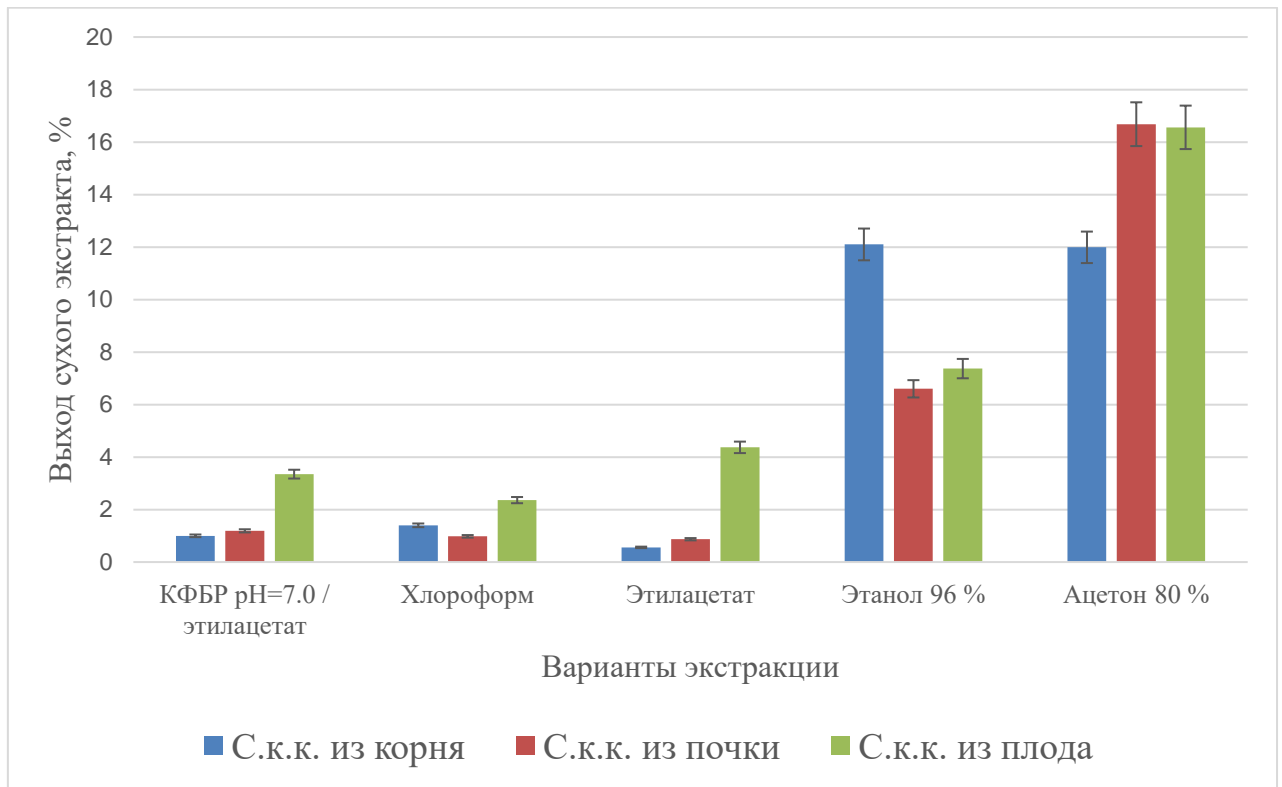


Рисунок 4.2. - Выход сухого экстракта при экстракции 14-суточных суспензионных культур *P. peltatum* L. разными экстрагентами\*

\*КФБР – калий-фосфатный буферный раствор, С.к.к. – суспензионная клеточная культура.

На рис. 4.3. приведены данные по выходу сухого ацетонового экстракта листьев, корневищ с корнями и каллусных клеточных культур, полученных из корня, плода и почки растения *P. peltatum* L. Наибольший выход сухого ацетонового экстракта получили для каллусных клеточных культур (64-89 %). Выход сухого ацетонового экстракта из листьев и корневищ с корнями составил 43 и 44 % соответственно.



Рисунок 4.3. - Выход сухого экстракта при экстракции ацетоном 80 % каллусных культур и органов растения *P. peltatum* L.\*

\*К.к.к. – каллусная клеточная культура

На рис. 4.4. приведены данные по выходу сухого ацетонового экстракта из культуральной жидкости суспензионных клеточных культур. Для 28-суточных культур он составил 5-6 %, для 14-суточных – 7-10 %.

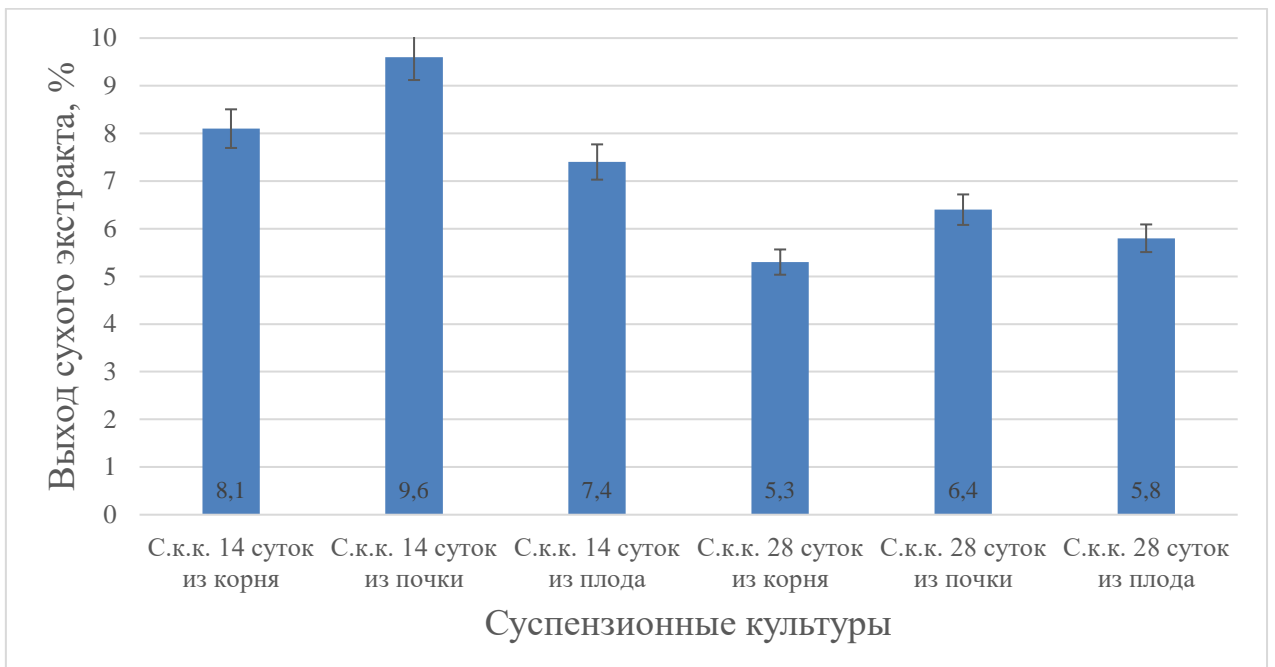


Рисунок 4.4. - Выход сухого экстракта при экстракции ацетоном 80 % культуральной жидкости суспензионных культур *P. peltatum* L.\*

\*С.к.к. – суспензионная клеточная культура

На основании первичного исследования экстрактов суспензионных клеточных культур и соотнесения этих результатов с данными по цитотоксической активности экстрактов в качестве основного экстрагента для проведения дальнейших исследований был выбран ацетон 80 %. После этого были дополнительно получены результаты по выходу сухого экстракта из органов растения, каллусных культур и культуральной жидкости из суспензионных клеточных культур. Сравнительные результаты исследования при использовании в качестве экстрагента ацетона 80 % приведены на рис. 4.5.

На рис. 4.5. показано, что при экстрагировании почти всех объектов, кроме органов растения, больший выход дают объекты, связанные с листом/почкой. А для органов растений выход примерно одинаков. Он составил 43 %.

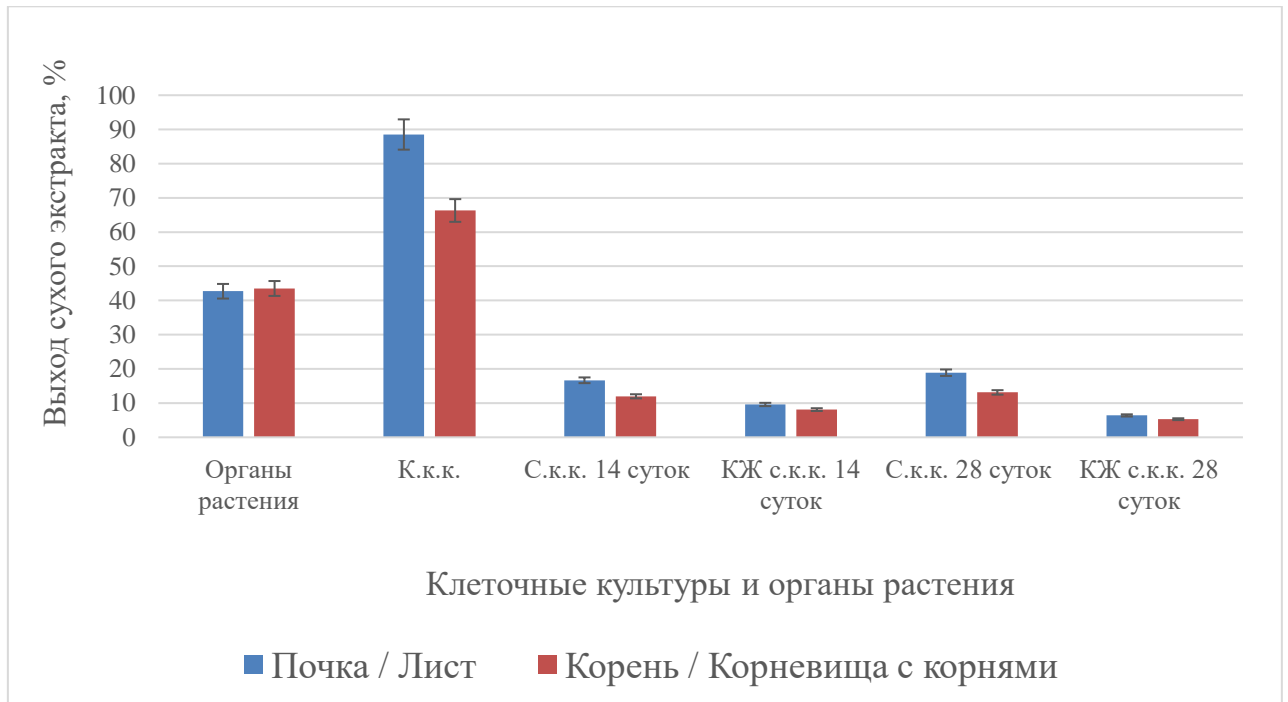


Рисунок 4.5. - Выход сухого экстракта при экстракции ацетоном 80 % клеточных культур, культуральной жидкости и органов растения *P. peltatum* L.\*  
\*КЖ – культуральная жидкость, К.к.к. – каллусная клеточная культура, С.к.к. – суспензионная клеточная культура.



### 4.3. Цитотоксическая активность экстрактов органов растений и клеточных культур *P. peltatum* L.

Первая часть эксперимента по определению цитотоксической активности экстрактов состояла в выборе методики, способной наиболее адекватно измерить жизнеспособность клеток.

Рассматривали две методики: МТТ- и резазурин-тест [1, 49].

При каждом испытании получали две группы данных: визуальные – пониженная жизнеспособность, гибель клеток, признаки которых (поврежденная клеточная оболочка, измененная форма, цвет клеток) видны в инвертированный микроскоп; инструментальные - оптическая плотность окрашенного раствора, отражающая жизнеспособность опухолевых клеток.

При проведении МТТ-теста эти две группы данных сильно отличались: по визуальным данным обнаруживали пониженную жизнеспособность, при этом в соответствии с данными по оптической плотности мы могли бы предположить гиперстимуляцию роста клеток.

Подобные результаты при измерении цитотоксической активности растительных экстрактов были получены и другими исследователями [79, 92, 96, 97, 137, 170]. В частности, метанольные экстракты *Hypericum adenotrichum*, *Salvia kronenburgii* и *Pelargonium quercetorum* были протестированы на клеточных линиях рака молочной железы *MCF-7* и *MDA-MB-231* с использованием МТТ-теста. Результаты МТТ-теста были сопоставлены с результатами АТФ-теста [144], а также с данными фазово-контрастной микроскопии и флуоресцентного окрашивания [97]. Жизнеспособность клеток при МТТ-тесте оказалась значительно выше по сравнению с результатами АТФ-теста. Даже в случае полной гибели опухолевых клеток МТТ-тест давал ложное повышение жизнеспособности. Оценка жизнеспособности на основе морфологии с помощью фазово-контрастной микроскопии и окрашивания соответствовала результатам анализа АТФ [97]. Краситель МТТ может взаимодействовать с некоторыми химическими соединениями растения [79, 92, 170]. Помимо этого, соединения, содержащиеся в растении, могут влиять на

митохондриальную дегидрогеназу опухолевых клеток [96]. И то, и другое приводит к ложным завышенным значениям оптической плотности, не отражающим реальную жизнеспособность опухолевых клеток.

Следовательно, МТТ-тест может не подходить для анализа некоторых растительных экстрактов, содержащих подобные соединения. В том числе и для экстрактов клеточных культур и органов растения *P. peltatum* L., как показал наш эксперимент.

При оценке жизнеспособности опухолевых клеток использовали следующий критерий: 75 % живых клеток по сравнению с отрицательным контролем (опухолевые клетки с экстрагентом вместо экстракта, которые были приняты за 100 %) - это пороговое значение, при котором можно говорить о цитотоксической активности экстракта; 50 % и менее живых клеток по сравнению с отрицательным контролем считали выраженной цитотоксической активностью.

По данным резазурин-теста обнаружили цитотоксическую активность у экстрактов, полученных на основе этилацетата, хлороформа и ацетона 80 %. Наиболее стабильные значения выявили при использовании ацетона 80 %. Поэтому дальнейшее исследование, направленное на определение цитотоксической активности экстрактов из частей растения и каллусных культур, проводили с использованием ацетона 80 % в качестве экстрагента.

На рис. 4.6. приведены результаты измерения жизнеспособности опухолевых клеток при инкубации с экстрактами в течение 72 часов. Для периода в 48 часов инкубации не было получено значимых отличий оптической плотности растворов экспериментальных лунок с экстрактами каллусной культуры и органов растения от лунок с отрицательным контролем – цитотоксическая активность не была обнаружена.

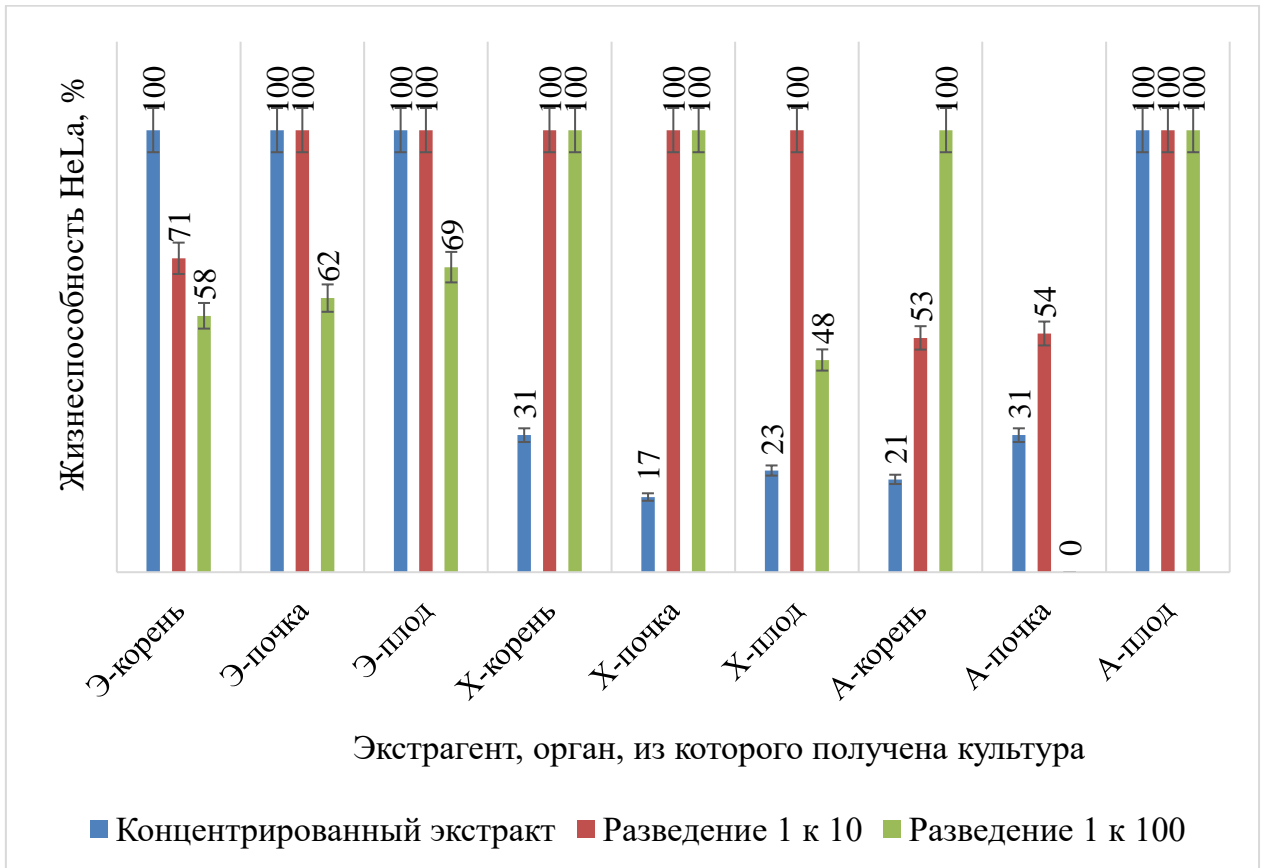


Рисунок 4.6. - Жизнеспособность клеток *HeLa* при инкубации с экстрактами 14-суточных суспензионных культур в течение 48 часов\*

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

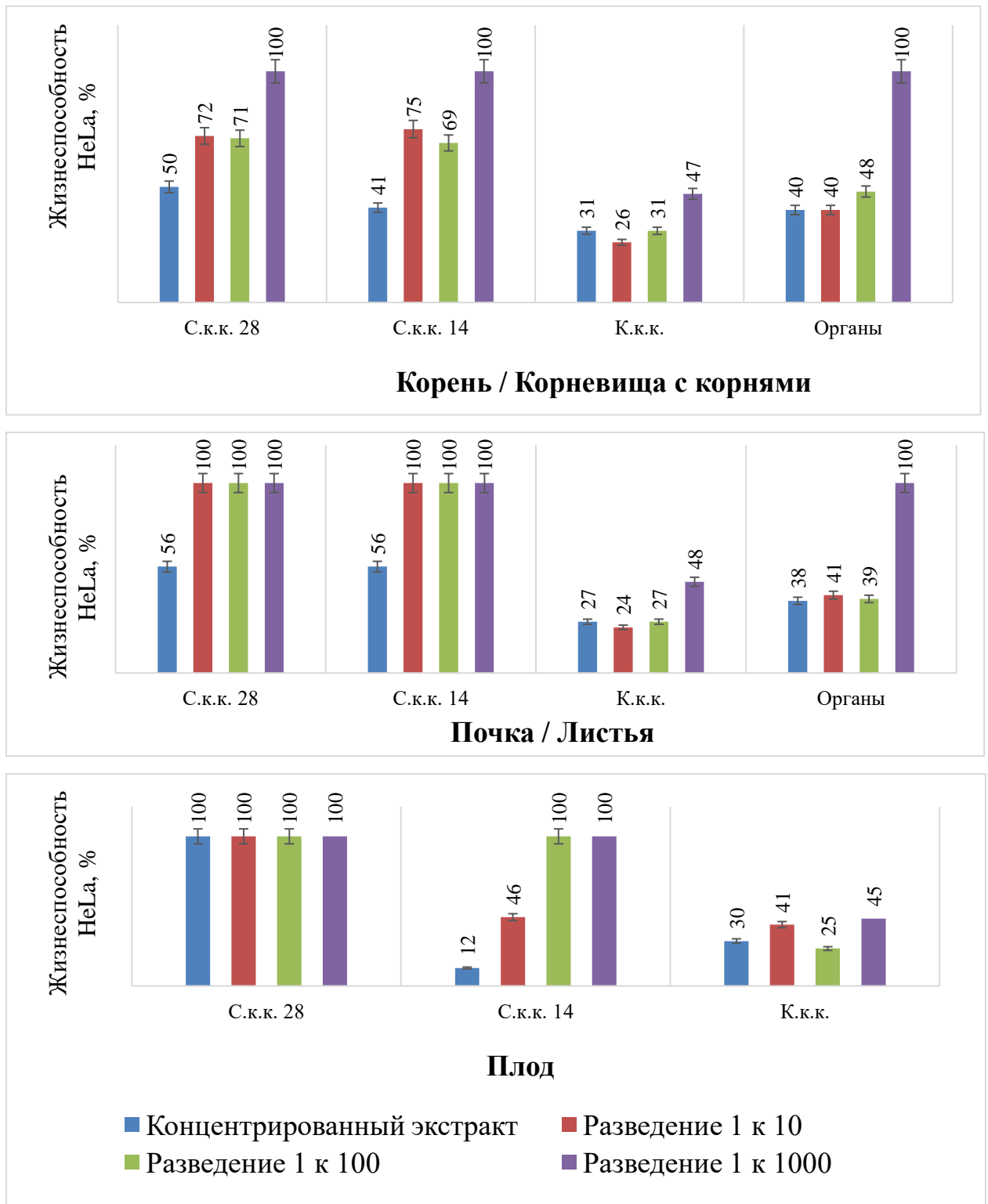


Рисунок 4.7. - Нормализованные по отрицательному контролю значения жизнеспособности клеток *HeLa* при инкубации в течение 72 часов с ацетоновыми экстрактами органов и клеточных культур *P. peltatum* L.\*

\*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.

Данные по цитотоксической активности ацетоновых экстрактов органов и клеточных культур *P. peltatum* L. сопоставимы с данным по цитотоксической активности подофиллотоксина (рис. 4.8.).

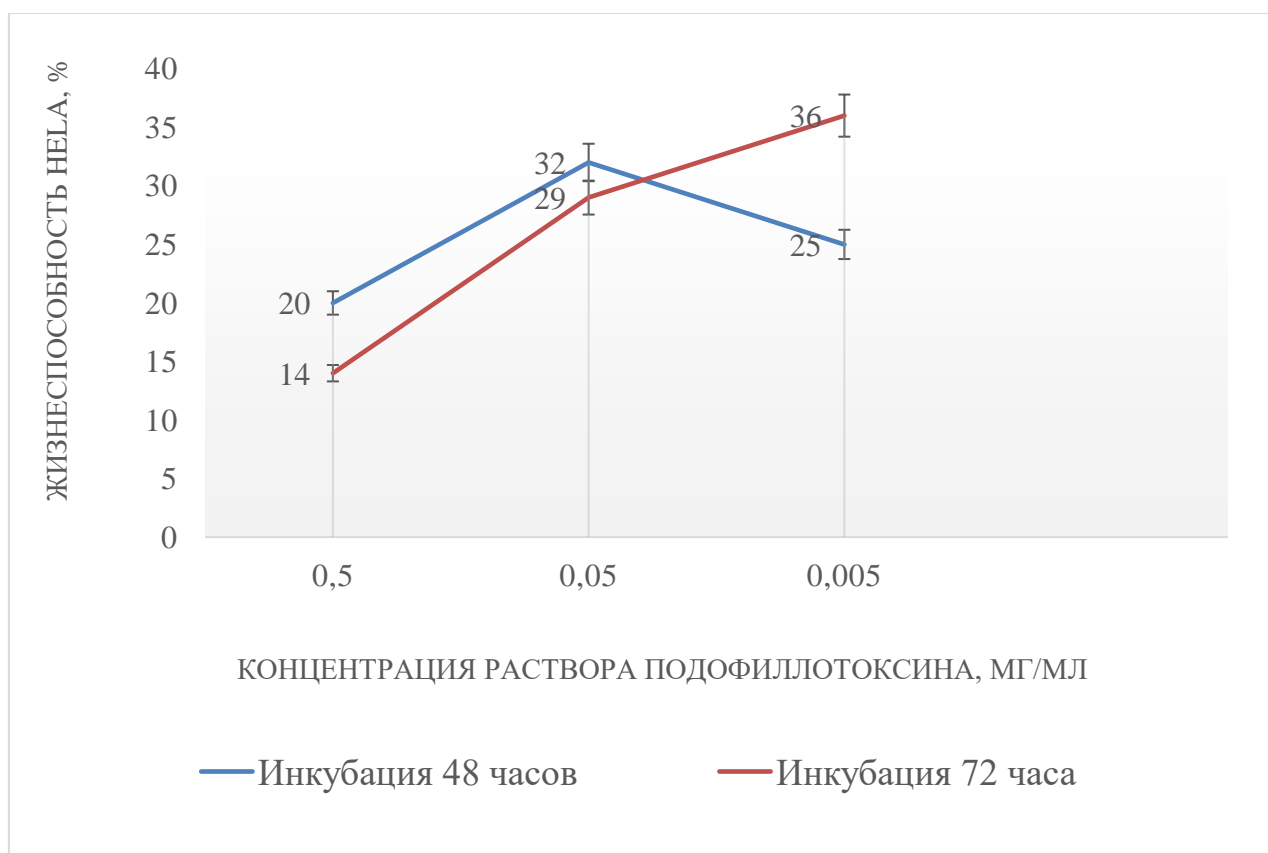


Рисунок 4.8. – Нормализованная жизнеспособность клеток *HeLa* при инкубации с раствором подофиллотоксина\*

\*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 мы можем предположить, что цитотоксически активные фенольные соединения находятся, прежде всего, внутри растительных клеток и не выделяются в достаточном для получения цитотоксического эффекта количестве во внеклеточную жидкость.

Так как ацетоновые экстракты содержат гидрофильные и липофильные соединения, мы провели дополнительное исследование – растворили сухой ацетоновый экстракт не только в воде, но и в растворах этилового спирта 50 и 70 %.

Этиловый спирт оказывает цитотоксический эффект. Поэтому, во избежание влияния спирта на рост клеток, для проведения резаурин-теста приготовили разбавленные в пять раз растворы сухих экстрактов. Из них готовили три последовательных разведения. В результате получили четыре разведения: 1:5, 1:50, 1:500 и 1:5000. Измеряли цитотоксическую активность через 48 и 72 часа инкубирования. Выраженное понижение жизнеспособности клеток *HeLa* было обнаружено при инкубации с ацетоновыми экстрактами 28-суточной суспензионной культуры из корня в течение 72 часов:  $56 \pm 1$  % для этилового спирта 50 % и  $41 \pm 3$  % для этилового спирта 70 %. Все нормализованные данные по цитотоксической активности этих растворов приведены в Приложении 4.

Водные экстракты суспензионных клеточных культур не показали цитотоксической активности при указанных разведениях. Исключение составили два экстракта – 14-суточные суспензионные культуры из почки и из плода в максимальной концентрации (разведение 1:5) при 72 часах инкубации с опухолевыми клетками.

Нормализованная жизнеспособность опухолевых клеток *HeLa* составила  $53 \pm 8$  и  $55 \pm 11$  % соответственно (при уровне значимости  $p \leq 0.05$ ). Экстракты из органов растений показали значимую цитотоксическую активность (при уровне значимости  $p \leq 0.05$ ) при инкубации в течение 72 часов (рис. 4.9.).

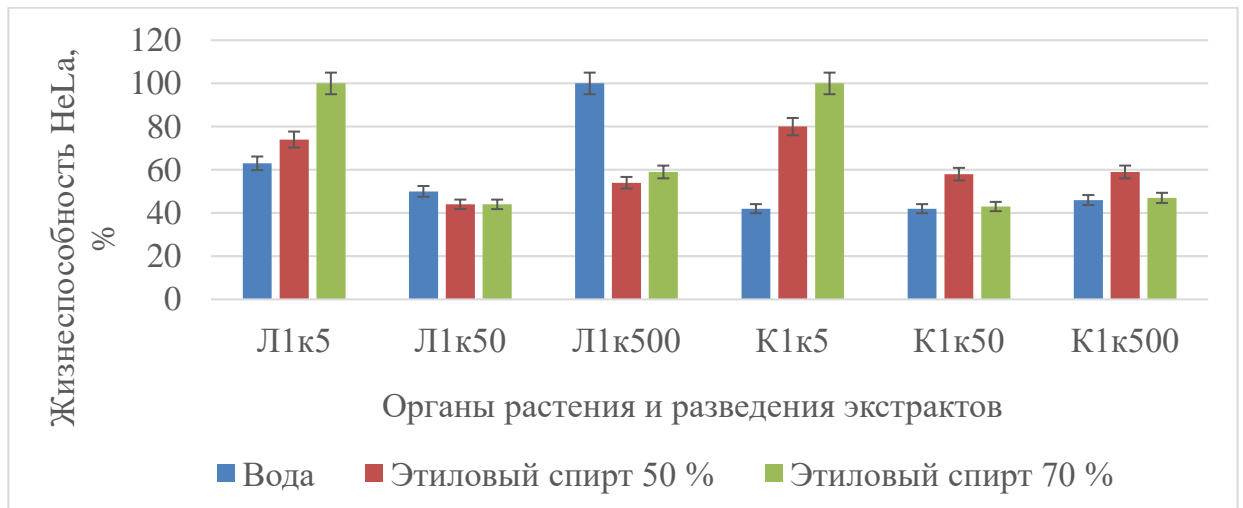


Рисунок 4.9. - Нормализованные значения жизнеспособности клеток *HeLa* при инкубации в течении 72 часов с ацетоновыми экстрактами органов

*P. peltatum* L.\*

\*Л1к5 – экстракт из листьев, разведение 1:5, Л1к50 – экстракт из листьев, разведение 1:50, Л1к500 – экстракт из листьев, разведение 1:500, К1к5 – экстракт из корневищ с корнями, разведение 1:5, К1к50 – экстракт из корневищ с корнями, разведение 1:50, К1к500 – экстракт из корневищ с корнями, разведение 1:500.

В дальнейшем была исследована цитотоксическая активность ацетоновых экстрактов органов растения и клеточных культур *P. peltatum* L. в отношении лейкемических клеток и фибробластов.

При определении цитотоксической активности экстрактов в отношении линии *K562* значимыми (уровень значимости  $p \leq 0.05$  или  $p \leq 0.01$ ) оказались отличия от отрицательного контроля только у экстрактов из листьев и корневищ с корнями (рис. 4.10.).

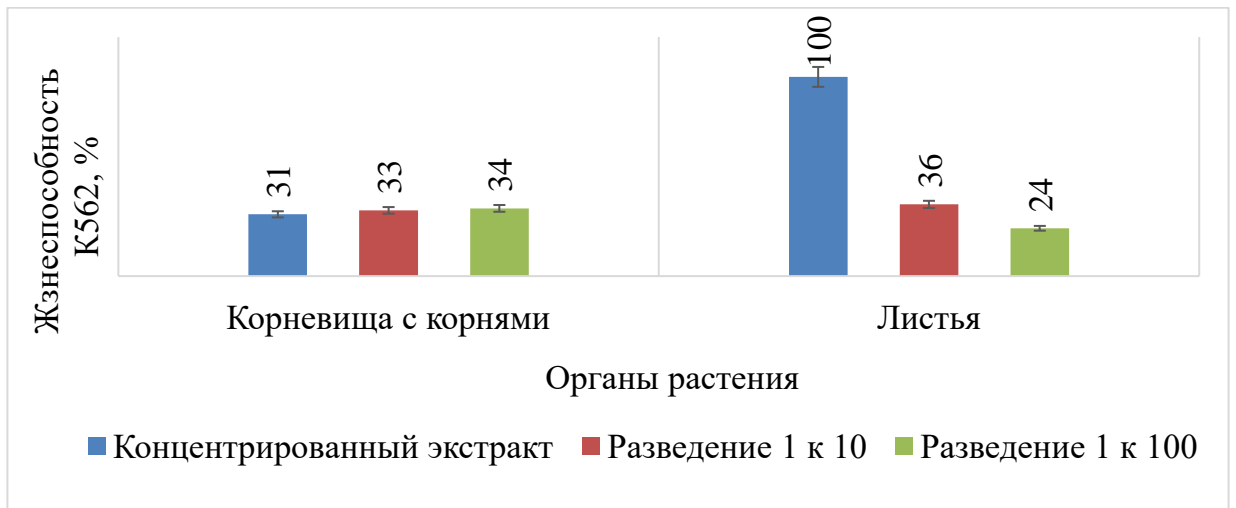


Рисунок 4.10. - Жизнеспособность клеток *K562* при инкубации с ацетоновыми экстрактами органов *P. peltatum* L. в течение 72 часов\*

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

На фибробластах выраженную цитотоксическую активность (уровень значимости отличия от отрицательного контроля  $p \leq 0.05$  или  $p \leq 0.01$ ) обнаружили у экстрактов из листьев (в первых трех разведениях) и корневищ с корнями (во всех четырех разведениях), у экстрактов из каллусных клеточных культур (только при первом разведении) (рис. 4.11.), у экстракта 14-суточной суспензионной клеточной культуры, полученной из корня растения (только при первом разведении). Не обнаружили значимую цитотоксическую активность у экстракта 28-суточной суспензионной клеточной культуры, полученной из корня растения.



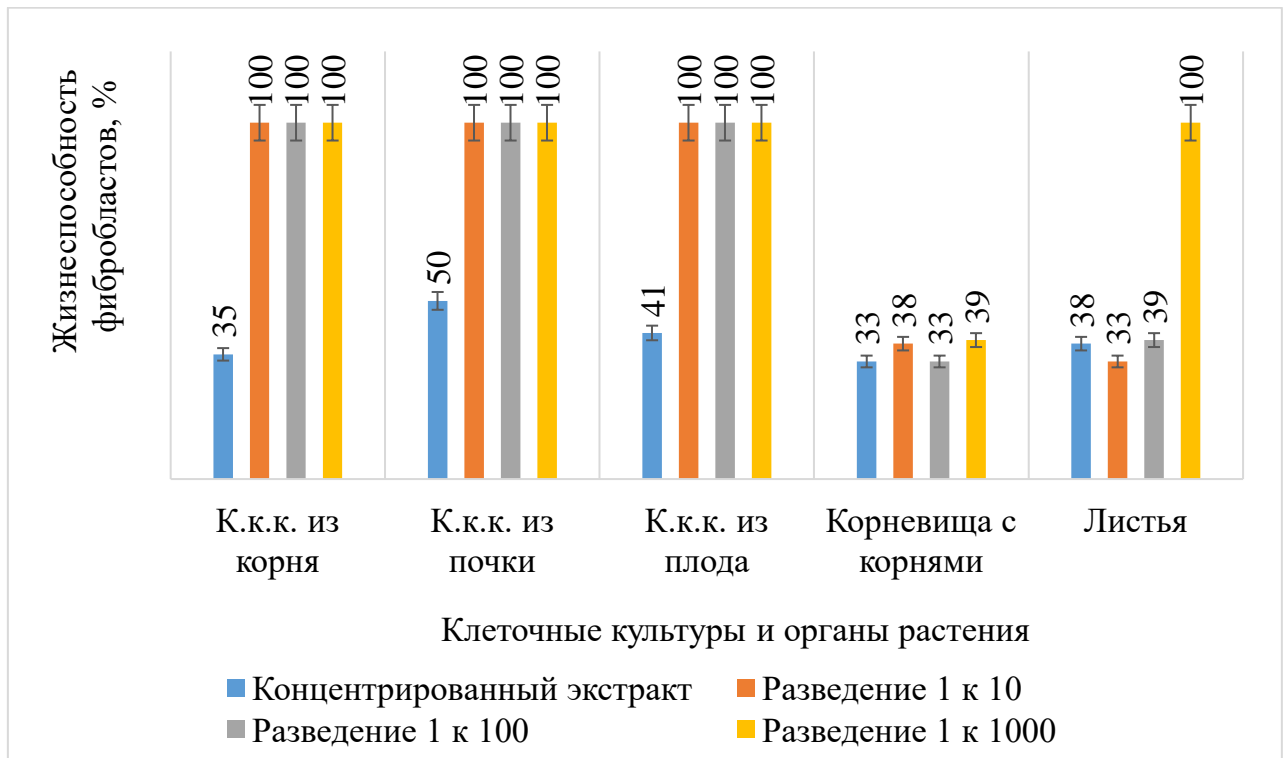


Рисунок 4.11. - Жизнеспособность фибробластов при инкубации с ацетоновыми экстрактами органов и каллусных культур *P. peltatum* L. в течение 72 часов\*

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

Все экстракты показали выраженное цитотоксическое действие в отношении клеток *HeLa*. Экстракты из органов растения и каллусной культуры дали относительно высокую значимую (на уровне значимости  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$ ) цитотоксичность – 24-48 % жизнеспособных клеток рака шейки матки после инкубации с экстрактами в течение 72 часов. Экстракты из суспензионных культур показали меньшую цитотоксическую активность – 41-75 % жизнеспособных клеток.

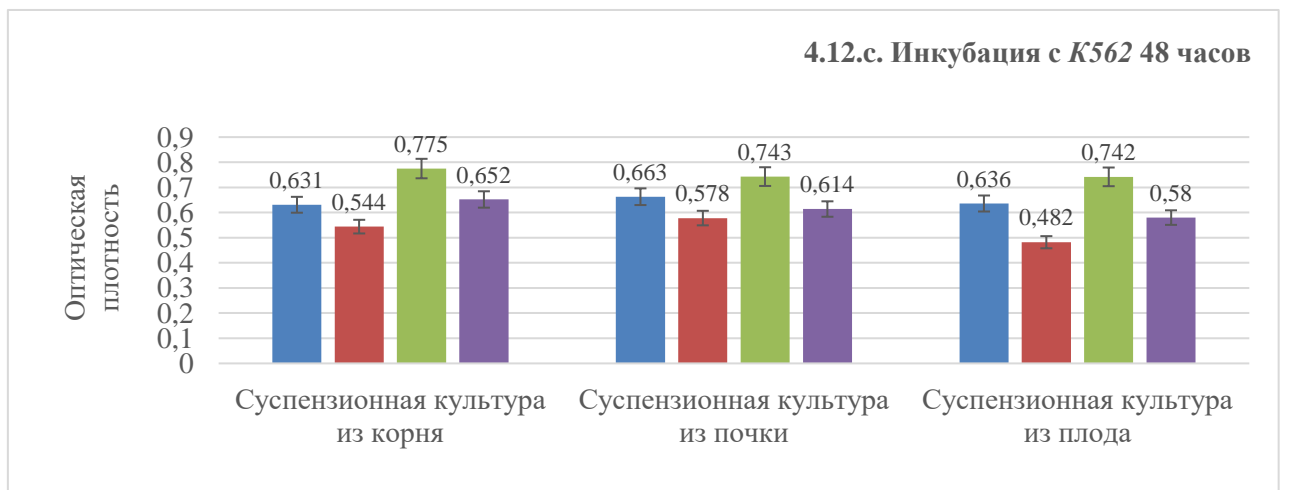
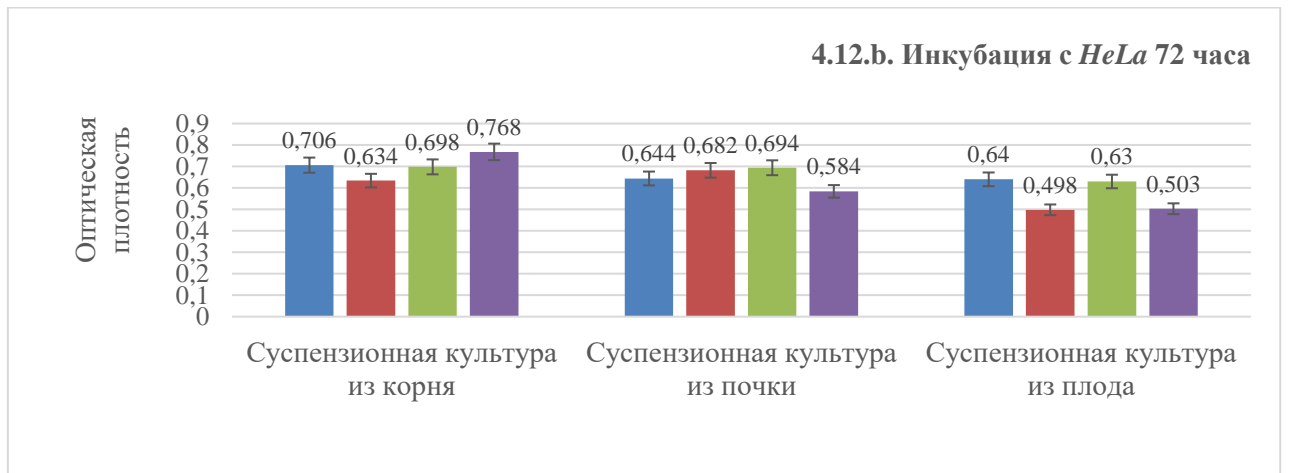
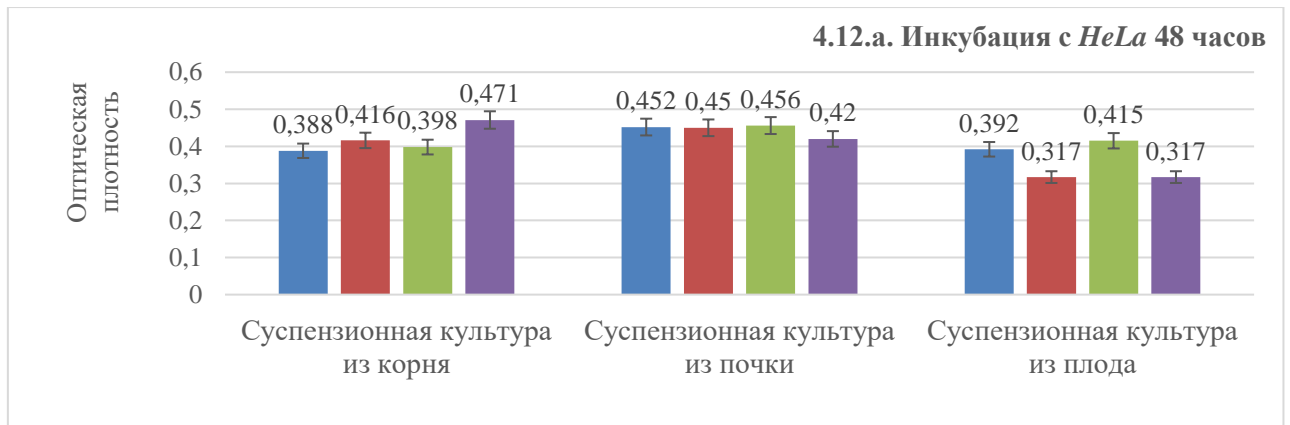
Была проведена лиофильная сушка образцов 14- и 28-суточных суспензионных клеточных культур, полученных из корня, почки и плода. Не была выявлена цитотоксическая активность. Что может означать, что при сушке при обычном давлении и температуре 26 °C происходят какие-то трансформационные химические процессы в сырье, приводящие к образованию цитотоксически активных соединений. При лиофильной сушке таких процессов не происходит и цитотоксически активные соединения не образуются.

Проведено сравнение оптической плотности при окрашивании резазурином растворов, включающих суспензию опухолевых клеток в питательной среде и экстрактами суспензионных культур, с растворами, включающими питательную среду (без опухолевых клеток) и экстракт.

Объемы суспензии опухолевых клеток и питательной среды были одинаковы и составляли 180 мкл.

Объемы экстрактов также были одинаковы и составляли 20 мкл.

Результаты исследования приведены на рис. 4.12.



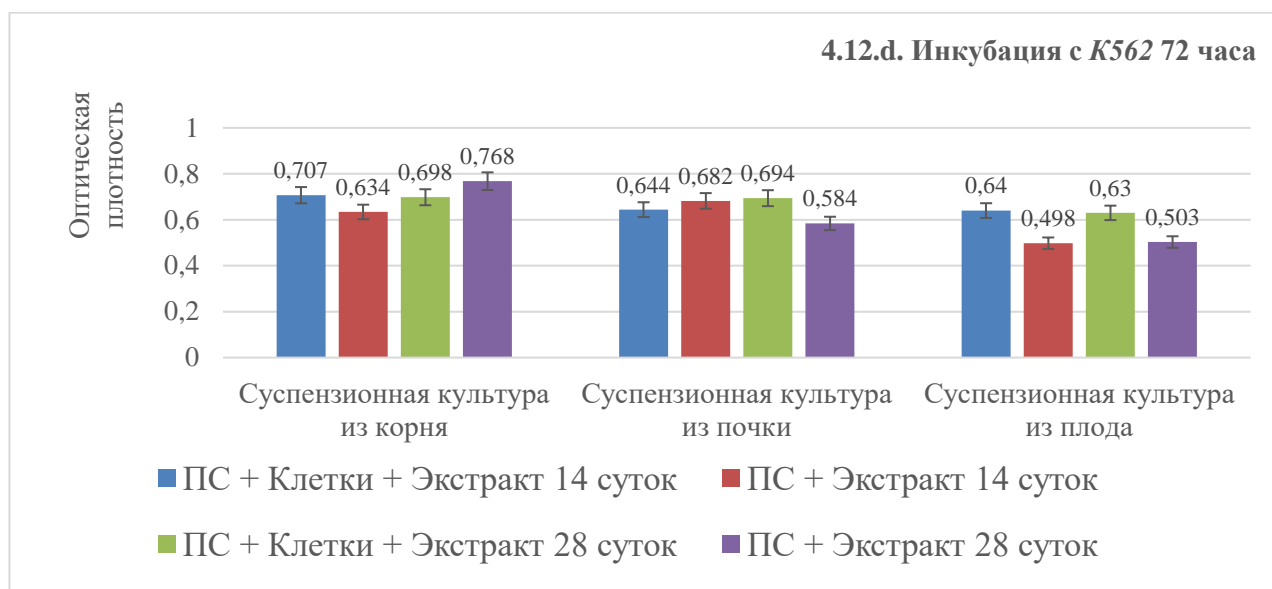


Рисунок 4.12. – Оптическая плотность растворов при инкубации в течение 48 часов клеток *HeLa* с ацетоновыми экстрактами суспензионных культур *P. peltatum* L.\*

\*ПС – питательная среда

Закономерности в отличии оптической плотности растворов, включающих три компонента (питательная среда, клетки и экстракт) от оптической плотности растворов, включающих два компонента (питательная среда и экстракт) обнаружены только в случае с инкубацией клеточной линии K562 с растворами в течение 48 часов (рис. 4.12.с.)– оптическая плотность двухкомпонентных растворов была ниже, чем оптическая плотность трехкомпонентных растворов. Можем предположить, что величина оптической плотности, составляющая разницу между двумя этими величинами, отражает вклад опухолевых клеток.

Также была определена цитотоксическая активность липофильной фракции фенольных соединений, которая оставалась после растворения высушенного ацетонового экстракта 5, 10, 15, 20, 25 и 30-суточных суспензионных клеточных культур из корня растения.

Было обнаружено, что цитотоксической активностью обладают культуры при всех сроках культивирования при разведении 1:100 (рис. 4.13.).

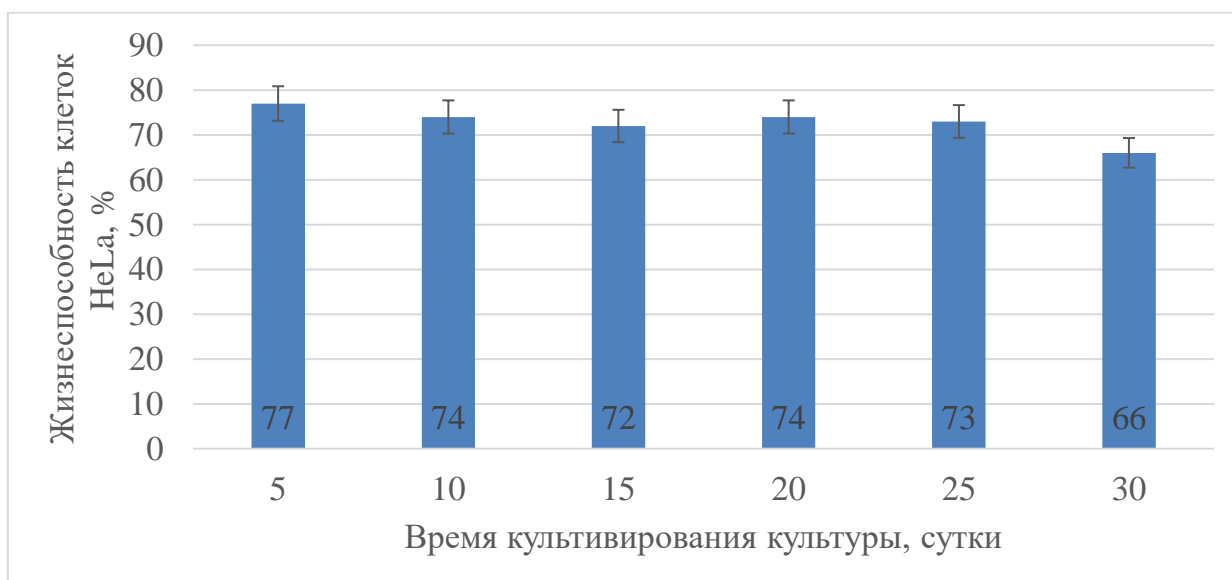


Таблица 4.13. - Жизнеспособность опухолевых клеток *HeLa* при инкубации с липофильной фракцией экстрактов суспензионных культур из корня *P. peltatum* L., полученных в разные сроки культивирования

## Основные выводы по Главе 4

Получены фибробласты, оптимизированы условия культивирования клеточных линий *HeLa* и *K562* для проведения экспериментов по изучению цитотоксической активности экстрактов.

На основе сравнения данных, полученных методом микроскопии, и результатов оптической плотности растворов, оцененных методом спектрофотометрии, для определения цитотоксической активности экстрактов из двух методов оценки жизнеспособности клеток (МТТ- и резазурин-тесты) был выбран резазурин-тест как метод, в котором эти две группы данных оказываются сходными.

Резазурин-тест показал, что наибольшей цитотоксической активностью при средних значениях выхода сухого экстракта обладают экстракты, полученные при использовании в качестве экстрагента ацетона 80 %.

Наиболее стабильная цитотоксическая активность (на уровне значимости отличий от отрицательного контроля, при котором опухолевые клетки и фибробласты инкубируются с дистиллированной водой вместо экстрактов, -  $p \leq 0.05$  или  $p \leq 0.01$ ) почти при всех изучаемых разведениях экстракта была получена для клеточной линии *HeLa* - жизнеспособность клеток составила 12-77 % для концентрированного экстракта.

На фибробластах выраженную цитотоксическую активность ( $p \leq 0.05$  или  $p \leq 0.01$ ) обнаружили у экстрактов из листьев в первых трех разведениях (33-39 %) и корневищ с корнями во всех четырех разведениях (33-39 %), у экстрактов из каллусных клеточных культур - только при первом разведении (35-50 %).

При определении цитотоксической активности экстрактов в отношении линии *K562* значимыми ( $p \leq 0.05$  или  $p \leq 0.01$ ) оказались отличия от отрицательного контроля только у экстрактов из листьев при разведении 1:10 (36 %) и 1:100 (24 %), и корневищ с корнями при первых трех разведениях (31-34 %).

## ГЛАВА 5. Физико-химический анализ экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L.

### 5.1. Анализ экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L. методом тонкослойной хроматографии

Полученные сухие экстракты проанализировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Проведенный ТСХ-скрининг растворов сухих экстрактов в 96 % этиловом спирте показал, что полученные образцы содержали большое количество веществ.

Во всех вариантах экстрактов в УФ свете при длине волны 254 нм были детектированы зоны адсорбции с  $R_f$  0,44-0,47, соответствующие по положению и окраске стандарту, выше уровня стандарта - зоны фиолетового цвета с  $R_f$  0,73-0,80, розового цвета с  $R_f$  0,83-0,87, ниже уровня стандарта – зоны голубого цвета с  $R_f$  0,27-0,30 (рис. 5.1.).

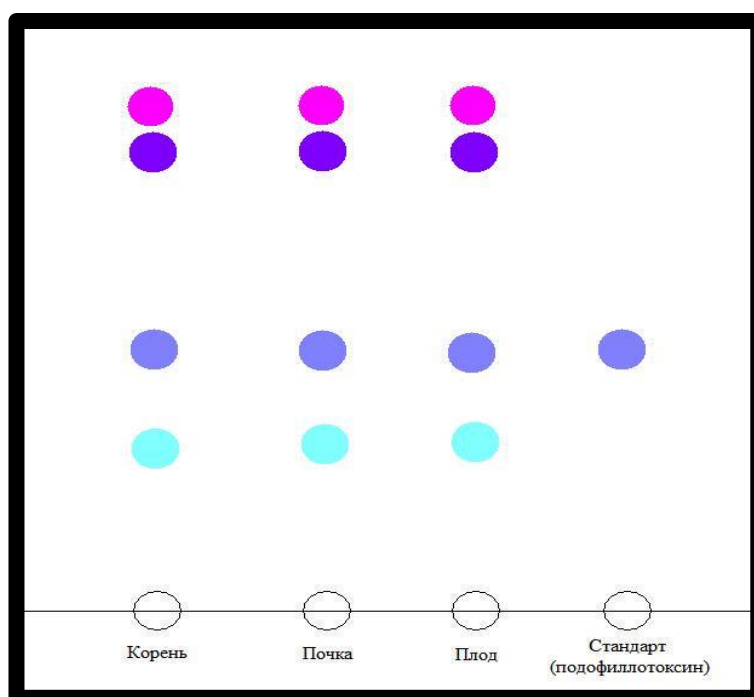


Рисунок 5.1. - Схема хроматограммы ТСХ при детектировании в УФ-свете при длине волны 254 нм

Наиболее интенсивная окраска зоны адсорбции, соответствующая зоне стандарта, характерна для экстрактов, полученных на основе ацетона,

хлороформа и этилацетата. При сравнении трех клеточных линий наибольшая интенсивность зоны адсорбции обнаружена для клеточной культуры, полученной из плода.

## 5.2. Анализ экстрактов клеточных культур *P. peltatum* L. методом газовой хроматографии

При экстракции высушенных суспензионных культур *P. peltatum* L. метиловым спиртом доля подофиллина в % от сухой массы культуры составила для культуры из почки -  $15,98 \pm 4,82$  %, из плода -  $12,50 \pm 3,32$  %, из корня -  $18,38 \pm 3,16$  %.

ГЖХ-МС анализ экстракта на основе метилового спирта выявил большое количество летучих соединений (табл. 5.1.).

Таблица 5.1. - Количество летучих соединений в составе экстрактов суспензионных культур *P. peltatum* L. на основе метилового спирта, выявленных методом ГЖХ-МС

Суспензионная клеточная культура	Число пиков	Число идентифицированных пиков
Из плода 28 суток	490	12
Из почки 28 суток	427	43
Из корня 28 суток	483	8
Из плода 14 суток	482	45
Из почки 14 суток	233	18
Из корня 14 суток	249	45

Хроматограммы экстрактов суспензионных культур на основе метилового спирта представлены в Приложении 5, идентифицированные соединения - в Таблице 5.2. и 5.3.

Таблица 5.2. - Летучие соединения экстракта 14-суточной суспензионной культуры *P. peltatum* L. на основе метилового спирта, составляющие наибольшую долю в % от общей массы сухого экстракта

Название летучего соединения	Количество <sup>1</sup> в с.к.к. <sup>2</sup> , %		
	Из плода	Из почки	Из корня
1,6,10,14,18,22-тетракозагексаен-3-ол	1.237	1.237	-
1,6-ангидро-β-D-глюкопираноза	- <sup>3</sup>	-	3.736
1-гидроксиметилгексадекановая кислота	3.260	1.484	0.874
2,2-диметиламиноэтил-4,5-метилен	-	-	2.056
2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-4Н-пиран-4-он	1.717	1.509	1.850
2,4-дигидрокси-2,5-диметил-3(2Н)-фуран-3-он	-	-	1.720
2-гидрокси-9-октадекановая кислота	1.951	-	-
2-диметиламиноэтилтетрафумаровая кислота	1.119	-	-
3-ацетилтимин	-	-	1.175
4-1,2-триметилсилилоксисилан	1.290	-	-
4-гидроксибензолэтанол	-	-	1.781
9,12-октадекадиеновая кислота	0.626	-	1.004
D-аллоза	-	-	1.825
N-метил-N-нитрозо-p-толуидин	-	-	2.299
β-ситостерол	2.033	-	-
Бутил-2-метилпен-3-ил фталиевой кислоты	6.255	-	-
Бутилгекс-3-иловый эфир фталиевой кислоты	-	1.017	-
Гексадекановая кислота	9.209	9.209	6.4
Гексановая кислота	2.808	-	1.328
Дибутилфталат	-	-	4.195
Монометилмалонат	-	-	3.269
Олеиновая кислота	1.806	-	2.64
Сахароза	9.963	9.963	3.521



Стигмастерол	1.257	-	-
Этил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид	12.10	12.10	5.67

<sup>1</sup>Приведена доля в % относительно общего количества идентифицированных соединений; в таблице указаны только те соединения, количество которых составило более 1 %. <sup>2</sup>С.к.к. – суспензионная клеточная культура. <sup>3</sup>Соединения не идентифицированы.

Таблица 5.3. - Летучие соединения экстракта 28-суточной суспензионной культуры *P. peltatum* L. на основе метилового спирта, составляющие наибольшую долю в % от общей массы сухого экстракта

Название летучего соединения	Количество <sup>1</sup> в с.к.к. <sup>2</sup> , %		
	Из плода	Из почки	Из корня
1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ол-1	-	-	1.013
11,14-октадекадиеновой кислоты метиловый эфир	-	-	1.174
14-метилпентадекановая кислота	-	0.238	1.41
22-кетохолестерол	-	-	4.274
2-метил-N-(2-метилбутил)бутан-1-имин	1.541	0.393	-
3',8,8'-триметокси-3-пиперидил-2,2'-бинафтален-1,1',4,4'-тетрон	-	-	1.032
3-метилизохинолин	-	16.6	-
4,6-O-этилиден- $\alpha$ -D-глюкоза	-	13.77	-
4-гидроксибензенэтанол	-	1.372	0.1
5,6-диметокси-1H-индол	0.651	1.882	3.879
7-гексадецинал	-	-	5.137
9,12-октадекадиеновая кислота	-	0.358	39.449
D-аллоза	-	0.597	1.219
N-3-метил-2-пиридинил-тиомочевина	5.052	-	2.640
N-метил-N-нитрозо-p-толуидин	-	-	1.286
$\beta$ -ситостерол	-	2.714	-

γ-ситостерол	-	9.143	-
Бутил-4-гептиловый эфир фталиевой кислоты	-	2.455	-
Гексадекановая кислота	-	-	21.657
Гексадекановой кислоты этиловый эфир	-	-	2.583
Гексановая кислота	1.19	-	0.122
Десульфосинигрин	-	-	1.108
Дибутилфталат	-	-	8.728
Диизооктилфталат	-	-	1.251
Кампестерол	-	-	8.809
Линолевой кислоты этиловый эфир	-	-	4.69
Метил-9-цис,11-транс-октадекадиеноат	-	-	2.936
Метилпальмитат	-	2.705	-
Монометилмалонат	-	0.581	1.079
Стевиозид	-	-	1.741
Трегалоза	-	-	16.79
Циклопропаноктановая кислота	-	-	10.4
Эстра-1,3,5(10)-триен-17-ол	-	-	4.799
Этил-α-D-глюкопиранозид	-	13.218	5.928

<sup>1</sup>Количество относительно общего количества идентифицированных соединений; в таблице указаны только те соединения, количество которых составило более 1 %. <sup>2</sup>С.к.к. – суспензионная клеточная культура.

Карбоновые кислоты идентифицированы во всех суспензионных культурах; стероиды - в 28-суточной суспензионной культуре из почки, и 14-суточной клеточной культуре из плода; углеводы - во всех культурах, кроме 28-суточной суспензионной культуры из плода; гликозиды - во всех суспензионных культурах, кроме 28-суточной суспензионной культуры из плода. Идентифицированы азотсодержащие соединения и алкалоиды.

Во всех 14-суточных культурах, а также в 28-суточной культуре, полученной из корня растения, идентифицировано 6-9 % и 22 % гексадекановой

кислоты соответственно. Этил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид идентифицирован во всех 14-суточных культурах (12 % - в культуре из плода и почки, 6 % в культуре из корня), а также в 28-суточной культуре из почки (13 %) и корня (6 %). В 28-суточной культуре из корня идентифицировано 39 % 9,12-октадекадиеновой кислоты. В 14-суточных культурах обнаружено большое количество сахароз: 10 % в культуре из почки и плода; 4 % в культуре из корня. В 14-суточной культуре из корня идентифицировано 17 % трегалозы.

Культуры, полученные из корня, содержат наибольшее количество разных веществ в количестве более 1 % от общей массы.

### **5.3. Анализ ацетоновых экстрактов органов растения и клеточных культур**

#### ***P. peltatum* L. методом жидкостной хроматографии**

Для проведения полуколичественной ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ) на основе сравнения площадей пиков исходный ацетоновый экстракт разводили деионизованной водой 1:5.

Идентификация веществ проводилась при сравнении времени удерживания и спектра пиков хроматограмм образцов изучаемых экстрактов с временем удерживания и спектров пиков хроматограмм стандартных веществ.

В результате УЭЖХ были идентифицированы фенольные соединения пяти классов: производные эллаговой, кофейной и галловой кислот, лигнана подофиллотоксина и флавоноидов.

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.

Во всех экстрактах идентифицировали производные флавоноидов (рис. 5.2.).

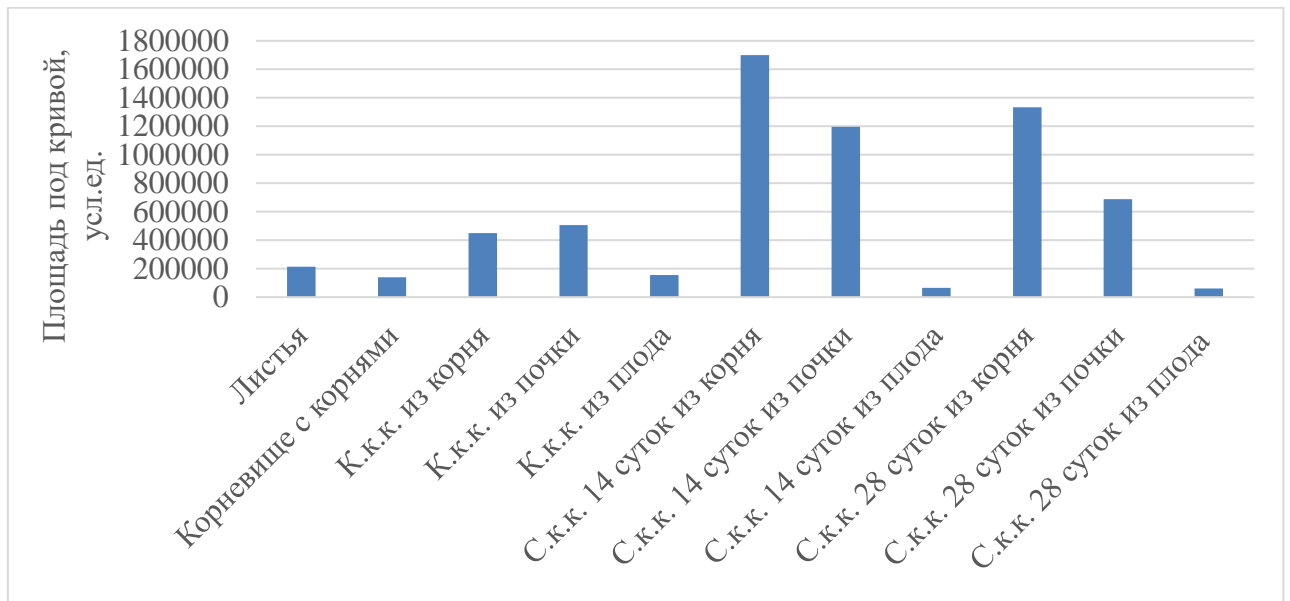


Рисунок 5.2. – Производные флавоноидов в ацетоновых экстрактах клеточных культур и органов растения *P. peltatum* L.\*

\*К.к.к. – каллусная клеточная культура, С.к.к. – суспензионная клеточная культура. Содержание основных классов фенольных соединений измеряли полуколичественно, сравнением площадей пиков.

Во всех экстрактах, кроме экстрактов каллусных культур, полученных из корня и почки, идентифицированы производные галловой кислоты (рис. 5.3.).

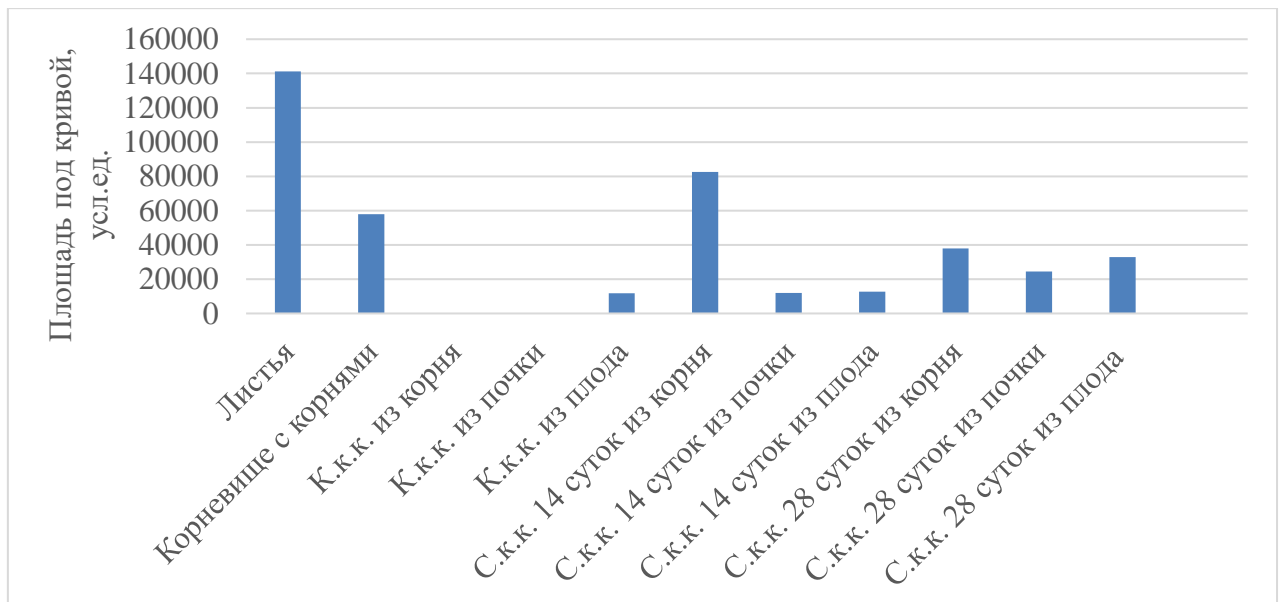


Рисунок 5.3. – Производные галловой кислоты в ацетоновых экстрактах клеточных культур и органов растения *P. peltatum* L.\*

\*К.к.к. – каллусная клеточная культура, С.к.к. – суспензионная клеточная культура. Содержание основных классов фенольных соединений измеряли полуколичественно, сравнением площадей пиков.

Производные подофиллотоксина были идентифицированы в 3 из 11 экстрактов: в экстракте корневищ с корнями (площадь под кривой - 38641 усл.ед.), экстрактах 28-суточных суспензионных культур, полученных из почки (11598 усл.ед.) и плода (10416 усл.ед.).

Производные кофейной кислоты были идентифицированы в 3 из 11 экстрактов: в экстракте листьев (75778 усл.ед.), экстракте 14- и 28-суточных суспензионных культур, полученных из плода (3815 и 6207 усл.ед. соответственно).

Производные эллаговой кислоты были идентифицированы в 4 из 11 экстрактов: в экстракте корневищ с корнями (17312 усл.ед.), экстракте каллусной культуры, полученной из почки и плода (24741 и 14151 усл.ед. соответственно), экстракте 14-суточной суспензионной культуры, полученной из почки (76680 усл.ед.).

На основе данных научной литературы можно предположить, что из идентифицированных соединений противоопухолевую активность могут проявлять соединения любых пяти перечисленных классов: производные подофиллотоксина [73, 110], эллаговой [73, 89, 110, 133], кофейной [101, 163-166], галловой [56, 94, 136, 148, 158, 191] кислот, флавоноидов [67, 73, 100, 114, 117, 132, 133, 134, 174, 185, 186, 189, 190].

Фенольные кислоты (эллаговая, кофейная, галловая) подавляют активность опухолевых клеток посредством разных механизмов.

Эллаговая кислота останавливает клеточный цикл клеток рака шейки матки линии *HeLa* в фазе G1, индуцирует апоптоз клеток, подавляет фосфорилирование киназы Janus 2 и сигнального преобразователя и активатора транскрипции 3 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), а также модулирует экспрессию связанных белков [110]. Также она вызывает остановку клеточного цикла в фазе G2 за счет повышения уровня P53, Bcl-2, каспазы 3 и 9,

в то время как Вах снижается [73]. При этом эллаговая кислота не действует на лактат и пируват [133]. Помимо этого, она ингибирует сигнальный путь АКТ/mTOR за счет повышения уровня экспрессии IGFBP7, который может ингибировать клетки *HeLa* [89].

Кофейная кислота активирует 5-аденозинмонофосфат-активированную протеинкиназу АМПК (AMP activated protein kinase) и препятствует метаболическому репрограммированию клеток шейки матки [163]. В клеточных линиях *HeLa* и *CaSki* кофейная кислота значительно увеличивает экспрессию каспазы 3, 7 и 9 [101].

Галловая кислота ингибирует развитие клеточного цикла клеток рака шейки матки в фазе G2/M, нарушая кластеризацию центросом, которая стимулирует митотическую остановку [148, 158]. Она значительно снижает пролиферацию клеток рака шейки матки, уменьшает инвазию клеток *HeLa in vitro*, подавляет экспрессию ADAM17, EGFR, p-Akt и p-Erk, что препятствует дальнейшей пролиферации опухолевых клеток [191], увеличивает уровень активных форм кислорода, индуцирует истощение восстановленного глутатиона, в результате значительно ингибируя рост клеток *HeLa* [56, 94, 136].

Флавоноиды подавляют активность топоизомеразы II. Кверцетин воздействует на опухолевые клетки *HeLa* посредством модулирования метаболизма лактат-пирувата [133]. Он снижает жизнеспособность клеток рака шейки матки, останавливает клеточный цикл в фазе G2/M, вызывает апоптоз клеток, а также ингибирует миграцию и инвазию клеток [73]. Эпигалокатехин подавляет TGF- $\beta$ -индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход ЕМТ (epithelial–mesenchymal transition) в клетках рака шейки матки [134].

Наиболее сложный и разнообразный химический состав комплекса фенольных соединений обнаружен в экстрактах из органов растений.

Производные флавоноидов идентифицированы во всех изучаемых объектах, производные кофейной кислоты – только в экстракте из листьев, эллаговой кислоты – в трех из восьми исследованных объектов, галловой

кислоты – только в экстрактах из органов растения и суспензионных культур, подофиллотоксина – только в трех из восьми исследованных объектов.

#### 5.4. Анализ ацетоновых экстрактов суспензионных культур, полученных из корня *P. peltatum* L., методом жидкостной хроматографии

Как наиболее перспективные объекты для более детальных исследований на основе предыдущих исследований были выбраны клеточные культуры, полученные из корня растения. Поэтому химический состав по ростовым фазам приведен для суспензионной культуры, полученной из корня.

Для проведения экстракции суспензионной культуры использовали ацетон 80 %, экстрагент, извлекающий из сырья комплекс фенольных соединений.

Для проведения хроматографического анализа исходный экстракт разводили деионизованной водой 1:5.

Во всех экстрактах идентифицировали производные флавоноидов (рис. 5.4.) и галловой кислоты (рис. 5.5.).

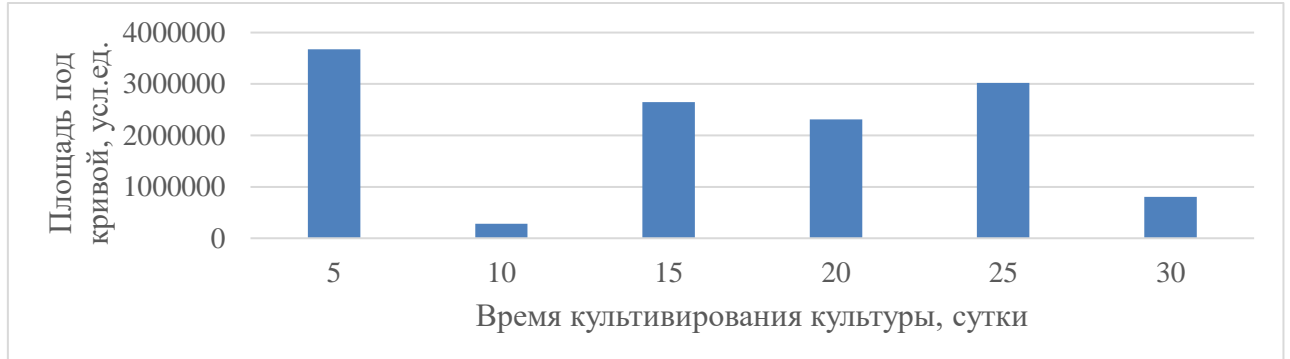


Рисунок 5.4. - Относительное содержание производных флавоноидов в ацетоновых экстрактах суспензионных культур из корня *P. peltatum* L. на разных сроках культивирования\*

\*Содержание основных классов фенольных соединений измеряли полуколичественно, сравнением площадей пиков.

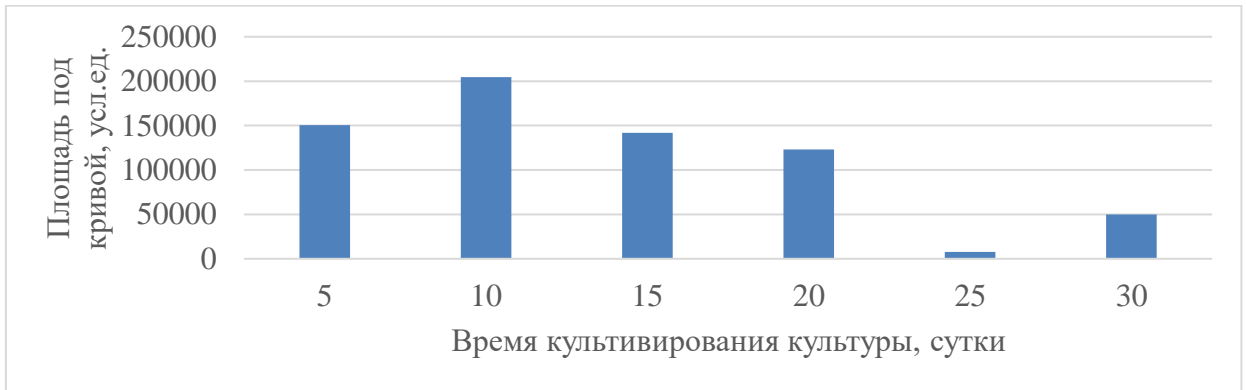


Рисунок 5.5. - Относительное содержание производных галловой кислоты в ацетоновых экстрактах суспензионных культур из корня *P. peltatum* L. на разных сроках культивирования\*

\*Содержание основных классов фенольных соединений измеряли полуколичественно, сравнением площадей пиков.

Содержание производных галловой кислоты растет к 10 суткам, достигает максимума, и понижается к 25 суткам до минимума, потом к 30 суткам возрастает (рис. 5.5.).

Во всех экстрактах, кроме экстракта 5-суточной культуры, идентифицировали производные эллаговой кислоты (рис. 5.6.). Содержание производных эллаговой кислоты меняется незначительно на протяжении 30 суток культивирования.

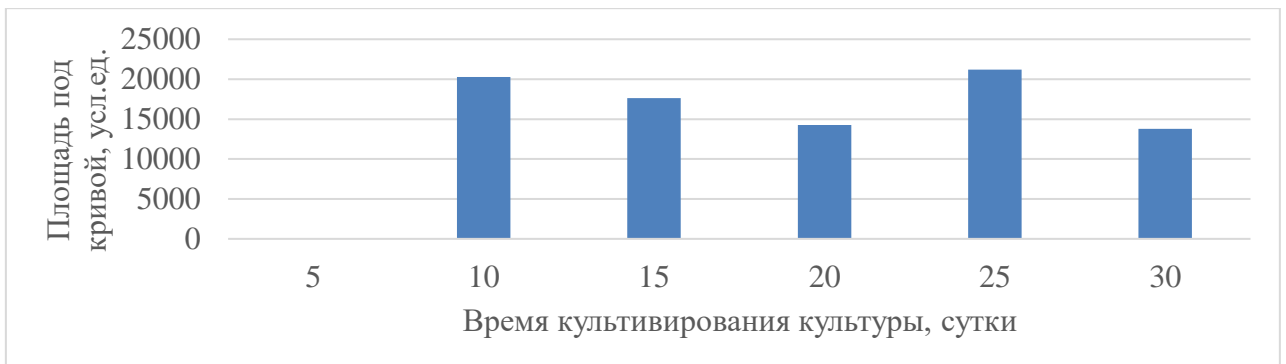


Рисунок 5.6. - Относительное содержание производных эллаговой кислоты в ацетоновых экстрактах суспензионных культур из корня *P. peltatum* L. на разных сроках культивирования\*

\*Содержание основных классов фенольных соединений измеряли полуколичественно, сравнением площадей пиков.



В экстрактах 10- и 15-суточных культур идентифицировали примерно одно и то же количество производных подофиллотоксина - 15314 и 12129 усл.ед. соответственно.

Только в экстракте 5-суточной культуры идентифицированы производные кофейной кислоты – 41887 усл.ед.

На рис. 5.7. приведены хроматограммы ацетоновых экстрактов суспензионных культур из корня при разных сроках культивирования и каллусных культур. Сходство формы пиков показывает сходство состава комплекса фенольных соединений в разных образцах.

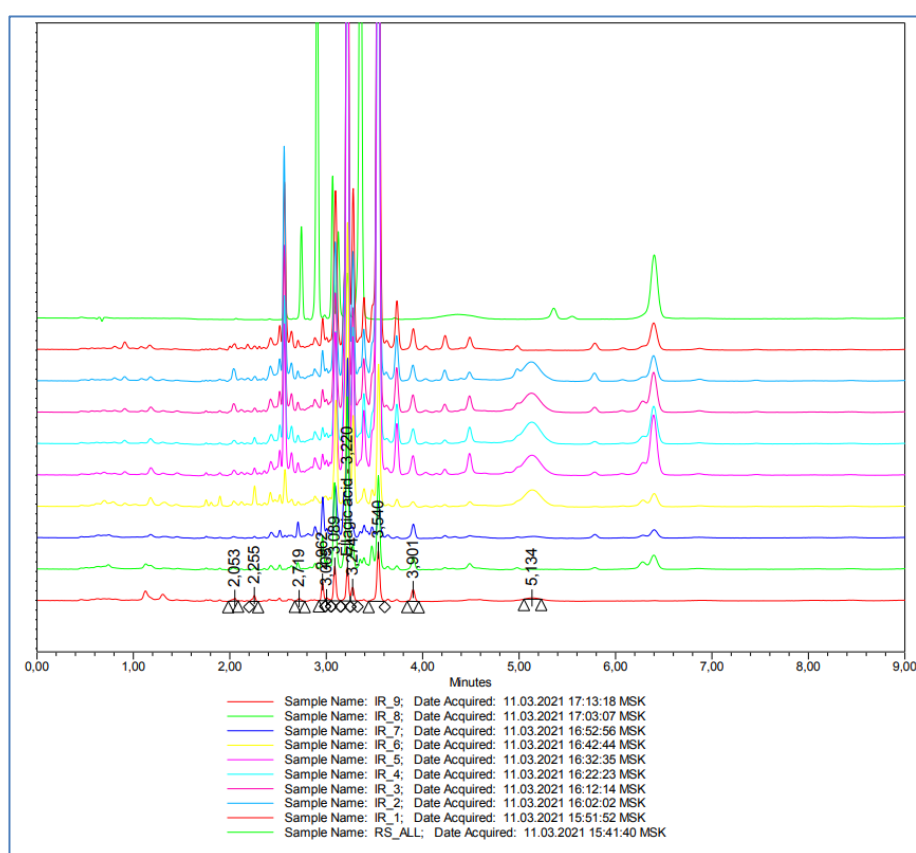


Рисунок 5.7. – Хроматограммы ацетоновых экстрактов суспензионных культур из корня при разных сроках культивирования и каллусных культур

*P. peltatum* L.\*

\*IR\_1, IR\_2, IR\_3, IR\_4, IR\_5, IR\_6 – ацетоновые экстракты суспензионных культур из корня при 5, 10, 15, 20, 25 и 30 сутках культивирования соответственно; IR\_7, IR\_8, IR\_9 – ацетоновые экстракты каллусных культур из корня, почки и плода соответственно.

В Приложении 8 приведены данные времени удерживания и площадей под кривой соединений, определенных в ацетоновых экстрактах суспензионных культур из корня, повторяющихся как минимум при двух сроках культивирования.

На рис. 5.8. представлено изменение относительного количества флавоноидов, идентифицированных при всех сроках культивирования суспензионной культуры.

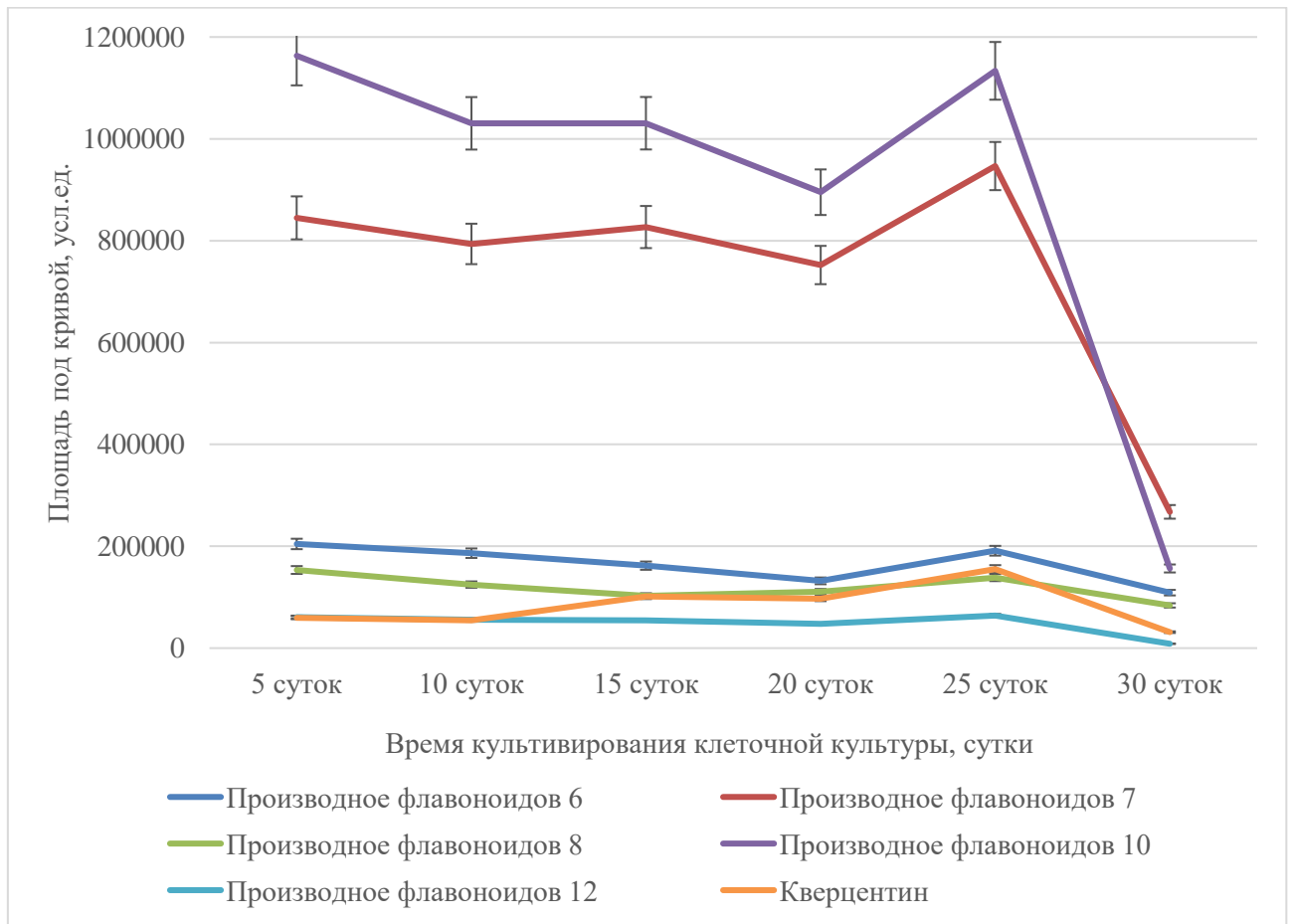


Рисунок 5.8. – Динамика состава комплекса фенольных соединений, идентифицированных в ацетоновых экстрактах суспензионной культуры из корня *P. peltatum* L. при всех сроках культивирования \*

\*Содержание основных классов фенольных соединений измеряли полуколичественно, сравнением площадей пиков.

Только одно соединение было идентифицировано как соответствующее стандарту – кверцетину – по спектру и времени удерживания. Наибольшие количества из указанных шести соединений идентифицировано у производных

флавоноидов 7 и 10. У них похожая динамика накопления: максимальные значения при 5 сутках, далее понижение к 20 суткам до минимального значения, резкое увеличение к 25 суткам и резкое понижение к 30 суткам. Для кверцетина обнаружен медленный рост к 25 суткам и потом медленное понижение к 30 суткам. Производные флавоноидов 6, 8 и 12 незначительно менялись на протяжении 30 суток культивирования клеток.

## Основные выводы по Главе 5

Методом ТСХ в УФ при длине волны 254 нм во всех вариантах экстрактов на пластинках были детектированы зоны адсорбции, соответствующие по положению и окраске стандарту (подофиллотоксин), выше уровня стандарта - зоны фиолетового и розового цвета, ниже уровня стандарта – голубого цвета. Наибольшей интенсивностью окраски характеризовались зоны на уровне стандарта у экстрактов на основе ацетона, хлороформа и этилацетата, при сравнении клеточных культур – у экстрактов культур из плода.

Методом ГХ в экстрактах 14- и 28-суточных суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L. на основе метилового спирта идентифицированы азотсодержащие соединения и алкалоиды, эфиры жирных кислот, стероиды, углеводы, гликозиды, углеводороды, кетоны.

Методом УЭЖХ в ацетоновых экстрактах органов растения и клеточных культур *P. peltatum* L. были идентифицированы фенольные соединения пяти классов: производные эллаговой (корневища с корнями, каллусные культуры из почки и плода, 14-суточная суспензионная культура из почки), кофейной (листья, 14- и 28-суточные суспензионные культуры из плода) и галловой кислот (все объекты, кроме каллусных культур из корня и почки), подофиллотоксина (корневища с корнями, 28-суточные суспензионные культуры из почки и плода) и флавоноидов (все объекты). Согласно данным научной литературы противоопухолевую активность могут проявлять соединения любых пяти перечисленных классов. На основе полученных в исследовании данных клеточные культуры, полученные из корня, были выбраны в качестве наиболее перспективных объектов - потенциальных источников сырья с противоопухолевой активностью. Для них проведен анализ химического состава культуры на разных сроках культивирования (5, 10, 15, 20, 25, 30 суток).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дана морфологическая характеристика суспензионных клеточных культур, полученных из корня, почки и плода *P. peltatum* L. ФГБНУ ВИЛАР (цвет, размер, форма клеток). Построена логарифмическая кривая роста биомассы суспензионных клеточных культур в течение 45 суток. Обозначены фазы роста, характерные для каждой суспензионной культуры. Рассчитаны биотехнологические коэффициенты, характеризующие рост культур: индекс роста, абсолютная и удельная скорость роста, время удвоения биомассы, экономический коэффициент.

Из десяти способов экстракции выбрана экстракция ацетоном 80 %, позволяющая извлечь комплекс фенольных соединений, обладающий цитотоксической активностью.

Для оценки цитотоксической активности резазурин-тест оказался предпочтительным по сравнению с МТТ-тестом. МТТ-тест при работе с фенольными соединениями показывает ложно завышенные значения оптической плотности, вызванные взаимодействием красителя с веществами фенольной природы.

Проведена оценка цитотоксической активности всех экстрактов суспензионных клеточных культур в отношении клеток *HeLa*. Выраженную цитотоксическую активность показали экстракты с использованием хлороформа, этилацетата и ацетона 80 % в качестве экстрагентов. В дальнейшем оценена цитотоксическая активность ацетоновых экстрактов органов растения, каллусных клеточных культур, культуральной жидкости суспензионных клеточных культур, липофильных фракций всех объектов в отношении клеток *HeLa*.

Проведена оценка цитотоксической активности ацетоновых экстрактов органов, каллусных и суспензионных клеточных культур, полученных из корня растения *P. peltatum* L. в отношении клеток *K562*, фибробластов.

Методом ТСХ идентифицирован подофиллотоксин в экстрактах суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L.

Методом ГЖХ-МС в метанольных экстрактах суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L. идентифицированы летучие соединения: азотсодержащие соединения и алкалоиды, эфиры жирных кислот, стероиды, углеводы, гликозиды, углеводороды, кетоны.

Методом УЭЖХ в ацетоновых экстрактах органов растения и клеточных культур *P. peltatum* L. были идентифицированы фенольные соединения пяти классов: производные эллаговой, кофейной и галловой кислот, лигнана подофиллотоксина и флавоноидов. Согласно данным научной литературы противоопухолевую активность могут проявлять соединения любых пяти перечисленных классов.

На основе полученных в исследовании данных суспензионные клеточные культуры, полученные из корня, были выбраны в качестве наиболее перспективных объектов - потенциальных источников сырья с противоопухолевой активностью. Для них проведен анализ химического состава культуры на разных сроках культивирования (5, 10, 15, 20, 25, 30 суток).

## РЕКОМЕНДАЦИИ

На основе полученных в результате исследования данных по ростовым параметрам и коэффициентам роста суспензионных клеточных культур предложены следующие рекомендации по оптимизации режима и условий культивирования суспензионных клеточных культур *P. peltatum* L. ФГБНУ ВИЛАР:

1. для достижения максимального прироста биомассы суспензионную культуру из почки и плода необходимо пересаживать на новую питательную среду на 15-20 сутки культивирования, суспензионную культуру из корня - на 15-25 сутки;
2. для увеличения скорости прироста биомассы суспензионной культуры из корня необходимо провести дополнительные исследования, позволяющие определить степень и особенности влияния объема инокулюма и момента пересадки инокулюма на свежую питательную среду на скорость прироста биомассы.

На основе данных по выходу сухих экстрактов, а также по цитотоксической активности растворов экстрактов, из 10 способов экстракции выбрана экстракция ацетоном 80 %, позволяющая наиболее полно извлечь комплекс фенольных соединений, обладающих цитотоксической активностью, и предложена в качестве основной методики извлечения экстрактивных веществ из 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 продуцента биологически активных веществ с цитотоксической активностью посредством изменения состава питательной среды: добавление фенольных соединений, которые являются предшественниками в шикиматном пути биосинтеза фенольных соединения и алкалоидов, обладающих цитотоксической активностью, идентифицированных в растительном и биотехнологическом сырье *P. peltatum* L.

Результаты диссертационной работы внедрены в курс лекций и практических занятий фармацевтического и медико-биологического факультетов РНИМУ имени Н.И. Пирогова при изучении дисциплины «Фармакогеномика», читаемой студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация, дисциплины «Общие закономерности в действии биологически активных и лекарственных веществ на организм», читаемой студентам по направлению подготовки 30.05.01 Медицинская биохимия, дисциплин «Молекулярные механизмы действия биологически активных веществ и методы их исследования» и «Молекулярная фармакология», читаемых студентам по направлениям подготовки 30.05.01 Медицинская биохимия, 30.05.02 Медицинская биофизика, 30.05.03 Медицинская кибернетика, 31.05.01 Лечебное дело.



## 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аникина Л.В. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина / Л.В. Аникина, С.А. Пухов, Е.С. Дубровская, С.В. Афанасьева, С.Г. Клочков // Фундаментальные исследования. – 2014. - 12-7. – С. 1423–7.
2. Анищенко Л.В. Аннотированный список лекарственных и ароматических растений открытого грунта Ботанического сада Южного федерального университета / Л.В. Анищенко, Ж.Н. Шишлова // HORTUS BOTANICUS. – 2017. - № 12. – С. 288-306.
3. Баширова Р.М. Потенциальные источники подофиллотоксина в Башкирской флоре / Р.М. Баширова, А.Г. Мустафин // Известия уфимского научного центра РАН. - 2016. - №2. - С. 69-82.
4. Бутарева Д.А. Восстановление метиленового синего протопластами и клетками бактерий / Д.А. Бутарева, Ю.С. Дивина, А.В. Игнатенко // Труды БГТУ. – 2019. - № 2. – С. 193-197.
5. Веселкин Д.В. Проверка гипотез о различии размеров корней в связи с типом экологической стратегии и микоризным статусом видов растений / Д.В. Веселкин, А.А. Бетехтина // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отделение Биологии. – 2013. – Том 118. Выпуск 1. – С. 43-50.
6. Виравчева Л.Л. Интродукция рода *Podophyllum* L. в полярно-альпийский ботанический сад / Л.Л. Виравчева, О.Ю. Носатенко, Н.Н. Тростенюк // Научные труды Чебоксарского филиала ГБС РАН. – 2020. – Выпуск 15. – С. 133-137.
7. Головинская О.В. Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro* / О.В. Головинская, М.Л. Байкова, Н.А. Алпатова, Д.А. Зубков, В.В. Фоменко, Л.А. Гайдерова // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2020. – Том 20. - № 3. – С. 193-201.

8. Государственная Фармакопея РФ. XIV издание. Том I. - М.: Министерство здравоохранения РФ, 2018. – 1814 с.
9. Государственная фармакопея СССР VII. – М.: Государственное медицинское издательство, 1934. – 536 с.
10. Государственная фармакопея СССР VIII. – М.: Медгиз, 1959. – 822 с.
11. Громова Н.А. Сравнительная оценка методик определения содержания подофиллина и подофиллотоксина в корневищах с корнями *Podophyllum peltatum* L. и *P. hexandrum* Royle / Н.А. Громова, Б.К. Котовский, И.Ф. Сацыперова, В.П. Богданова // Растительные ресурсы. - 1988. - Том XXIV. Выпуск 2. – С. 277-280.
12. Донская М.В. Список коллекций многолетних травянистых растений открытого грунта Ботанического сада СПбГУ / М.В. Донская // Фиторазнообразие Восточной Европы. – 2018. – XII (4). – С. 50-64.
13. Жигунов О.Ю. *Podophyllum* L. – перспективная малораспространенная тенелюбивая культура / О.Ю. Жигунов, И.Е. Анищенко // Известия Уфимского научного центра РАН. – Уфа. - 2018. - № 2. – С. 32-35.
14. Жигунов О.Ю. Фенольные соединения корней *Podophyllum peltatum* L., интродуцированного в Республике Башкортостан / О.Ю. Жигунов, Я.П. Лебедев, Р.М. Баширова // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 14-19 мая 2018. - М.: ИФР РАН, 2018. - С. 269-273.
15. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – 250 с.
16. Иксанова А.Г. Методы исследования цитотоксичности при скрининге лекарственных препаратов / А.Г. Иксанова, О.В. Бондарь, К.В. Балакин – Казань: Казанский университет, 2016. – 40 с.
17. Каркищенко Н.Н. Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии / Н.И. Каркищенко // Биомедицина. – 2006. - № 4. – С. 5-23.

18. Карягина Т.Б. Лигнаны стеблевой культуры льна желтого / Т.Б. Карягина, Е.А. Гукасова, Т.А. Балашова, Д.И. Баирамашвили, А.И. Мирошников // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – № 4. – С. 21-24.
19. Кольман А. Бйёрн Эквалл и его вклад в современную клеточную токсикологию / А. Кольман // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 10. – С. 888 – 891.
20. Крохмаль И.И. Эколого-биологические предпосылки и прогноз успешности интродукции видов травянистых многолетников в степную зону Украины / И.И. Крохмаль // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. Том 3 (69). – 2017. - № 3. – С. 63-81.
21. Кузнецов Вл.В. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 487 с.
22. Кузнецова Г.А. Способ получения подофиллина / Г.А. Кузнецова, Е.А. Селиванова-Городкова, П.А. Якимов // «Бюллетень изобретений». – 1960. – № 21.
23. Кытина М.А. Некоторые официальные виды флоры Северной Америки, Дальнего Востока, Сибири и Средней Азии в биокolleкциях Ботанического сада ВИЛАР / М.А. Кытина, И.А. Шретер, Ю.М. Минязева // Сборник научных трудов ГНБС. – 2018. – Том 146. – С. 72-80.
24. Лебедев Я.П. Противоопухолевые соединения купыря лесного (*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm) / Я.П. Лебедев, Р.М. Баширова, Р.И. Ибрагимова, А.Г. Мустафин // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. - № 5 (65). – С. 77-80.
25. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна: Издатель Умеренков, 2010. – 1216 с.

26. Муравьева Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2007. – 656 с.
27. Мурадханов Р.Р. Растения, содержащие подофиллотоксин / Р.Р. Мурадханов, Д.А. Коновалов // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2012. - №16 (135). - С. 146-151.
28. Мурадханов Р.Р. Фармакогностическое изучение некоторых видов растительного сырья, содержащего подофиллотоксин: автореферат... дис. кан. фарм.наук: 14.04.02 / Руслан Раджабалиевич Мурадханов – Пятигорск, 2013. - 25 с.
29. Мурадханов Р.Р. Определение подофиллотоксина в молодых побегах можжевельника виргинского (*Juniperus virginiana* L.) / Р.Р. Мурадханов, Т.Д. Мезенова, Д.А. Коновалов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. - №3. – С. 48-51.
30. Назаренко Л.В. Биотехнология растений / Л.В. Назаренко, Ю.И. Долгих, Н.В. Загоскина, Г.Н. Ралдугина. – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 161 с.
31. Наконечная О.В. Род Кирказон на Дальнем Востоке России (*Aristolochia manshuriensis* Kom. и *A. contorta* Bunge) / О.В. Наконечная, Ю.Н. Журавлев, В. П. Булгаков, О. Г. Корень, Е. В. Сундукова. - Владивосток: Дальнаука, 2014. - 153 с.
32. Новикова Л.А. Каталог видов покрытосеменных растений гербария имени И.И. Спрыгина (часть 2) // Известия ПГПУ имени В.Г. Белинского. – 2011. - № 25. – С. 127-153.
33. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 487 с.
34. Орлова О.Л. Современные онкопрепараты для внутреннего применения / О.Л. Орлова, Л.Л. Николаева, Л.А. Король, М.В. Дмитриева, А.П. Полозкова, А.В. Ланцова, И.Д. Гулякин, Н.А. Оборотова // Фармация и фармакология. - 2018. - Т. 6. - № 5. - С. 440-461.

- 35.Официальная статистика / Население / Демография / Число умерших по основным классам причин смерти [Электронный ресурс] / Росстат. – Электрон. текстовые дан. - Москва: Росстат, 2021. Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Jpd3Tniu/demo24.xls>, свободный.
- 36.Официальная статистика / Население / Здравоохранение / Заболеваемость населения по основным классам болезней [Электронный ресурс] / Росстат. – Электрон. текстовые дан. - Москва: Росстат, 2021. Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/2awVgBAn/zdr2-1.xls>, свободный.
- 37.Официальная статистика / Население / Здравоохранение / Заболеваемость населения социально-значимыми болезнями [Электронный ресурс] / Росстат. – Электрон. текстовые дан. - Москва: Росстат, 2021. Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/iv7mRWOs/zdr2-2.xls>, свободный.
- 38.Паспорт суспензионной культуры подофилла щитовидного «Рр(к), 94 ВИЛАР» № 04868244-009-2011 ФГБНУ ВИЛАР. - 2011.
- 39.Пастушенко М.Н. Установление структуры органических соединений химическими методами, книга 2. / Под ред. М.Н. Пастушенко и О.И. Слущкого. - М., Издательство “Химия”, 1967. – 800 с.
- 40.Платонова Е.А. Фенологическое развитие травянистых растений экспозиции «Теневой сад» Ботанического сада Петрозаводского госуниверситета / Е.А. Платонова // HORTUS BOTANICUS. – 2019. - № 14. – С. 338-356.
- 41.Платонова Е.А. Экспозиции Ботанического сада ПетрГУ: «Теневой сад» / Е.А. Платонова // HORTUS BOTANICUS. – 2015. - № 10. – С. 270-276.
- 42.Положение о биологической коллекции «Клеточные штаммы лекарственных растений штаммы паразитарной и сапрофитной культуры спорыньи», ФГБНУ ВИЛАР . – М., 2017. – 12 с.
- 43.Положение о биологической коллекции «Клеточный штаммы человека» ФГБНУ ВИЛАР. – М., 2017. – 9 с.

44. Положение о биологической коллекции видов лекарственных и ароматических растений открытого и защищенного грунта, ФГБНУ ВИЛАР. – Москва, 2017.- 48 с.
45. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1 / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К., 2013. – 944 с.
46. Савина Т.А. Изучение возможности использования клеточной культуры подофилла щитовидного в качестве источника биологически активных соединений / Т.А. Савина, Н.С. Цыбулько // *The Biology of Plant In Vitro and Biotechnology : abstracts VIII International Conference*. – Саратов : Изд. Саратов. губерн. торгово-промышленной палаты, 2003. – С. 88-89.
47. Сазыкин Ю.О. Биотехнология / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева. – М: Издательский центр «Академия», 2008. – 256 с.
48. Сапрыкина П.Д. Растения – продуценты подофиллотоксина / П.Д. Сапрыкина, Р.М. Таипова, Б.Р. Кулуев // Доклады Башкирского университета. – 2018. – Том 3. - №1. - С. 37-48.
49. Семенова Е.В. Исследование цитотоксичности диметилсульфоксида с помощью МТТ-теста на культуре клеток L929 [Электронный ресурс] / Е.В. Семенова, О.В. Минаева, П.К. Зулфугаров, Д.И. Алимов, А.Б. Ватина // Огарев-online. – 2018. – №4. – Режим доступа: <http://journal.mrsu.ru/arts/issledovanie-citotoksichnosti-dimetilsulfoksida-s-pomoshhyu-mtt-testa-na-kulture-kletok-l929>
50. Ткаченко К.Г. Динамика видового состава коллекций Североамериканской и Гималайской горок Альпинария Ботанического сада Петра Великого / К.Г. Ткаченко // *HORTUS BOTANICUS*. – 2016. - № 11. – С. 3-18.
51. ФС 42-1475-89 Подофилла корневища с корнями. - 1989.
52. Хаслам Е. Общая органическая химия. Т. 11. Липиды, углеводы, макромолекулы, биосинтез. / Под ред. Е. Хаслама. - М.: Химия, 1986. – 736 с.
53. Хашиева Л.С. Курс лекций по дисциплине «Лекарственные растения» / Л. С. Хашиева. - Магас: Министерство образования и науки Российской

- Федерации ФГБОУ ВПО «Ингушский государственный университет», 2018. – 130 с.
- 54.Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия / Под ред. В.С. Шевелухи. – М.: ЛЕНАНД, 2015. – 704 с.
- 55.Abad A.S. Synthesis and antimitotic and tubulin interaction profiles of novel pinacol derivatives of podophyllotoxins / A.S. Abad, J.L. López-Pérez, E. Del Olmo, L.F. Garcia-Fernandez, A.S. Francesch, C. Trigili, I. Barasoain, J.M. Andreu, J.F. Díaz, A. San Feliciano // Journal of Medicinal Chemistry. – 2012. – 55. - 6724–6737.
- 56.Aborehab N.M. Effect of Gallic acid in potentiating chemotherapeutic effect of Paclitaxel in HeLa cervical cancer cells / N.M. Aborehab, N. Osama // Cancer Cell International. - 2019. – 19. - 154.
- 57.Ahmad R. Production of lignans in callus culture of *Podophyllum hexandrum* / R. Ahmad, V.K. Sharma, A.K. Rai, R.D. Shivananda, B.G. Shivananda // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. – 2007. – 6(4). – 803-808.
- 58.Amador C.I. High-throughput screening alternative to crystal violet biofilm assay combining fluorescence quantification and imaging / C.I. Amador, R.O. Stannius, H.L. Røder, M. Burmølle // The Journal of Microbiological Methods. – 2021. – 190. - 106343.
- 59.Anbazhagan V. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllum peltatum* / V. Anbazhagan, C. Ahn, E. Harada // In Vitro Cellular & Development Biology - Plant. - 2008. - No. 44. - 494-501.
- 60.Ardalani H. Podophyllotoxin: a novel potential anticancer agent / H. Ardalani, A. Avan, M. Ghayour-Mobarhan // Avicenna Journal of Phytomedicine. - 2017. - Vol. 7. - No. 4. - 285-293.
- 61.Avula B. Rapid Analysis of Lignans from Leaves of *Podophyllum peltatum* L. Samples using UPLC-UV-MS / B. Avula, Y.H. Wang, R.M. Moraes, I.A. Khan // Planta Med. – 2011. - 25(11). - 77-75.



62. Berridge M.V. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction / M.V. Berridge, P.M. Herst, An.S. Tan // *Biotechnology Annual Review*. – 2005. -11. - 127–52.
63. Bopp S.K. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line / S.K. Bopp, T Lettieri // *BMC Pharmacology and Toxicology*. – 2008. – 8.
64. Broomhead A.J. Biotransformation of Podophyllum lignans in cell suspension cultures of *Forsythia intermedia* / A.J. Broomhead, P.M. Dewick // *Phytochemistry*. – 1991. – No. 30. – 1511-1517.
65. Canedo-Téxon A. Novel findings to the biosynthetic pathway of magnoflorine and taspine through transcriptomic and metabolomic analysis of *Croton draco* (*Euphorbiaceae*) / A. Canedo-Téxon // *BMC Plant Biology*. - 2019. - 19(1). - 560.
66. Cao R.Y. Berberine on the Prevention and Management of Cardiometabolic Disease: Clinical Applications and Mechanisms of Action / R.Y. Cao // *The American Journal of Chinese Medicine*. - 2021. - 6. - 1-22.
67. Castillo-Bautista C.M. Secundiflorol G isolated from *Aeschynomene fascicularis*, a Mayan medicinal plant, induces apoptosis in cervical cancer cells / C.M. Castillo-Bautista, L.W. Torres-Tapia, A. Lagunes-Martines // *Natural Product Research*. – 2021. - 35(5). - 826-828.
68. Chang L. Magnoflorine Ameliorates Inflammation and Fibrosis in Rats With Diabetic Nephropathy by Mediating the Stability of Lysine-Specific Demethylase 3A / L. Chang // *Frontiers in Physiology*. - 2020. – 11:580406.
69. Chao Z. *Aspergillus niger* changes the chemical form of uranium to decrease its biotoxicity, restricts its movement in plant and increase the growth of *Syngonium Podophyllum* / Z. Chao, S. Yin-Hua, D. De-Xin, L. Guang-Yue, C. Yue-Ting, H. Nan, Z. Hui, D. Zhong-Ran, L. Feng, S. Jing, W. Yong-Dong // *Chemosphere*. - 2019. – 224. - 316-323.
70. Chattopadhyay S. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures / S. Chattopadhyay, R.S. Mehra,

- A.K. Srivastava, S.S. Bhojwani, V.S. Bisaria // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2003. - 60(5). - 541-6.
71. Chattopadhyay S. Enhanced production of podophyllotoxin by *Podophyllum hexandrum* using in situ cell retention bioreactor / S. Chattopadhyay, V.S. Bisaria, A.K. Srivastava // *Biotechnology Progress*. - 2003. - 19(3). - 1026-8.
72. Chen J.Y. A synthetic podophyllotoxin derivative exerts anti-cancer effects by inducing mitotic arrest and pro-apoptotic ER stress in lung cancer preclinical models / J.Y. Chen, Y.A. Tang, W.S. Li, Y.C. Chiou, J.M. Shieh, Y.C. Wang // *Plos One*. – 2013. – 8. - e62082.
73. Chen X. EGFR and ERK activation resists flavonoid quercetin-induced anticancer activities in human cervical cancer cells *in vitro* / X. Chen, P. Xu, H. Zhang // *Oncology Letters*. - 2021. - 22(5). - 754.
74. Chen Q.C. Protective effects of berberine on senile osteoporosis in mice / Q.C. Chen // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. - 2021. - 39(5). – 748.
75. Choi J.Y. Podophyllotoxin acetate enhances  $\gamma$ -ionizing radiation-induced apoptotic cell death by stimulating the ROS/p38/caspase pathway / J.Y. Choi, H.J. Cho, S.G. Hwang, W.J. Kim, J.I. Kim, H.D. Um, J.K. Park // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2015. – 70. - 111–118.
76. Cope C.G. Potential interactive effects between invasive *Lumbricus terrestris* earthworms and the invasive plant *Alliaria petiolata* on a native plant *Podophyllum peltatum* in northeastern Ohio, USA / C.G. Cope, S.R. Eysenbach, A.S. Faidiga, S.E. Hausman, J.S. Medeiros, J.E. Murphy, J.H. Burns // *AoB PLANTS*. – 2021. – Vol. 13. – No. 1. – 1-10.
77. Dang Y. Berberine ameliorates cellular senescence and extends the lifespan of mice via regulating p16 and cyclin protein expression / Y. Dang, Y. An, J. He et al. // *Aging Cell*. - 2020. – 19(1). - 13060.
78. Decembrino D. Synthesis of (-)-deoxypodophyllotoxin and (-)-epipodophyllotoxin via a multi-enzyme cascade in *E. coli* / D. Decembrino, A. Raffaele, R. Knöfel, M. Girhard, V.B. Urlacher // *Microbial Cell Factories*. – 2021. - 20(1). - 183.

- 79.Devika P.T. (-)Epigallocatechin-gallate (EGCG) prevents mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiac toxicity in albino Wistar rats: a transmission electron microscopic and in vitro study / P.T. Devika, S.P. Mainzen Prince // *Pharmacological Research.* – 2008. – 57. - 351-357.
- 80.Ehteshamfar S.M. Anti-inflammatory and immune-modulatory impacts of berberine on activation of autoreactive T cells in autoimmune inflammation / S.M. Ehteshamfar // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* - 2020. - 24(23). - 13573.
- 81.Engström M.T. Rapid Fingerprint Analysis of Plant Extracts for Ellagitannins, Gallic Acid, and Quinic Acid Derivatives and Quercetin-, Kaempferol- and Myricetin-Based Flavonol Glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS / M.T. Engström, M. Päljärvi, J.-P. Salminen // *Journal of agricultural and food chemistry.* - 2015. - 63(16). - 4068-4079.
- 82.Farkya S. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin / S. Farkya, V.S. Bisaria, A.K. Srivastava // *Applied Microbiology and Biotechnol.* - 2004. - No. 65. - 504-519.
- 83.Farmacopea Argentina. - Ministerio de Salud de la Nación. Presidente: dr. Manuel R. Limeres. — Buenos Aires, 12 de junio de 2003. — 2745 p.
- 84.Feng X. Berberine in Cardiovascular and Metabolic Diseases: From Mechanisms to Therapeutics / X. Feng // *Theranostics.* - 2019. - 9(7). - 1923.
- 85.German Gomoepathic Pharmacopoeia (GHP). - Deutscher apotheker Verlag Stuttgart, 1985 - 483 p.
- 86.German Gomoepathic Pharmacopoeia (GHP). - Deutscher apotheker Verlag Stuttgart, 2000.
- 87.Guerram M. Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future / M. Guerram, Z.Z. Jiang, L.Y. Zhang // *Chinese Journal of Natural Medicines.* -2012. – 10. -161–169.
- 88.Guo Qi. In vitro Rooting of Podophyllum Hexandrum and Transplanting Technique / Qi Guo, J. Zhou, Zh. Wang, H. Yang // *Engineering.* – 2012. - No. 5. - 142-145.

89. Guo H. Inhibition of Cervical Cancer by Promoting IGFBP7 Expression Using Ellagic Acid from Pomegranate Peel / H. Guo, D. Zhang, Q. Fu // *Medical Sciences Monitor.* – 2016. – 22. - 4881-4886.
90. Guo S. Magnoflorine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via Suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK Activation / S. Guo // *Frontiers in Pharmacology.* - 2018. - 9. - 982.
91. Hesari A. Berberine: A potential adjunct for the treatment of gastrointestinal cancers / A. Hesari // *Journal of Cellular Biochemistry.* - 2018. - 119(12). - 9655.
92. Hsu S. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes / S. Hsu, W.B. Bollag, J. Lewis // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2003. – 306. - 29-34.
93. Hu S. Anticancer effect of deoxypodophyllotoxin induces apoptosis of human prostate cancer cell / S. Hu, Q. Zhou, W.-R. Wu, Y.-X. Duan, Z.-Y. Gao, Y. Li, Q. Lu // *Oncology Letters.* - 2016. - No. 12. - 2918-2923.
94. Hu X.Y. Synthesis and anti-tumor activity evaluation of gallic acid-mangiferin hybrid molecule / X.Y. Hu, J.G. Deng, Y.F. Yuan // *Medicinal Chemistry.* – 2013. - 9(8). - 1058-62.
95. Hung T.M. Magnoflorine from *Coptidis Rhizoma* protects high density lipoprotein during oxidant stress / T.M. Hung // *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* - 2007. - 30(6). - 1157.
96. Jaszczyszyn A. Limitations of the MTT Assay in Cell Viability Testing / A. Jaszczyszyn, K. Gąsiorowski // *Advances in Clinical and Experimental Medicine.* – 2008. – 17. - 525-529.
97. Karakas D. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts / D. Karakas, F. Ari, E. Ulukaya // *Turkish Journal of Biology.* – 2017. – 41. 919-925.
98. Kim J. Antifungal activity of magnoflorine against *Candida* strains / J. Kim // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* - 2018. - 34(11). - 167.
99. Kim Y.S. High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Podophyllum peltatum* L., an important source of anticancer drug / Y.S. Kim, S.

- Lim, Y.E. Choi, V.R. Anbazhagan // *Current science*. - 2007. - Vol. 92 – No. 5. - 662-666.
100. Kluska M. Natural Polyphenols as Modulators of Etoposide Anti-Cancer Activity / M. Kluska, K. Wozniak // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. - 22(12). – 6602.
101. Koraneekit T. Synergistic effects of cisplatin-caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells via the mitochondrial pathways / T. Koraneekit, T. Limpai boon, A. Sangka // *Oncology Letters*. – 2018. - 15(5). - 7397-7402.
102. Koulman A. A fast and simple GC MS method for lignan profiling in *Anthriscus sylvestris* and biosynthetically related Plant species / A. Koulman, R. Bos, M. Medarde, N. Pras, W.J. Quax // *Planta Med*. – 2001. - 67(9). - 858-62.
103. Kukula-Koch W. The Evaluation of Pro-Cognitive and Antiamnestic Properties of Berberine and Magnoflorine Isolated from Barberry Species by Centrifugal Partition Chromatography (CPC), in Relation to QSAR Modelling / W. Kukula-Koch // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2017. - 18(12). - 2511.
104. Kumar P. Analysis of cell viability by the MTT assay / P. Kumar, A. Nagarajan, P.D. Uchil // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2018. - 095505.
105. Kumar V. Biophysical and in silico interaction studies of aporphine alkaloids with Malonyl-CoA: ACP transacylase (FabD) from drug resistant *Moraxella catarrhalis* / V. Kumar // *Biochimie*. - 2018. - 149. - 18.
106. Kumar S. Propagation of *Podophyllum hexandrum* Royale to Enhance Production of Podophyllotoxin / S. Kumar // *Endangered Plants*. - 2020.
107. Kumari A. Biotechnological interventions for harnessing podophyllotoxin from plant and fungal species: current status, challenges, and opportunities for its commercialization / A. Kumari, D. Singh, S. Kumar // *Critical reviews in biotechnology*. - 2016. - No.9. - 739-753.
108. Lall N. Viability reagent, PrestoBlue, in comparison with other available reagents, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays / N. Lall, C.J. Henley-

- Smith, M.N. De Canha, C.B. Oosthuizen, D. Berrington // International Journal of Microbiology. - 2013. - 420601.
109. Li M. Biochemical composition and antioxidant capacity of extracts from *Podophyllum hexandrum* rhizome / M. Li, L. Zhou, D. Yang, T. Li, W. Li // BMC complementary and alternative medicine. – 2012. – 12. - 263.
110. Li L.W. Ellagic acid induces HeLa cell apoptosis via regulating signal transducer and activator of transcription 3 signaling / L.W. Li, C. Na, T.Y. Tian // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2018. - 16(1). - 4068-4079.
111. Li Y. Transferrin receptor-targeted redox/pH-sensitive podophyllotoxin prodrug micelles for multidrug-resistant breast cancer therapy / M. Chen, B. Yao, X. Lu // Journal of Materials Chemistry B. - 2019. - 7(38). - 5814.
112. Lin H.W. Production of podophyllotoxin using cross-species coculture of *Linum flavum* hairy roots and *Podophyllum hexandrum* cell suspensions / H.W. Lin, K.H. Kwok, P.M. Doran // Biotechnology Progress. - 2003. - 19(5). - 1417-26.
113. Lin M.-C. Simultaneous Determination of Podophyllotoxin, Quercetin and Kaempferol in Podophyllin by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry / M.-C. Lin, J.-H. Lin, S.-K. Chen, Y.-W. Cheng, H.-W. Cheng // Journal of Food and Drug Analysis. – 2008. - 16(6). - 29-40.
114. Liu M.M. Apigenin 7-O-glucoside promotes cell apoptosis through the PTEN/PI3K/AKT pathway and inhibits cell migration in cervical cancer HeLa cells / M.M. Liu, R.H. Ma, Z.J. Ni // Food and Chemical Toxicology. – 2020. – 146. - 111843.
115. Liu W. Characterization and inhibitor discovery of one novel malonyl-CoA: acyl carrier protein transacylase (MCAT) from *Helicobacter pylori* / W. Liu // FEBS Letters. - 2006. - 580(2). - 697.
116. Liu J.F. Synthesis and cytotoxic activity on human cancer cells of carbamate derivatives of 4 $\beta$ -(1, 2, 3-triazol-1-yl) podophyllotoxin / J.F. Liu, C.Y. Sang, X.H. Xu, L.L. Zhang, X. Yang, L. Hui, J.B. Zhang, S.W. Chen // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2013. – 64. - 621–628.

117. Luo Y.H. Anti-cancer effects of baicalein on cervical carcinoma cells through down-regulation of the ERK/p38/MAPK pathway / Y.H. Luo, L. Zhang, M.Y. Wang // *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents Archivi* – 2021. – 35(3). - 945-952.
118. Macedo T.B. Cytotoxic Effect of *Erythroxyllum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines / T.B. Macedo // *Brazilian Dental Journal*. - 2016. - 27(1). - 108.
119. Maleš Ž. Application of medicinal plants in several dermatovenerological entities / Ž Maleš // *Acta Pharmaceutica*. - 2019. - 69(4). - 525-531.
120. Marques J. A multi-omics strategy resolves the elusive nature of alkaloids in *Podophyllum* species / J. Marques // *Molecular BioSystems*. - 2014.
121. Meng Z. Research progress in biosynthesis of podophyllotoxin and its derivatives / Z. Meng, T. Yao, W. Zhao, H. Li, Y.J. Tang // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. - 2021. - 37(6). - 2026-2038.
122. Minnis A.M. Taxonomy of mayapple rust: the genus *Allodus* resurrected / A.M. Minnis, A.R. McTaggart, A.Y. Rossman, M.C. Aime // *Mycologia*. – 2012. - 104(4). – 942–950.
123. Misík V. Lipoxygenase inhibition and antioxidant properties of protoberberine and aporphine alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium* / V. Misík // *Planta Medica*. - 1995. - 61(4). - 372.
124. Mohamed S.M. Cytotoxic and antiviral activities of aporphine alkaloids of *Magnolia grandiflora* L / S.M. Mohamed // *Natural Product Research*. - 2010. – 24. – 1395–1402.
125. Moraes-Cerdeira R.M. In vitro propagation of *Podophyllum peltatum* / R.M. Moraes-Cerdeira, J. K. Bastos // *Planta Medica*. - 1998. - No. 64. - 42-46.
126. Moraes-Cerdeira R.M. *The American Mayapple* and its Potential for Podophyllotoxin Production / R.M. Moraes-Cerdeira, H. Lata, E. Bedir, M. Maqbool, K. Cushman // *Trends in New Crops and New Uses*. - 2002. - 527-532.

127. Morris J.S. Isolation and Characterization of Reticuline N-Methyltransferase Involved in Biosynthesis of the Aporphine Alkaloid Magnoflorine in Opium Poppy / J. S. Morris, P. J. Facchini // *Journal of Biological Chemistry*. - 2016. - 291(45).
128. Niederhauser E.C. Do deer and raccoons defecate in the right place? Fitness consequences of vertebrate seed dispersal for a deciduous forest herb / E.C. Niederhauser, G.L. Matlack // *Oecologia*. – 2017. - 183(3). - 727-737.
129. Oh H.N. Targeted inhibition of c-MET by podophyllotoxin promotes caspase-dependent apoptosis and suppresses cell growth in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells / H.N. Oh // *Phytomedicine*. - 2021. - 80.
130. Olapade O.A. Plant-associated bacterial populations on native and invasive plant species: comparisons between 2 freshwater environments / Olapade, K. Pung // *Can J Microbiol*. – 2012. – 58(6). – 767-75.
131. Okon E. Advances in Chemistry and Bioactivity of Magnoflorine and Magnoflorine-Containing Extracts / E. Okon // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2020. - 21(4). - 1330.
132. Pandey P. A Novel Approach to Unraveling the Apoptotic Potential of Rutin (Bioflavonoid) via Targeting Jab1 in Cervical Cancer Cells / P. Pandey, F. Khan, P. Maurya // *Journal of Food Biochemistry*. – 2021. - 45(7). - e13800.
133. Pani S. Phytocompounds curcumin, quercetin, indole-3-carbinol, and resveratrol modulate lactate-pyruvate level along with cytotoxic activity in HeLa cervical cancer cells / S. Pani, A. Sahoo, A. Patra // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. - 2020.
134. Panji M. Suppressing effects of green tea extract and Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on TGF- $\beta$ - induced Epithelial-to-mesenchymal transition via ROS/Smad signaling in human cervical cancer cells / M. Panji, V. Behmard, Z. Zare // *Gene*. – 2021. – 794. - 145774.
135. Pappa E. Emerging Fixed-Dose Combination Treatments for Hyperlipidemia / E. Pappa // *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. - 2019. - 24(4). - 315.



136. Park W.H. Gallic acid induces HeLa cell death via increasing GSH depletion rather than ROS levels / W.H. Park // *Oncology Reports*. – 2017. - 37(2). - 1277-1283.
137. Peng L. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells / L. Peng, B. Wang, P. Ren // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2005. – 45. - 108-111.
138. Pharmacopée française. – 1989.
139. Podophiloх [Электронный ресурс] / Pubchem. - Электрон. текстовые дан. – Maryland: U. S. National Library of Medicine, 2021. Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10607>.
140. Prabst K. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin / K. Prabst, H. Engelhardt, S. Ringgeler, H. Hubner // *Cell Viability Assays (Methods and Protocols)*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1601. – New York: Humana Press, 2017. - 1–17.
141. Prendergast G.C. Cancer immunologists and cancer biologists: why we didn't talk then but need to now / G.C.Prendergast // *Cancer Research*. - 2007. - 67(8). - 3500-4.
142. Ramos A.C. Heterolignanolides Furo- and thieno-analogues of podophyllotoxin and thuriferic acid / A.C. Ramos, R. Peláez, J.L. López, E. Caballero, M. Medarde, A. San Feliciano // *Tetrahedron*. – 2001. – 57. - 3963–3977.
143. Renouard S. Investigation of *Linum flavum* (L.) Hairy Root Cultures for the Production of Anticancer Aryltetralin Lignans / S. Renouard, C. Corbin, S. Drouet, B. Medvedec, J. Doussot, C. Colas, B. Maunit, A.S. Bhambra, E. Gontier, N. Jullian, F. Mesnard, M. Boitel, B.H. Abbasi, R.R. J. Arroo, E. Lainé, C. Hano // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2018. - 19(4). – 990.
144. Riss T.L. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual* / T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles. -. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

145. Sagowska A. In vitro propagation of *Podophyllum peltatum* L. by the cultures of ambrya and divided embryo / A. Sagowska, M. Wiweger, B. Lata // *Biologia Plantarum*. - 1997. - No. 39. - 331-336.
146. Salahudeen N. Kinetics and thermodynamics of hydrolysis of crystal violet at ambient and below ambient temperatures / N. Salahudeen, A.A. Rasheed // *Scientific Reports*. – 2020. - 10(1). – 21929.
147. Schwartz J. Useful plants of dermatology. VI. The mayapple (*Podophyllum*) / J. Schwartz // *Journal of the American Academy of Dermatology*. - 2002. - 47(5). - 774.
148. Shi L. Gallic acid induces apoptosis in human cervical epithelial cells containing human papillomavirus type 16 episomes / L. Shi, Y. Lei, R. Srivastava // *Journal of Medical Virology*. – 2016. - 88(1). - 127-34.
149. Shin S.Y. Deoxypodophyllotoxin induces G 2/M cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells / S.Y. Shin, Y. Yong, C.G. Kim, Y.H. Lee, Y. Lim // *Cancer Letters*. – 2010. – 287. - 231–239.
150. Stockert J.C. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives / J.C. Stockert, R.W. Horobin, L.L. Colombo, A. Blazquez-Castro A. // *Acta Histochemica*. - 2018. - 120(3). - 159–67.
151. Stoddart J.M. Cell viability assays: Introduction / Stoddart J.M. // *Mammalian Cell Viability (Methods and Protocols)*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 740. New York: Humana Press, 2011. - 1–6.
152. Suadoni M.T. Berberine for the treatment of hypertension: A systematic review / M.T. Suadoni // *Complementary Therapies in Clinical Practice*. - 2021. – 42:101287.
153. Sun R. Cytotoxicity of Aporphine, Protoberberine, and Protopine Alkaloids from *Dicranostigma leptopodum* (Maxim.) / R. Sun // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. - 2014. – 2014:580483.

154. Sun X.L. Magnoflorine inhibits human gastric cancer progression by inducing autophagy, apoptosis and cell cycle arrest by JNK activation regulated by ROS / X.L. Sun // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. - 2020. – 125:109118.
155. Sun D. Screening and identification of *Caulis Sinomenii* bioactive ingredients with dual-target NF- $\kappa$ B inhibition and  $\beta$ 2- AR agonizing activities / D. Sun // *Biomedical Chromatography*. - 2016. - 30(11). – 1843.
156. The British Pharmacopoeia. – British Pharmacopoeia Commission, The Stationery Office, Norwich, Great Britain, 2009. - 10952.
157. Tan J. Antimicrobial characteristics of Berberine against prosthetic joint infection-related *Staphylococcus aureus* of different multi-locus sequence types / J. Tan // *BMC Complementary Medicine and Therapies*. - 2019. - 19(1). - 218.
158. Tan S. Gallic acid induces mitotic catastrophe and inhibits centrosomal clustering in HeLa cells / S. Tan, X. Guan, C. Grün // *Toxicology In Vitro*. – 2015. - 30(1PtB). - 506-13.
159. The Plant List, 2013. Version 1.1 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.theplantlist.org>.
160. Tiwari K. A sensitive WST-8-based bioassay for PEGylated granulocyte colony stimulating factor using the NFS-60 cell line / K. Tiwari, M. Wavdhane, S. Haque, T. Govender, G.H. Kruger, M. Mishra // *Pharmaceutical Biology*. - 2015. - 53(6). - 849–54.
161. Tonder A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays / A. Tonder, A.M. Joubert, D. Cromarty // *BMC Research Notes*. – 2015. – 8. - 47.
162. Tripathi N. Gram Staining / N. Tripathi, A. Sapra // StatPearls Publishing. – 2021.
163. Tyszka-Czochara M. Caffeic Acid Targets AMPK Signaling and Regulates Tricarboxylic Acid Cycle Anaplerosis while Metformin Downregulates HIF-1 $\alpha$ -Induced Glycolytic Enzymes in Human Cervical

- Squamous Cell Carcinoma Lines / M. Tyszka-Czochara, K. Bukowska-Strakova, K.A. Kocemba-Pylarczyk // *Nutrients*. – 2018. - 10(7). - 841.
164. Tyszka-Czochara M. Caffeic Acid Expands Anti-Tumor Effect of Metformin in Human Metastatic Cervical Carcinoma HTB-34 Cells: Implications of AMPK Activation and Impairment of Fatty Acids De Novo Biosynthesis / M. Tyszka-Czochara, P. Konieczny, M. Mayka // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2017. - 18(2). - 462.
165. Tyszka-Czochara M. Metformin and caffeic acid regulate metabolic reprogramming in human cervical carcinoma SiHa/HTB-35 cells and augment anticancer activity of Cisplatin via cell cycle regulation / M. Tyszka-Czochara, K. Bukowska-Strakova, M. Majka // *Food and Chemical Toxicology*. – 2017. - 106(PtA). - 260-272.
166. Tyszka-Czochara M. Caffeic Acid and Metformin Inhibit Invasive Phenotype Induced by TGF- $\beta$ 1 in C-4I and HTB-35/SiHa Human Cervical Squamous Carcinoma Cells by Acting on Different Molecular Targets / M. Tyszka-Czochara, M. Lasota, M. Majka // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. - 19(1). - 266.
167. Uden W. On the improvement of the podophyllotoxin production by phenylpropanoid precursor feeding to cell cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle / W. Uden, N. Pras, T.M. Malimgre // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 1991. – No. 23. – 217-224.
168. Uden W. The accumulation of podophyllotoxin- $\beta$ -D-glucoside by cell suspension cultures derived from the conifer *Callistris drummondii* / W. Uden, N. Pras, T.M. Malimgre // *Plant Cell Reports*. – 1991. – No. 9. – 257-260.
169. Uden W. The production of podophyllotoxin and its 5-methoxy derivate through bioconversion of cyclodextrin-complexed desoxypodophyllotoxin by plant cell cultures / W. Uden, A.S. Bouma, J.F. Brachi-Waker, O. Middel, H.J. Wichers, P. De-Waard, H.J. Woerdenbag, R.M. Kellogg, N. Pras // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 1995. – No. 42. – 73-79.

170. Ulukaya E. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay / E. Ulukaya, M. Colakogullari, E.J. Wood // *Chemotherapy*. – 2004. – 50. - 43–50.
171. Ulukaya E. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested / E. Ulukaya, F. Ozdikicioglu, A.Y. Oral, M. Demirci // *Toxicol In Vitro*. – 2008. – 22. - 232-239.
172. USP 30-NF 25. - Washington, D.C.: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.
173. USP 32-NF 27. - Washington, D.C.: The United States Pharmacopeial Convention, 2009. - 815 p.
174. Wang J. Hesperetin regulates transforming growth factor- $\beta$ 1/Smads pathway to suppress epithelial-mesenchymal transition -mediated invasion and migration in cervical cancer cell / J. Wang, H. Chen, Z. Hu // *Anticancer Drugs*. – 2021. - 32(9). - 930-938.
175. Ward R.S. Pyrolysis-GC/MS of podophyllotoxin and related compounds / R.S. Ward, A. Pelter, G.C. Galletti, L. Qianrong // *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. - 1993. - 27 (2). - 187-197.
176. Warowicka A. Antiviral activity of berberine / A. Warowicka // *Archives of Virology*. - 2020. - 165(9). - 1935.
177. Wei T. Magnoflorine improves sensitivity to doxorubicin (DOX) of breast cancer cells via inducing apoptosis and autophagy through AKT/mTOR and p38 signaling pathways / T. Wei // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. - 2020. – 121. – 109139.
178. Wilson J. Treatment of genital warts—what's the evidence? / J Wilson // *International Journal of STD & AIDS*. – 2002. – 13. - 216–222.
179. Woerdenbag H.J. Increased podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* cell suspension cultures after feeding coniferul alcogol as a beta-cyclodextrin complex / H.J. Woerdenbag, W. Uden, H.W. Frijlink, C.F. Lerk, N. Pras, T.M. Malingre. // *Plant Cell Reports*. – 1990. – No. 9. – 97-100.


180. Wrasidlo W. A novel 2'-*N*-methylpyridinium acetate) prodrug of paclitaxel induces superior antitumor responses in preclinical cancer models / W. Wrasidlo, G. Gaedicke, R.K. Guy, J. Renaud, E. Pitsinos, K.C. Nicolaou, R.A. Reisfeld, H.N. Lode // *Bioconjugate Chemistry*. – 2002. – 13. - 1093–1099.
181. Xu H. A review on hemisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins: 2003-2007 / H. Xu, M. Lv, X. Tian // *Current Medicinal Chemistry*. – 2009. – 16. - 327–349.
182. Yang X.J. Berberine Attenuates Cholesterol Accumulation in Macrophage Foam Cells by Suppressing AP-1 Activity and Activation of the Nrf2/HO-1 Pathway / X.L. Yang // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. - 2020. - 75(1). - 45.
183. Yannai S. Dictionary of food compounds: additives, flavors, and ingredients / S. Yannai // Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2004.
184. Ye W.Q. Plastome organization, genome-based phylogeny and evolution of plastid genes in *Podophylloideae* (*Berberidaceae*) / W.Q. Ye, Z.Y. Yap, P. Li, H.P. Comes, Y.X. Qiu // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2018. – 127. - 978-987.
185. Yu X. SNHG1 represses the anti-cancer roles of baicalein in cervical cancer through regulating miR-3127-5p/FZD4/Wnt/ $\beta$ -catenin signaling / X. Yu, J. Xia, Y. Cao // *Experimental Biology and Medicine*. 2021. - 216(1). - 20-30.
186. Yu G. Antitumor Effects of Baicalein and Its Mechanism via TGF- $\beta$ -Pathway in Cervical Cancer HeLa Cells / G. Yu, L. Chen, Y. Hu // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2021. – 11. 5527190.
187. Yousefzadi M. Optimization of podophyllotoxin extraction method from *Linum album* cell cultures / M. Yousefzadi, M. Sharifi, N.A. Chashmi., M. Behmanesh, A. Ghasempour // *Pharmaceutical Biology*. – 2010. - No. 48 (12). – 1421-1425.

188. Zhang B. Berberine promotes glucose uptake and inhibits gluconeogenesis by inhibiting deacetylase SIRT3 / B. Zhang // *Endocrine*. - 2018. - 62(3). – 576.
189. Zhang D. Calycosin inhibits viability, induces apoptosis, and suppresses invasion of cervical cancer cells by upregulating tumor suppressor miR-375 / D. Zhang, G. Sun, L. Peng // *Archives Biochemistry and Biophysics*. – 2020. – 691. - 108478.
190. Zhang M. Demethyleneberberine attenuates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice through inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling / M. Zhang // *International Immunopharmacology*. - 2020. – 80:106137.
191. Zhao B. Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells / B. Zhao, M. Hu // *Oncology Letters*. – 2013. - 6(6). - 1749-1755.
192. Zheng H. Berberine Is Efficacious for the Treatment of Atrial Fibrillation / H. Zheng // *Biomed Research International*. - 2017. – 3146791.
193. Zheljaskov V.D. Variation in podophyllotoxin concentration in leaves and rhizomes of *American Mayapple (Podophyllum peltatum L.)* / V.D. Zheljaskov, C.L. Cantrell, T. Astatkie // *Industrial Crops and Products*. - 2011. - No. 33. - 633-637.

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**



## Акт о внедрении в учебный процесс результатов диссертационной (научной) работы



УТВЕРЖДАЮ  
 Проректор по научной работе  
 ФГБОУ ВО РНИМУ  
 им. Н.И. Пирогова  
 Ребриков Д.В.

\_\_\_\_\_  
 « января \_\_\_\_\_ 2022 г.

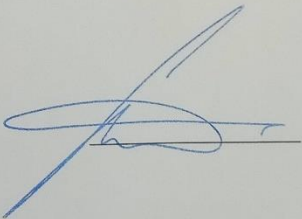
**АКТ**

О внедрении в учебный процесс результатов диссертационной (научной) работы

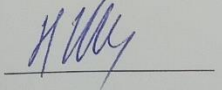
Китаевой Марии Петровны на тему: «Клеточная культура *Podophyllum peltatum* L. как продуцент биологически активных веществ, обладающих цитотоксической активностью» в практику кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева медико-биологического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя, проректора по научной работе, д.б.н., профессора РАН Ребрикова Д.В., заведующего кафедрой, д.м.н., профессора, члена-корреспондента РАН Шимановского Н.Л., удостоверяем, что результаты диссертационной работы Китаевой М.П. внедрены курс лекций и практических занятий при изучении дисциплины «Фармакогеномика», читаемой студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация, дисциплины «Общие закономерности в действии биологически активных и лекарственных веществ на организм», читаемой студентам по направлению подготовки 30.05.01 Медицинская биохимия, дисциплин «Молекулярные механизмы действия биологически активных веществ и методы их исследования» и «Молекулярная фармакология», читаемых студентам по направлениям подготовки 30.05.01 Медицинская биохимия, 30.05.02 Медицинская биофизика, 30.05.03 Медицинская кибернетика, 31.05.01 Лечебное дело.

Проректор по научной работе  
 ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова  
 Минздрава России, д.б.н., профессор  
 Ребриков Денис Владимирович



Заведующий кафедрой  
 молекулярной фармакологии и радиобиологии  
 имени академика П.В. Сергеева,  
 д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН  
 Шимановский Николай Львович



## ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

**Нормализованные по отрицательному контролю значения  
жизнеспособности клеток *HeLa* при инкубации в течение 48 часов с  
экстрактами суспензионных культур *P. peltatum* L.**

Сырье	Разведение экстракта	Этилацетат	Хлороформ	Ацетон 80 %
С.к.к. <sup>1</sup> 28 суток из корня	1	НОК <sup>2</sup>	21±16 <sup>3</sup>	45±9
	1:10	70±5	89±11	31±8
	1:100	57±1	63±4	НОК
	1:1000	НОК	НОК	82±2
С.к.к. 28 суток из почки	1	НОК	21±16	55±23
	1:10	42±3	НОК	НОК
	1:100	46±10	64±14	НОК
	1:1000	НОК	НОК	НОК
С.к.к. 28 суток. из плода	1	НОК	21±8	НОК
	1:10	68±19	НОК	НОК
	1:100	55±8	НОК	НОК
	1:1000	63±11	НОК	НОК
С.к.к. 14 суток из корня	1	НОК	31±7	21±11
	1:10	71±7	НОК	53±5
	1:100	58±1	НОК	НОК
	1:1000	НОК	НОК	НОК
С.к.к. 14 суток из почки	1	НОК	17±5	31±21
	1:10	82±4	НОК	54±17
	1:100	62±4	НОК	НОК
	1:1000	НОК	НОК	НОК
С.к.к. 14 суток из плода	1	НОК	23±21	НОК
	1:10	НОК	НОК	НОК
	1:100	69±7	48±51	НОК
	1:1000	НОК	НОК	НОК

<sup>1</sup>С.к.к. - суспензионная клеточная культура. <sup>2</sup>НОК – нет значимых отличий от отрицательного контроля. <sup>3</sup>Есть отличия от отрицательного контроля на уровне значимости  $p \leq 0,05$  во всех ячейках таблицы, содержащих числа.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

**Нормализованные по отрицательному контролю значения  
жизнеспособности клеток *HeLa* при инкубации в течение 72 часов с  
ацетоновыми экстрактами органов и клеточных культур *P. peltatum* L.**

Сырье, срок культивирования	Разведение экстракта	Жизнеспособность клеток <i>HeLa</i> , %		
		Корень / Корневища с корнями	Почка / Листья	Плод
Суспензионная культура 28 суток	1	50±3 <sup>4</sup>	56±2 <sup>4</sup>	77±14 <sup>4</sup>
	1:10	72±14	88±1 <sup>4</sup>	НОК
	1:100	71±2 <sup>4</sup>	80±2 <sup>4</sup>	НОК
	1:1000	81±1 <sup>4</sup>	НОК <sup>5</sup>	НОК
Суспензионная культуры 14 суток	1	41±2 <sup>4</sup>	56±1 <sup>4</sup>	12±2 <sup>4</sup>
	1:10	75±11 <sup>4</sup>	НОК	46±2 <sup>4</sup>
	1:100	69±3 <sup>4</sup>	НОК	НОК
	1:1000	77±1 <sup>4</sup>	НОК	НОК
Каллусная культура	1	31±1 <sup>3</sup>	27±1 <sup>3</sup>	30±1 <sup>4</sup>
	1:10	26±1 <sup>3</sup>	24±2 <sup>4</sup>	41±12 <sup>3</sup>
	1:100	31±5 <sup>3</sup>	27±1 <sup>3</sup>	25±2 <sup>3</sup>
	1:1000	47±5 <sup>3</sup>	48±5 <sup>3</sup>	45±8 <sup>3</sup>
Корневища с корнями	1	40±3 <sup>3</sup>	38±2 <sup>3</sup>	-
	1:10	40±3 <sup>3</sup>	41±3 <sup>4</sup>	-
	1:100	48±6 <sup>4</sup>	39±6 <sup>4</sup>	-
	1:1000	НОК	НОК	-

1С.к.к. – суспензионная клеточная культура, <sup>2</sup>К.к.к. - каллусная клеточная культура, <sup>3</sup>Есть отличия от отрицательного контроля на уровне значимости  $p \leq 0,01$ , <sup>4</sup>Есть отличия от отрицательного контроля на уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

<sup>4</sup>НОК – нет значимых отличий от отрицательного контроля.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

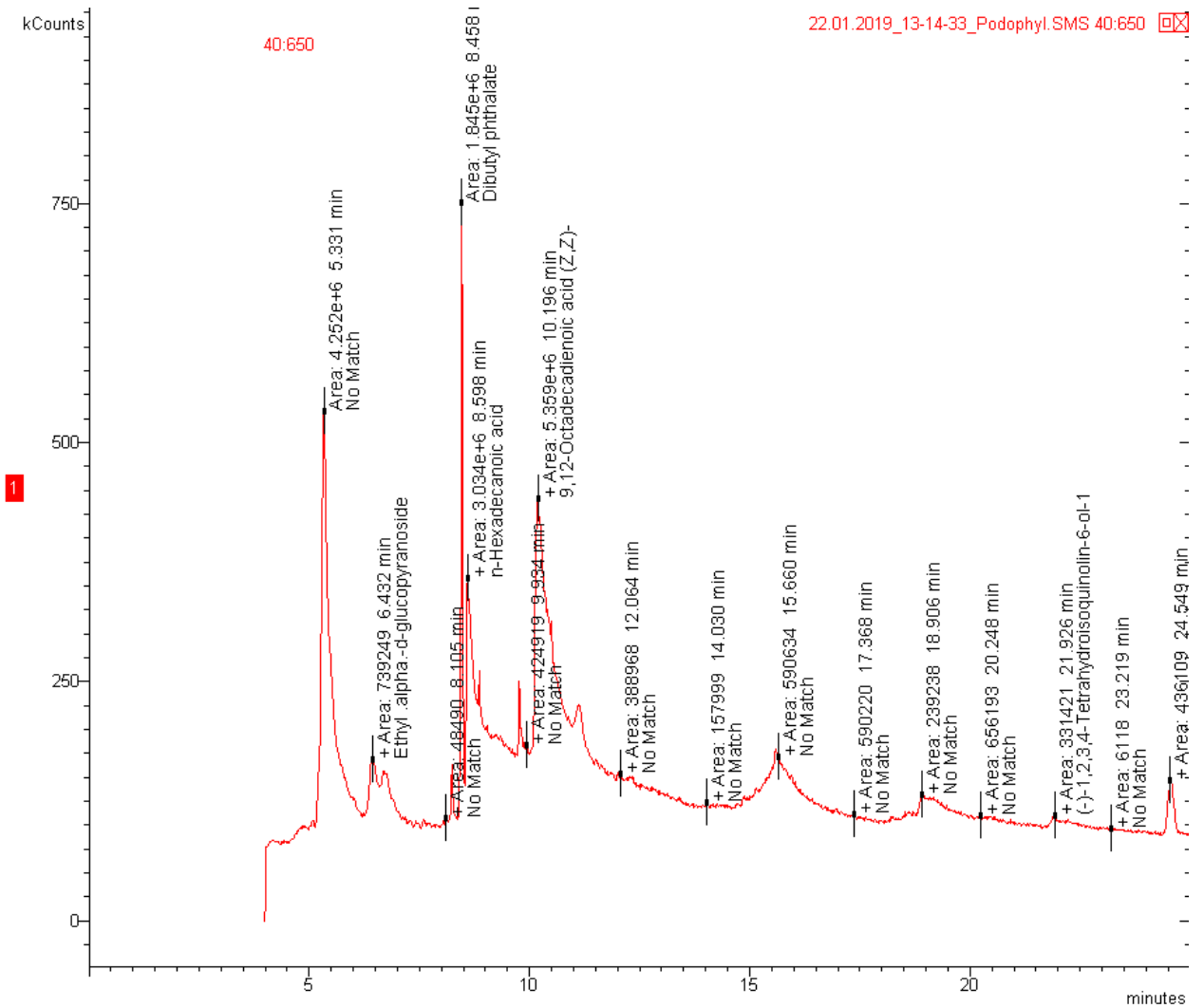
**Нормализованные значения жизнеспособности клеток *HeLa* при  
инкубации в течении 48 и 72 часов с ацетоновыми экстрактами  
суспензионных культур *P. peltatum* L.**

Сырье	Разведение	72 часа		48 часов	
		Спирт 50 %	Спирт 70 %	Спирт 50 %	Спирт 70 %
С.к.к. 28 суток из корня	1:5	91±7 <sup>2</sup>	82±2	НОК <sup>3</sup>	НОК
	1:50	56±1	41±3	НОК	НОК
	1:500	85±3	НОК	НОК	НОК
	1:5000	89±1	НОК	НОК	НОК
С.к.к. 28 суток из почки	1:5	87±4	80±10	НОК	НОК
	1:50	НОК	94±4	НОК	НОК
	1:500	НОК	92±4	93±2	НОК
	1:5000	НОК	НОК	НОК	НОК
С.к.к. 28 суток из плода	1:5	84±5	73±1	НОК	73±4
	1:50	НОК	НОК	НОК	69±8
	1:500	НОК	НОК	НОК	НОК
	1:5000	НОК	НОК	НОК	НОК
С.к.к. 14 суток из корня	1:5	НОК	88±5	НОК	НОК
	1:50	НОК	НОК	НОК	НОК
	1:500	НОК	НОК	80±1	НОК
	1:5000	НОК	НОК	НОК	НОК
С.к.к. 14 суток из почки	1:5	НОК	81±7	НОК	НОК
	1:50	НОК	НОК	НОК	94±2
	1:500	НОК	НОК	83±1	НОК
	1:5000	87±0	НОК	НОК	НОК
С.к.к. 14 суток из плода	1:5	НОК	89±3	НОК	НОК
	1:50	НОК	НОК	77±10	НОК
	1:500	НОК	НОК	70±2	НОК
	1:5000	НОК	НОК	НОК	НОК

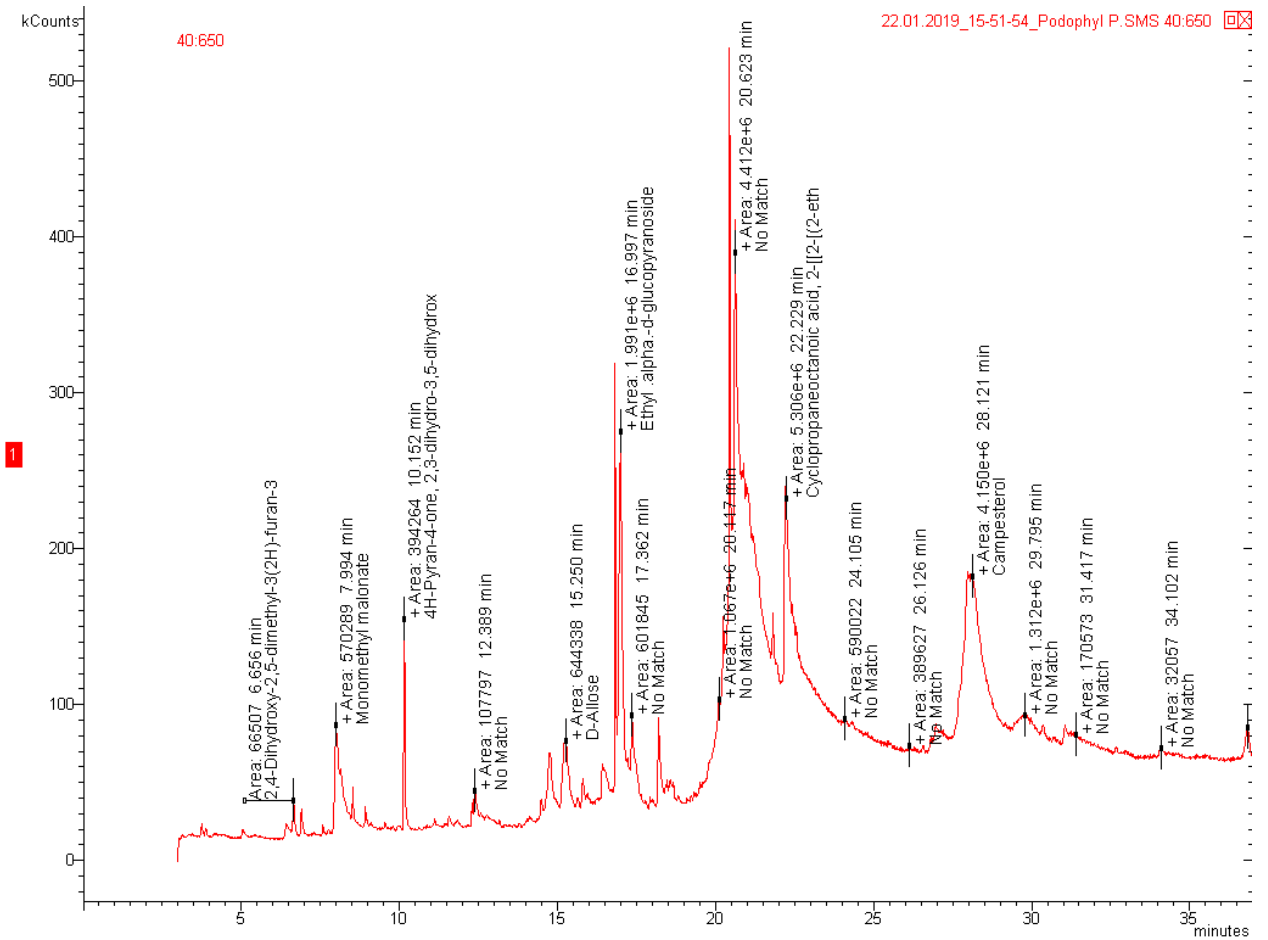
<sup>1</sup>С.к.к. - суспензионная клеточная культура. <sup>2</sup>Есть отличия от отрицательного контроля на уровне значимости  $p \leq 0,05$  во всех ячейках с числами. <sup>3</sup>НОК – нет значимых отличий от отрицательного контроля.

Хроматограммы метанольного экстракта *P. peltatum* L., полученные  
методом ГЖХ-МС

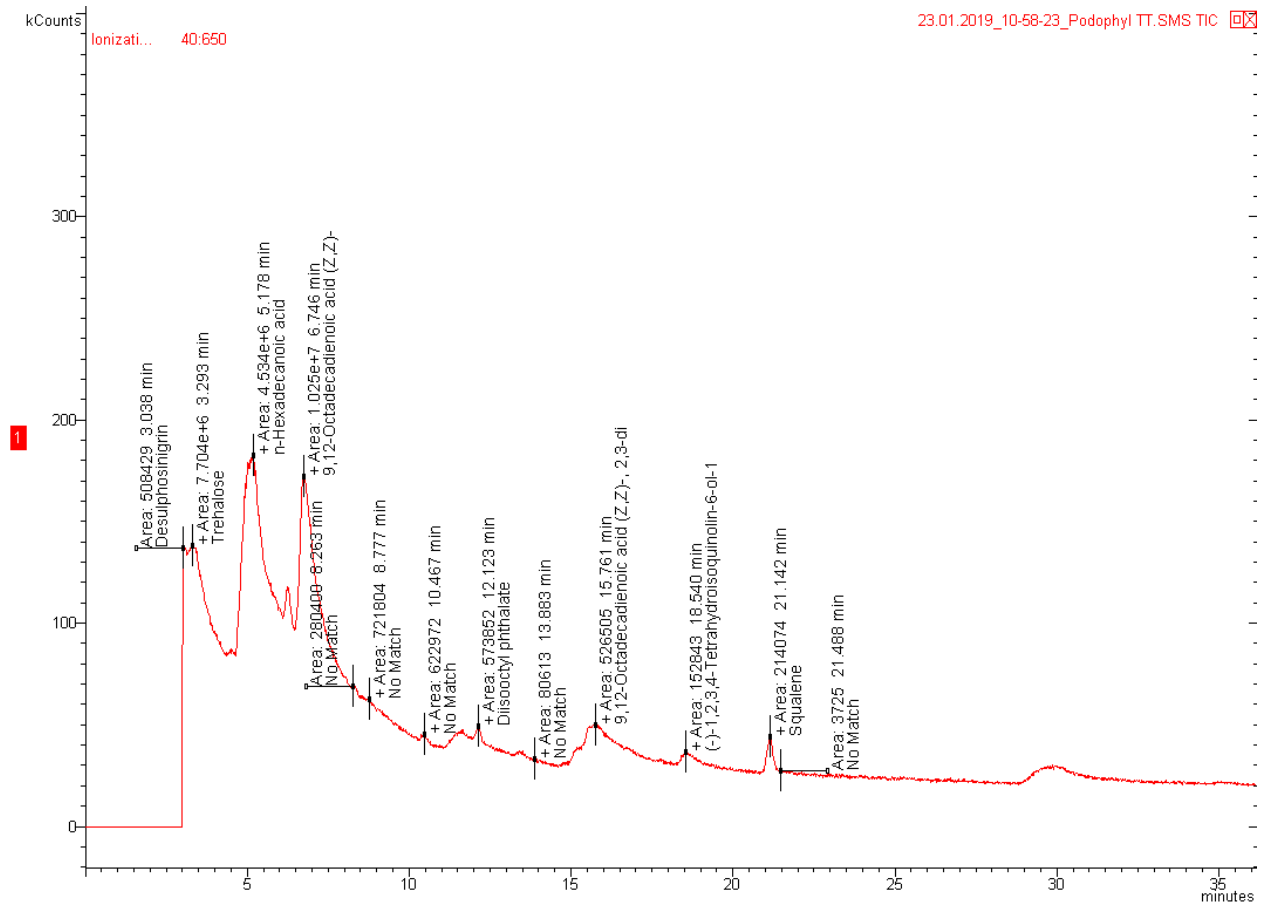
1. Температурная программа колонки: 150 °С 1 мин, нагрев до 240°С со скоростью 10°С/мин, изотерма 240°С – 15 мин (всего 25 мин).



2. Температурная программа колонки: 70 °C - 5 мин, нагрев до 240°C со скоростью 10°C/мин, изотерма 240°C – 15 мин (всего 37 мин).



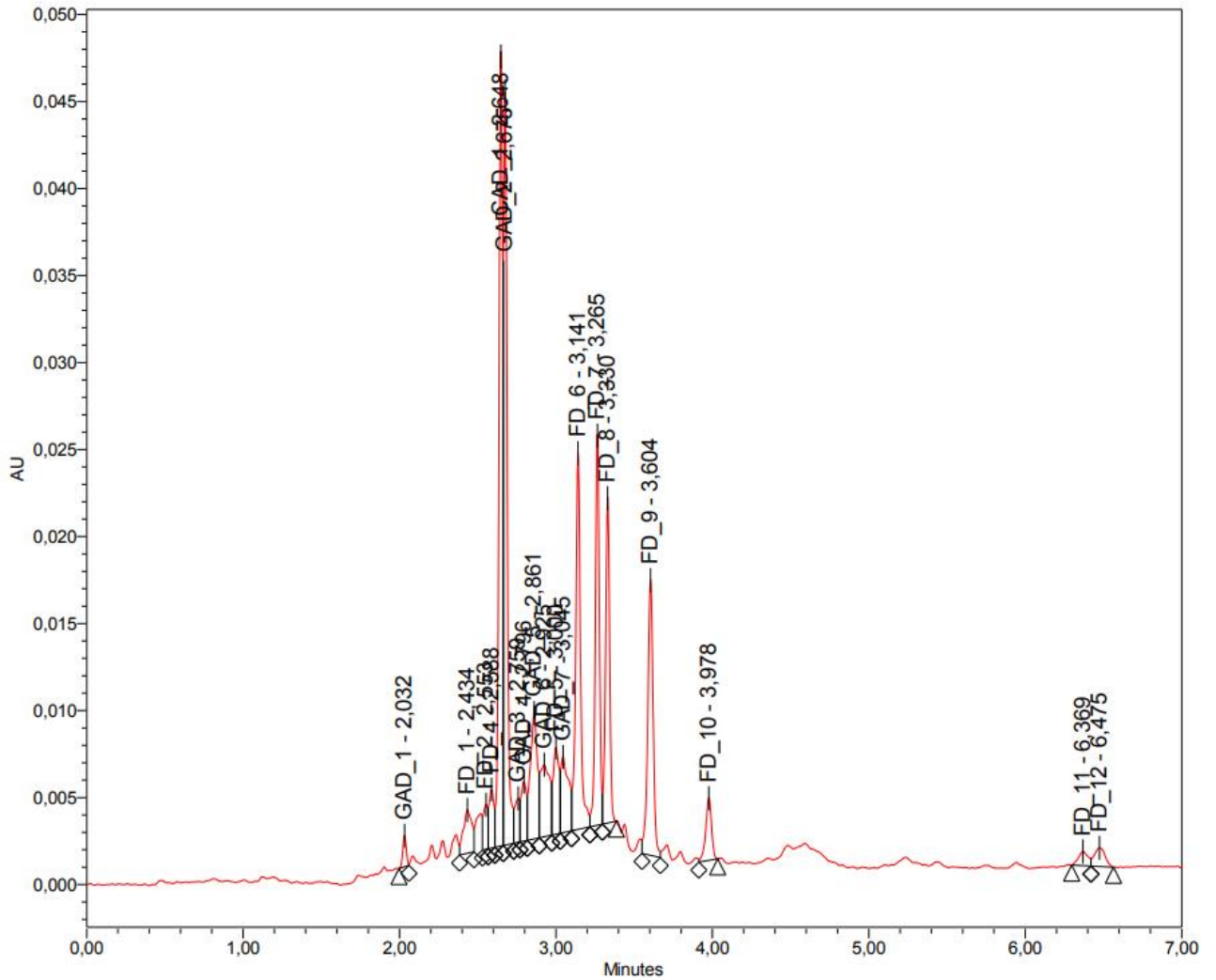
3. Температурная программа колонки: 210 °С - 5 мин, нагрев до 240°С со скоростью 25°С/мин, изотерма 240°С – 30 мин (всего 36,2 мин).



## ПРИЛОЖЕНИЕ 6.

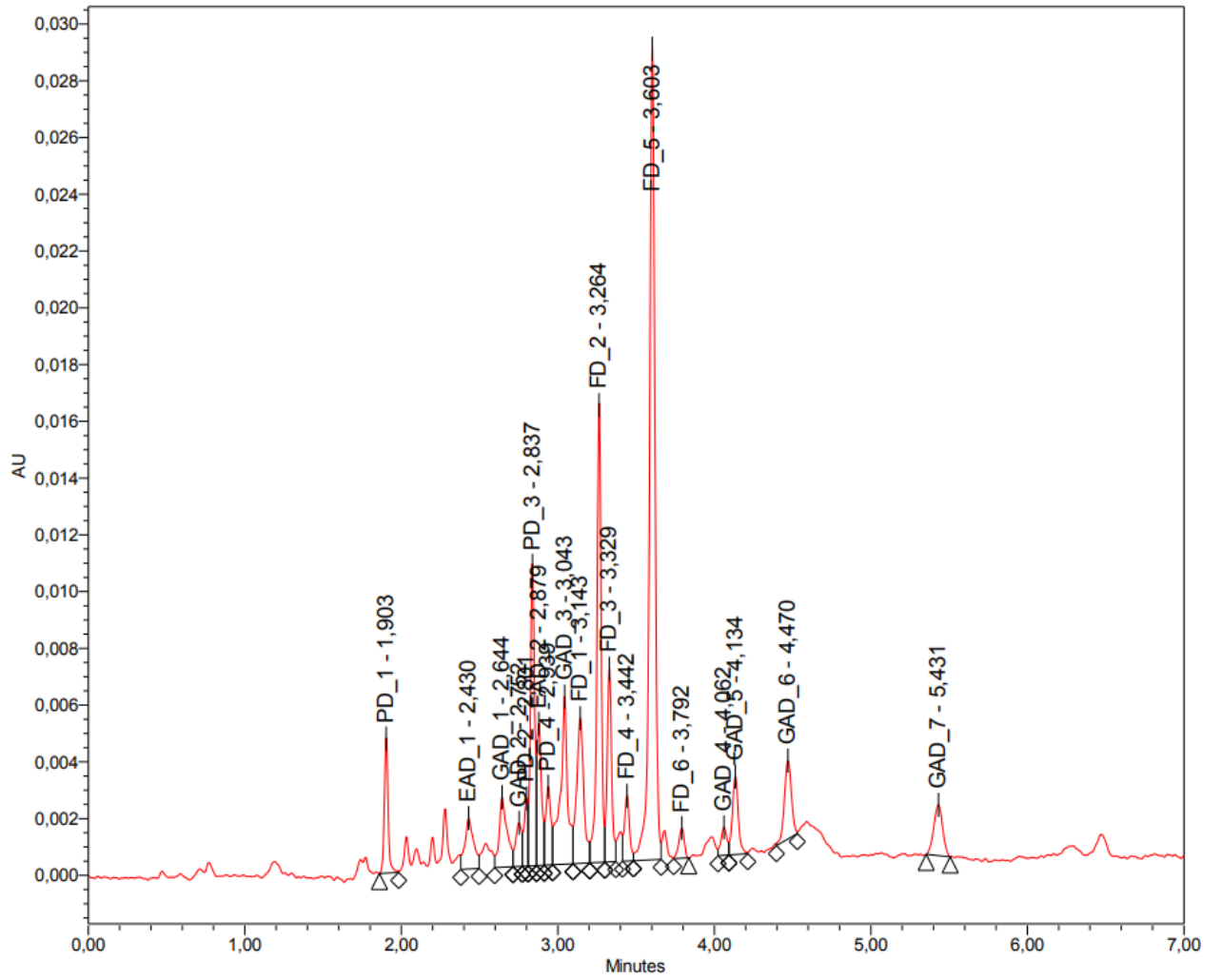
Хроматограммы ацетоновых экстрактов клеточных культур и органов  
растения *P. peltatum* L., полученные методом УЭЖХ

## 1. Листья

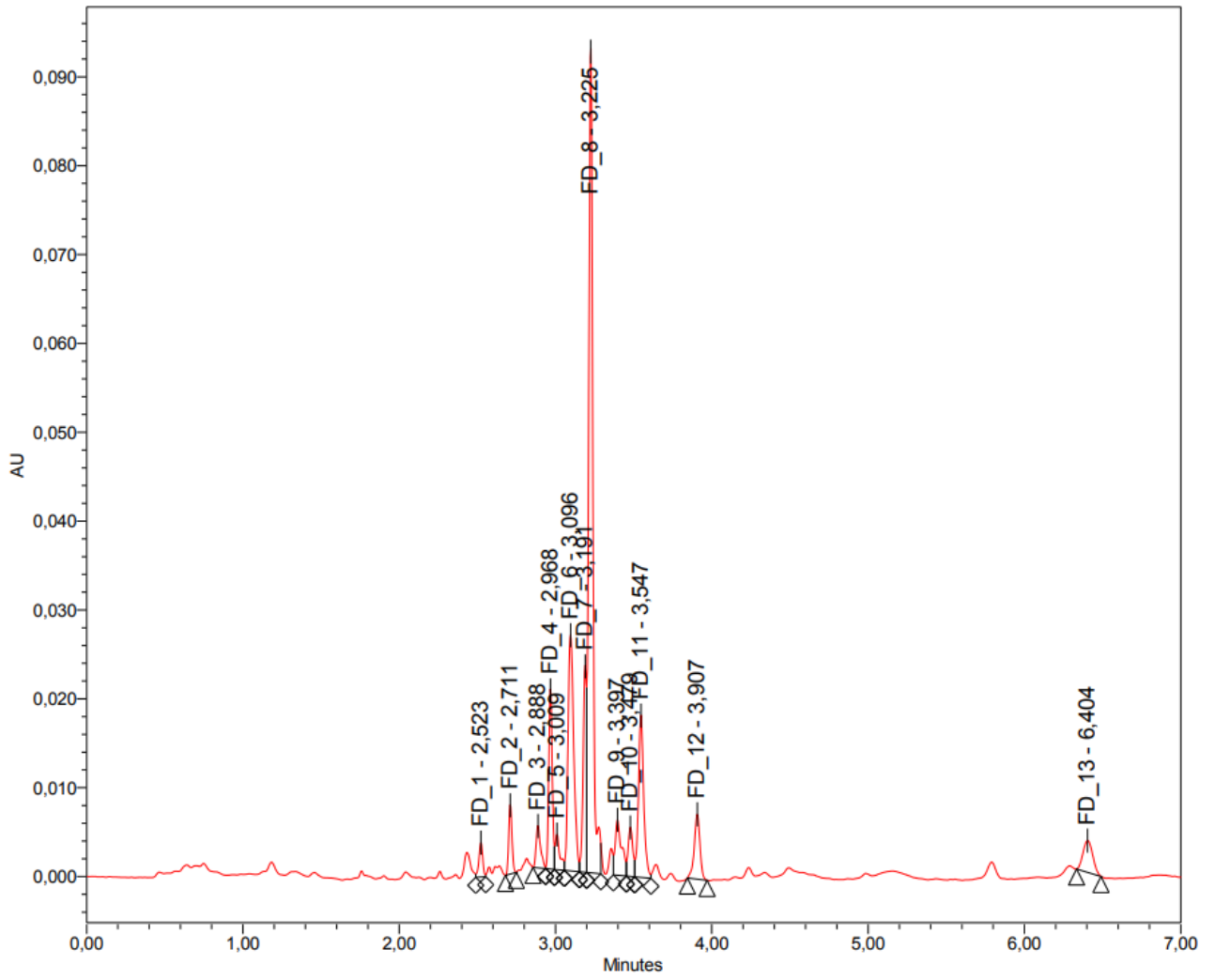




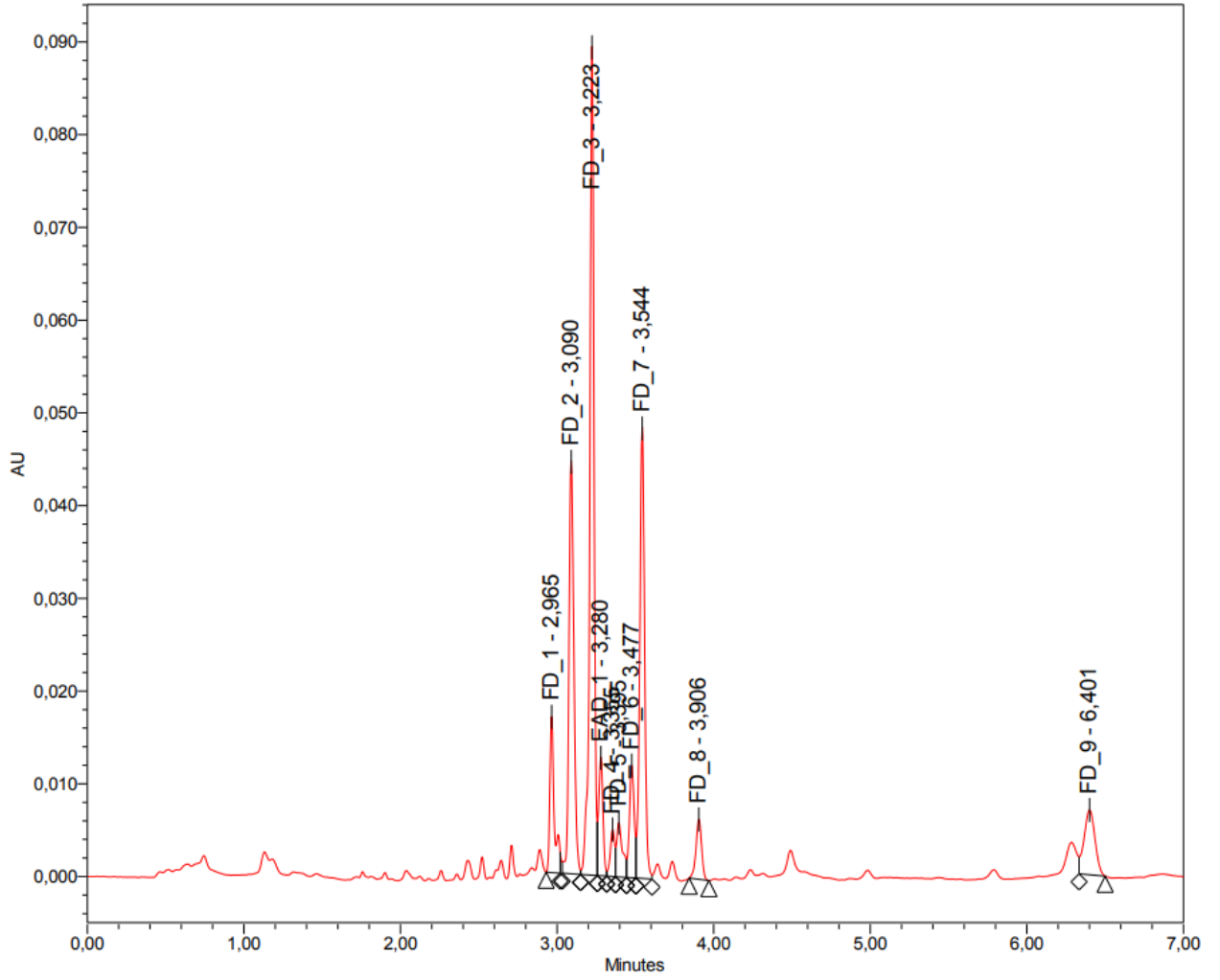
## 2. Корневища с корнями



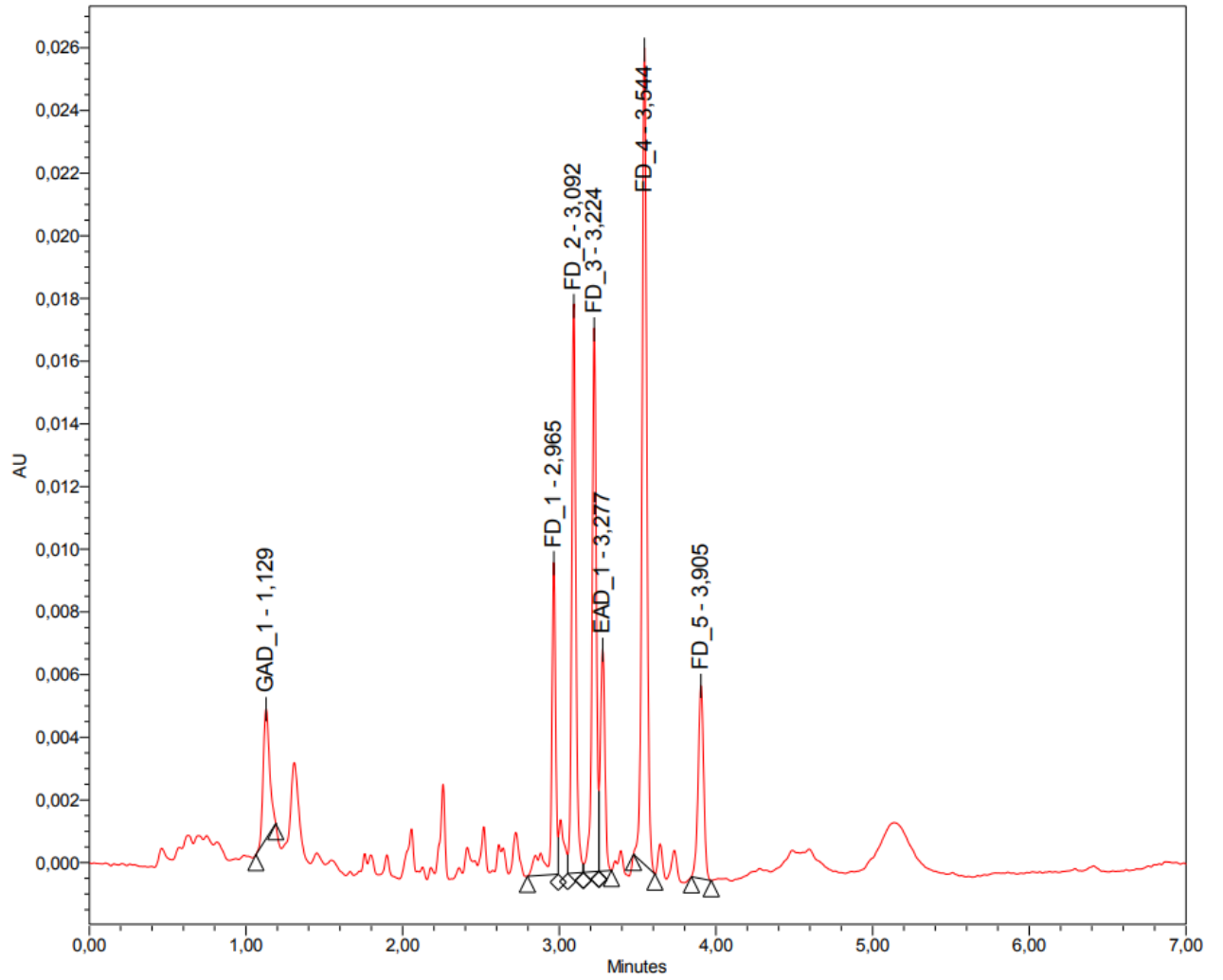
### 3. Каллусная культура, полученная из корня

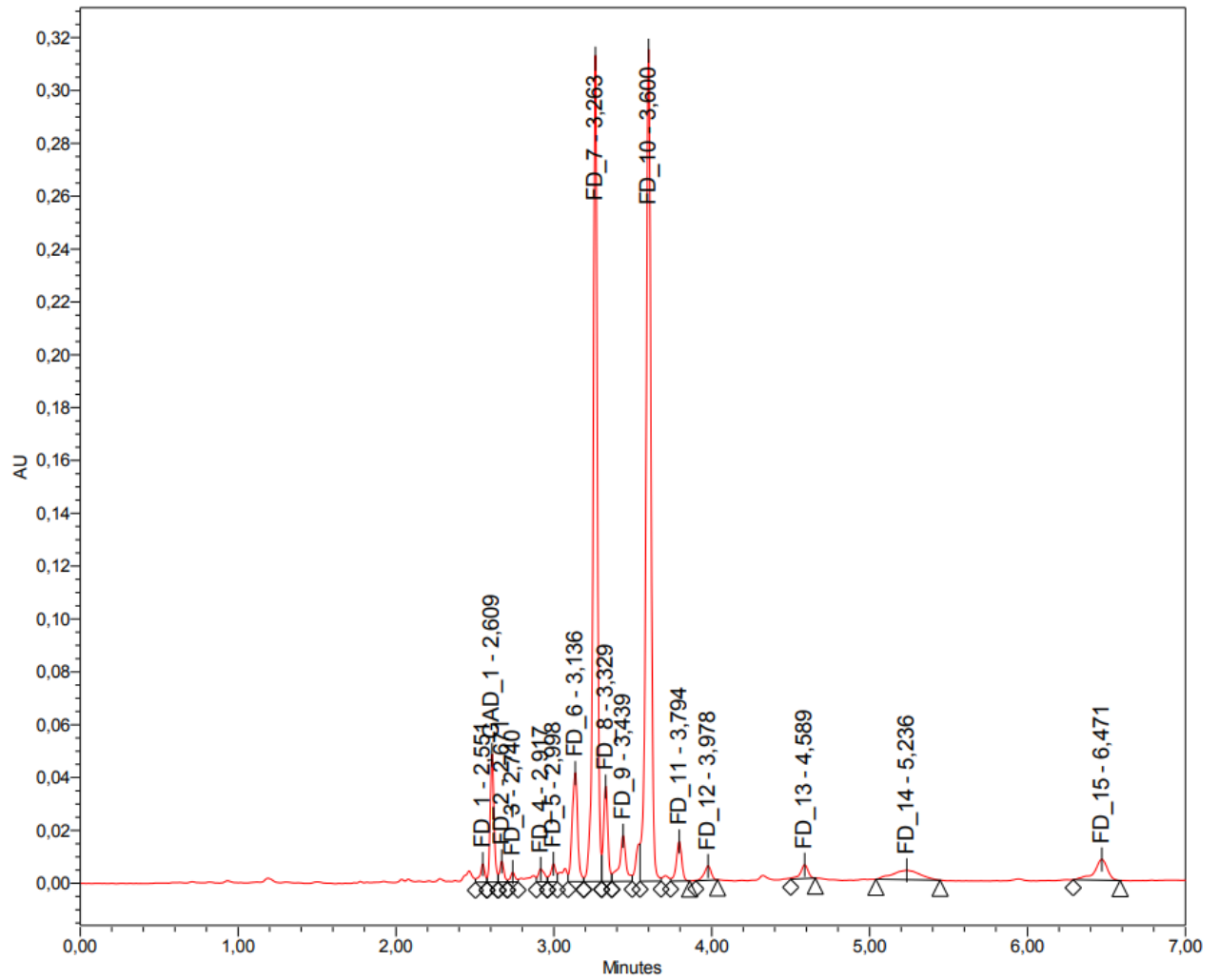


## 4. Каллусная культура, полученная из почки

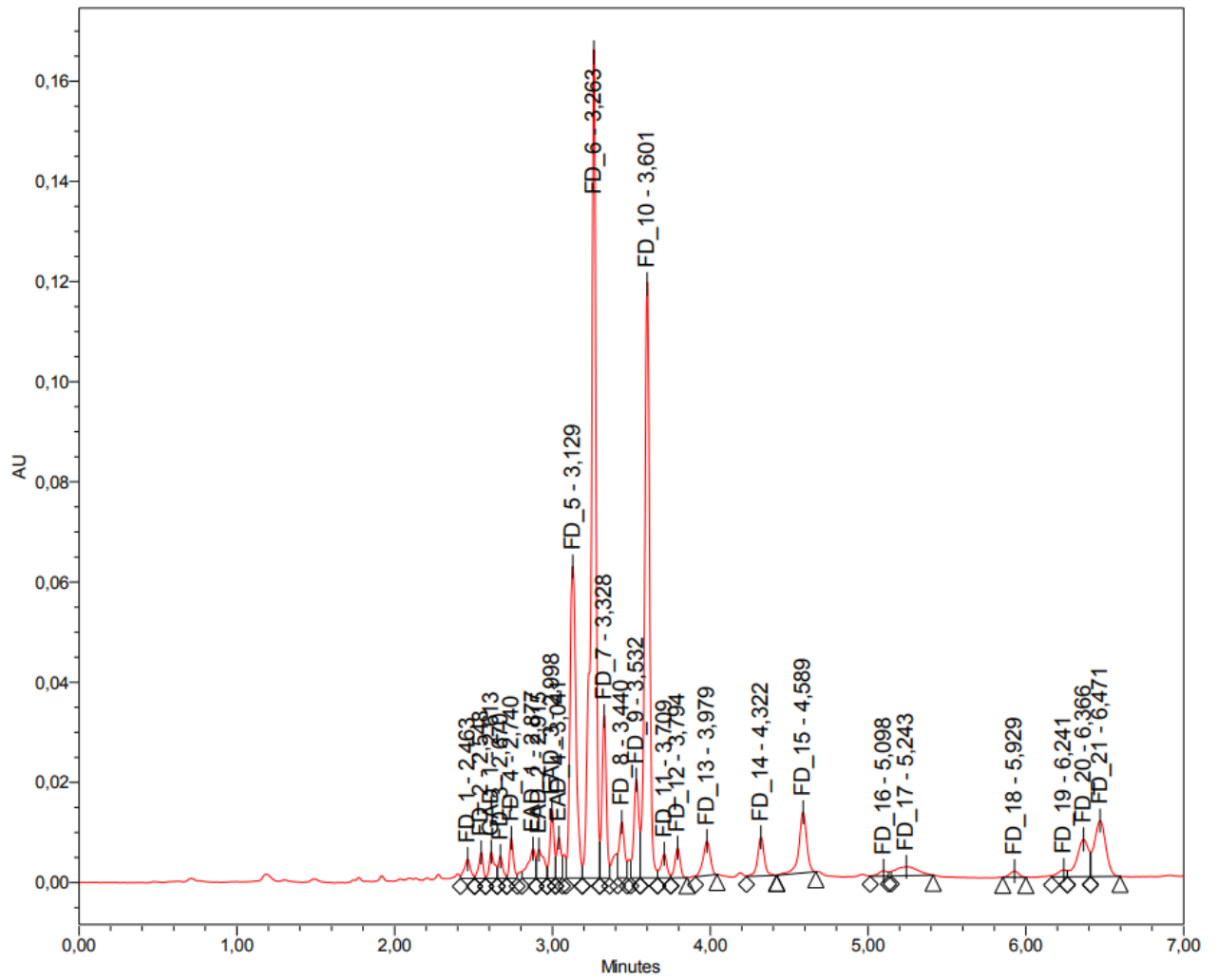


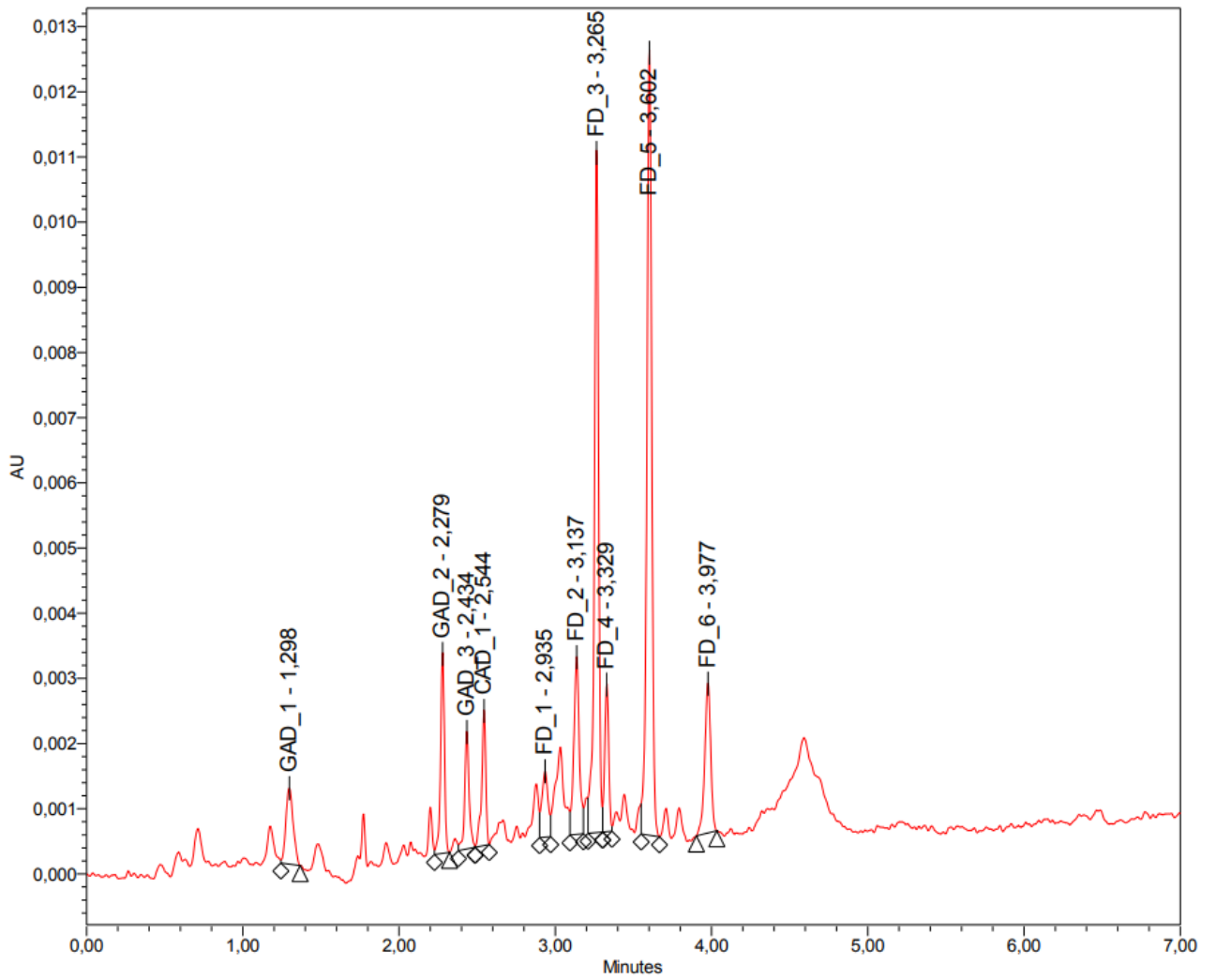
## 5. Каллусная культура, полученная из плода



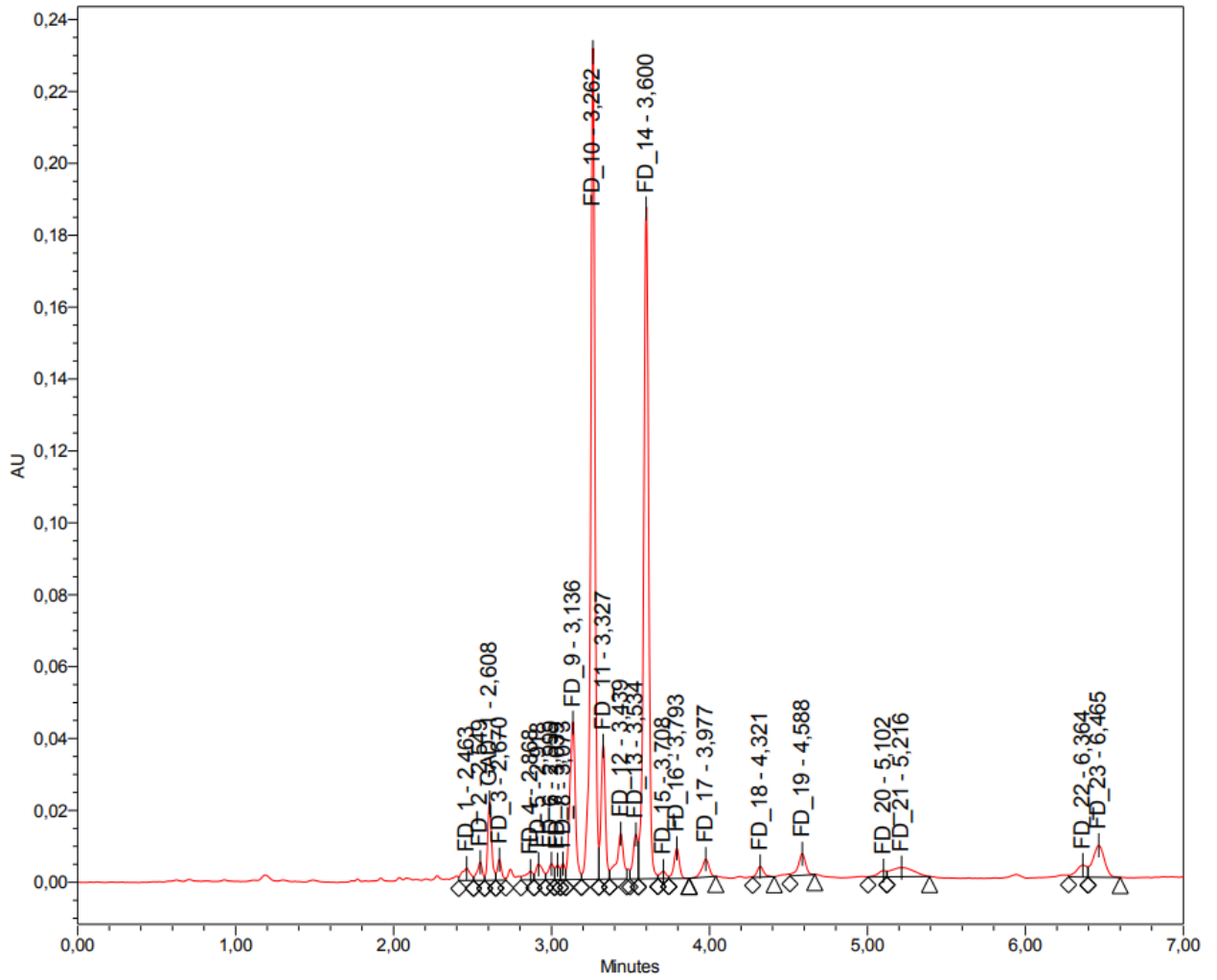
**6.** 14-суточная суспензионная культура, полученная из корня

## 7. 14-суточная суспензионная культура, полученная из почки



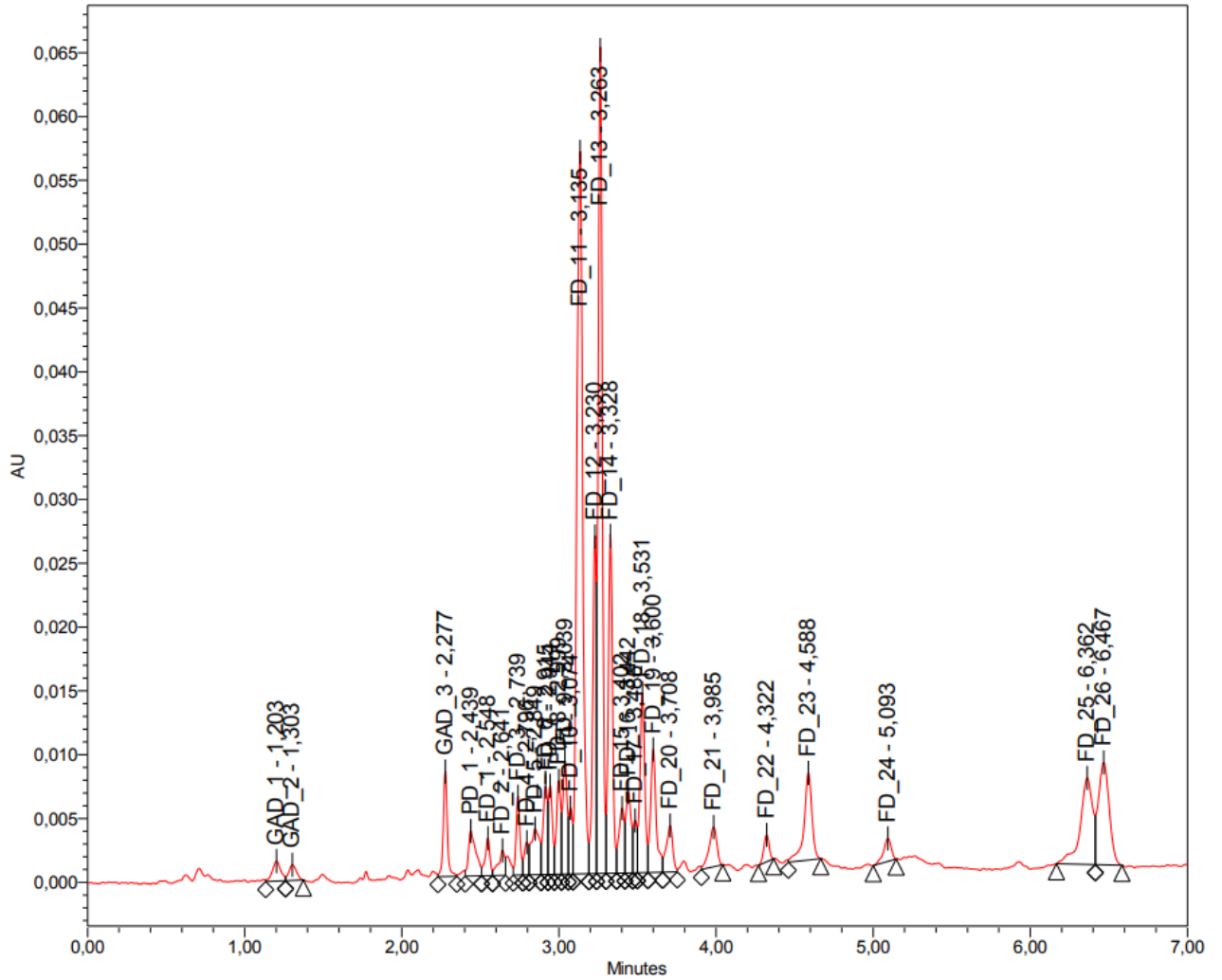
**8.** 14-суточная суспензионная культура, полученная из плода

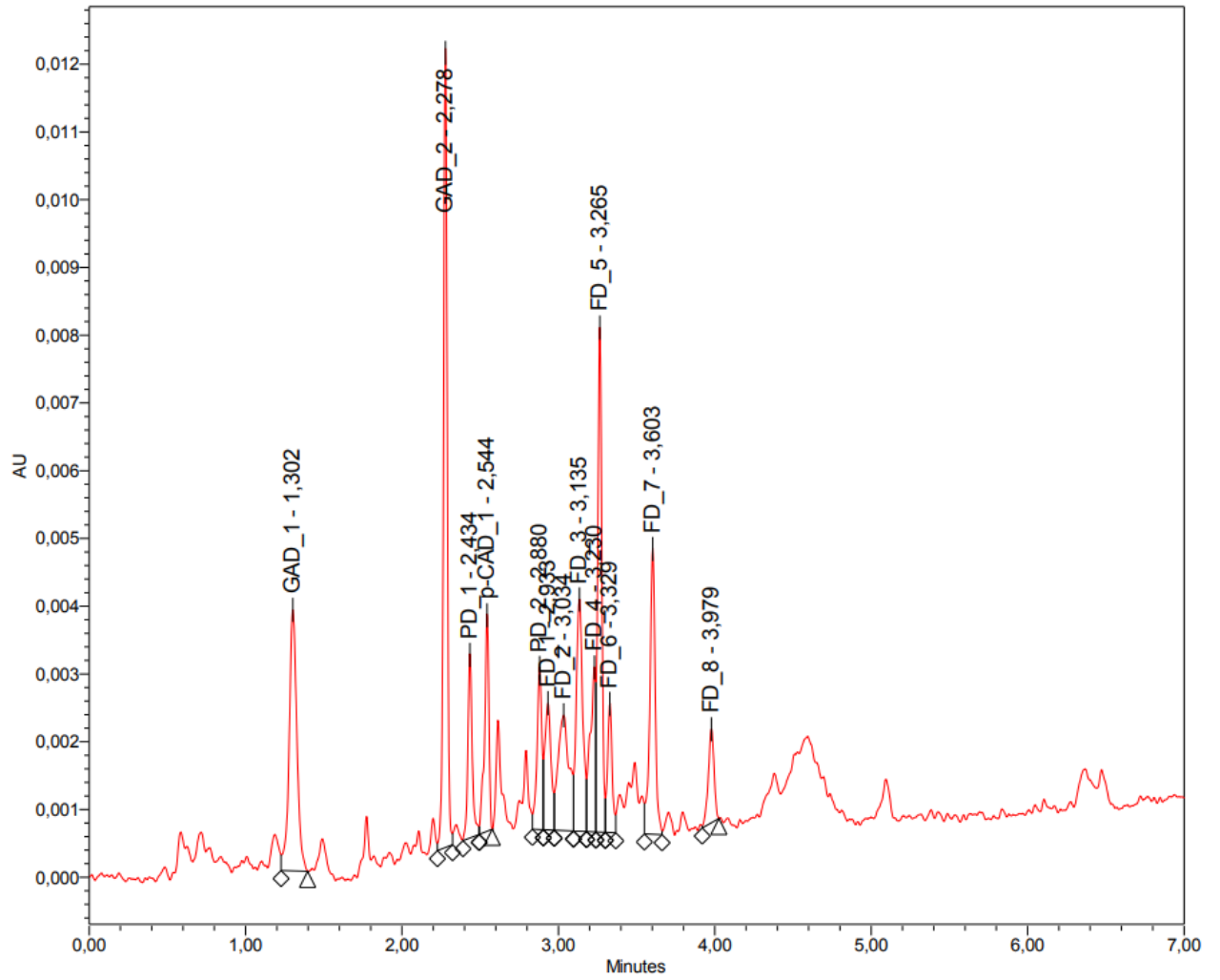
## 9. 28-суточная суспензионная культура, полученная из корня





## 10. 28-суточная суспензионная культура, полученная из почки

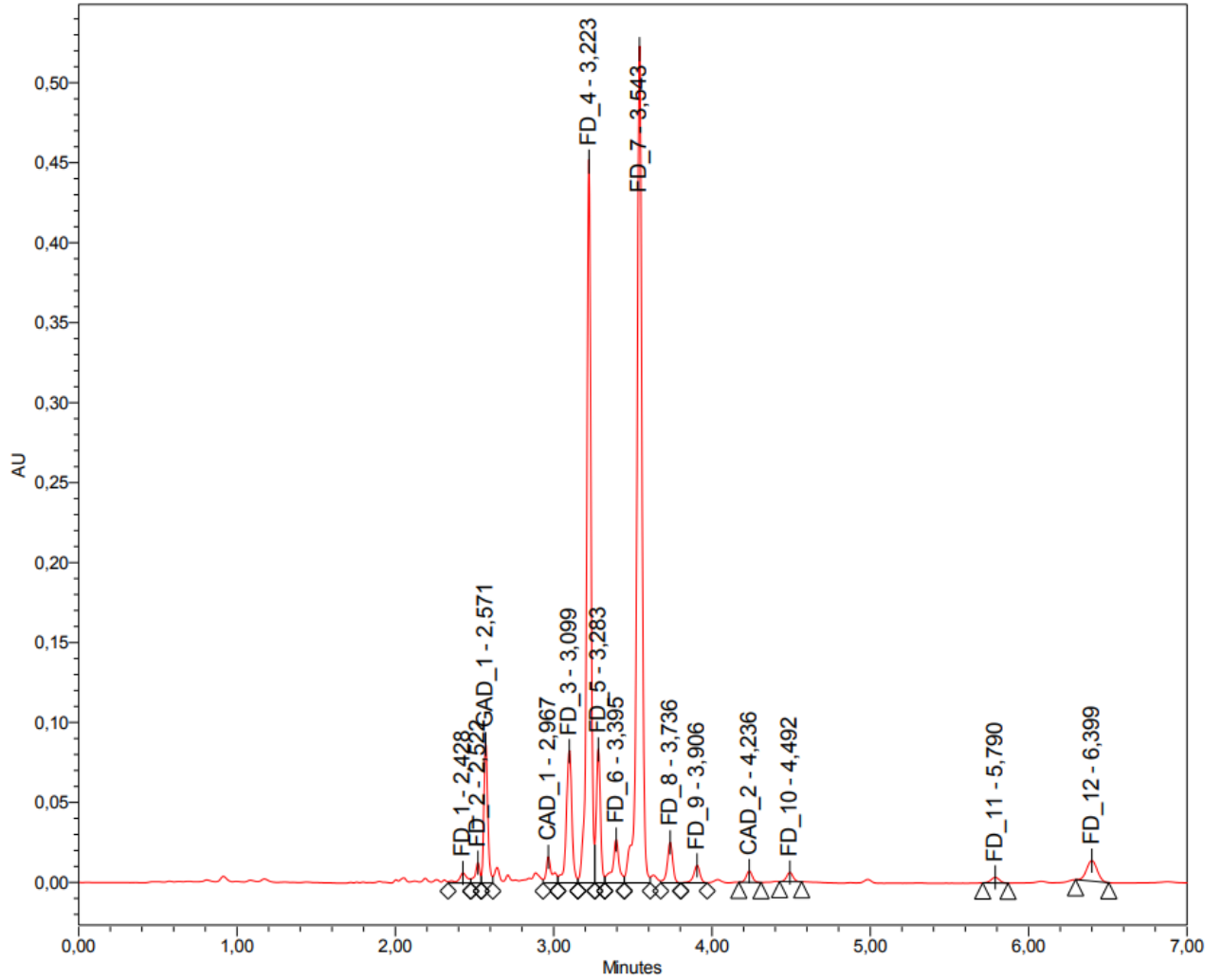


**11. 28-суточная суспензионная культура, полученная из плода**

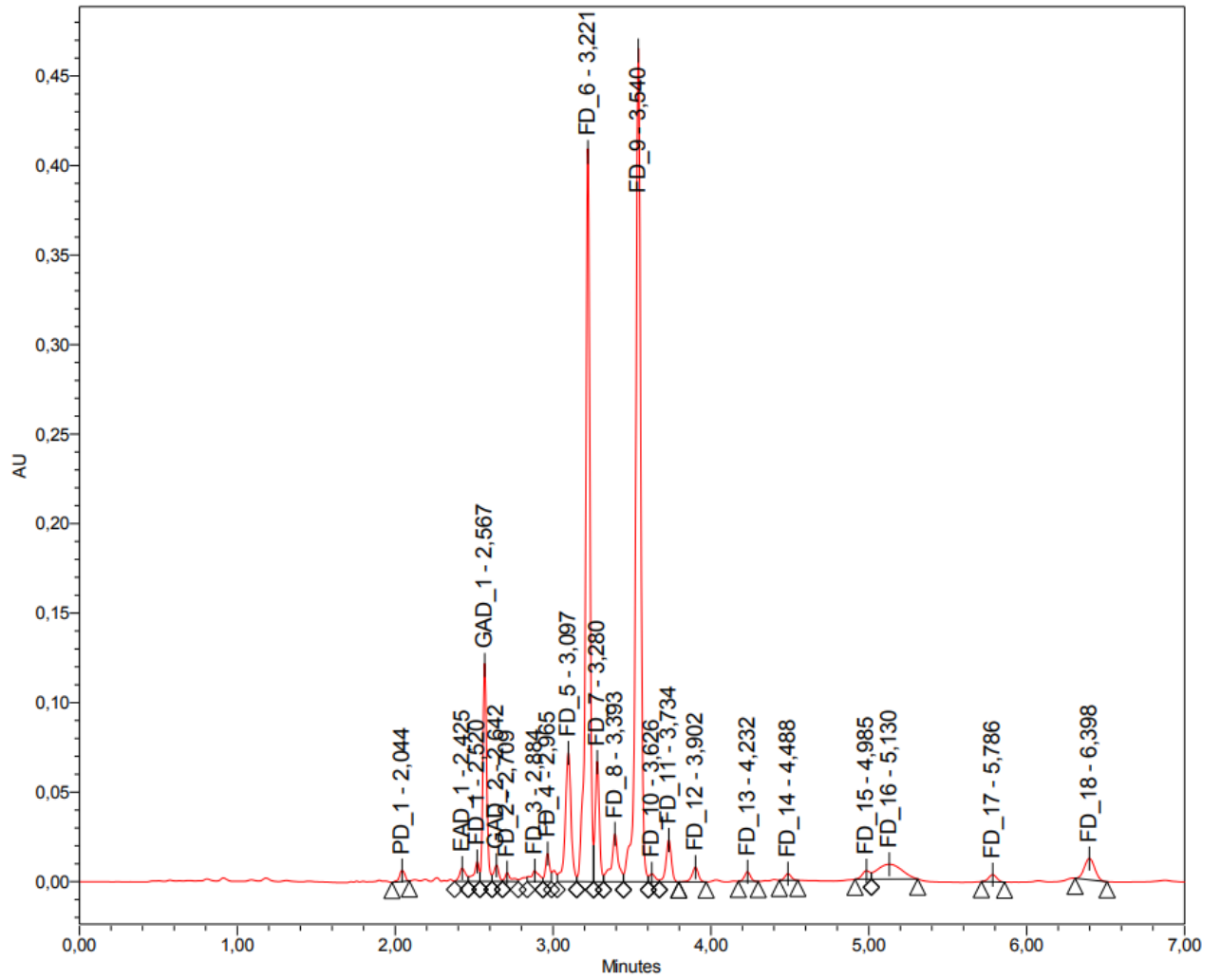
## ПРИЛОЖЕНИЕ 7.

Хроматограммы ацетоновых экстрактов суспензионных культур из корня  
*P. peltatum* L. при разных сроках культивирования,  
полученные методом УЭЖХ

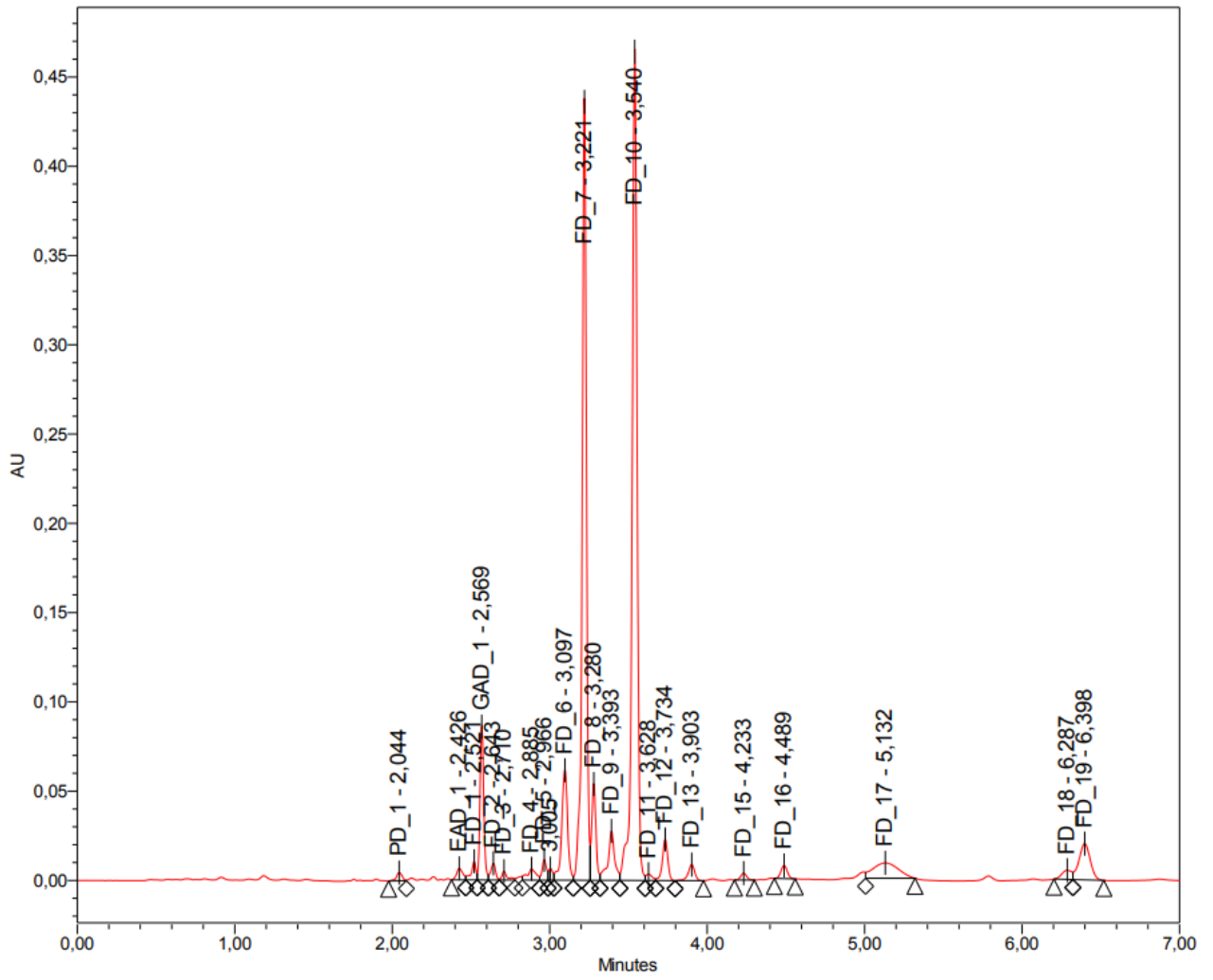
5 суток



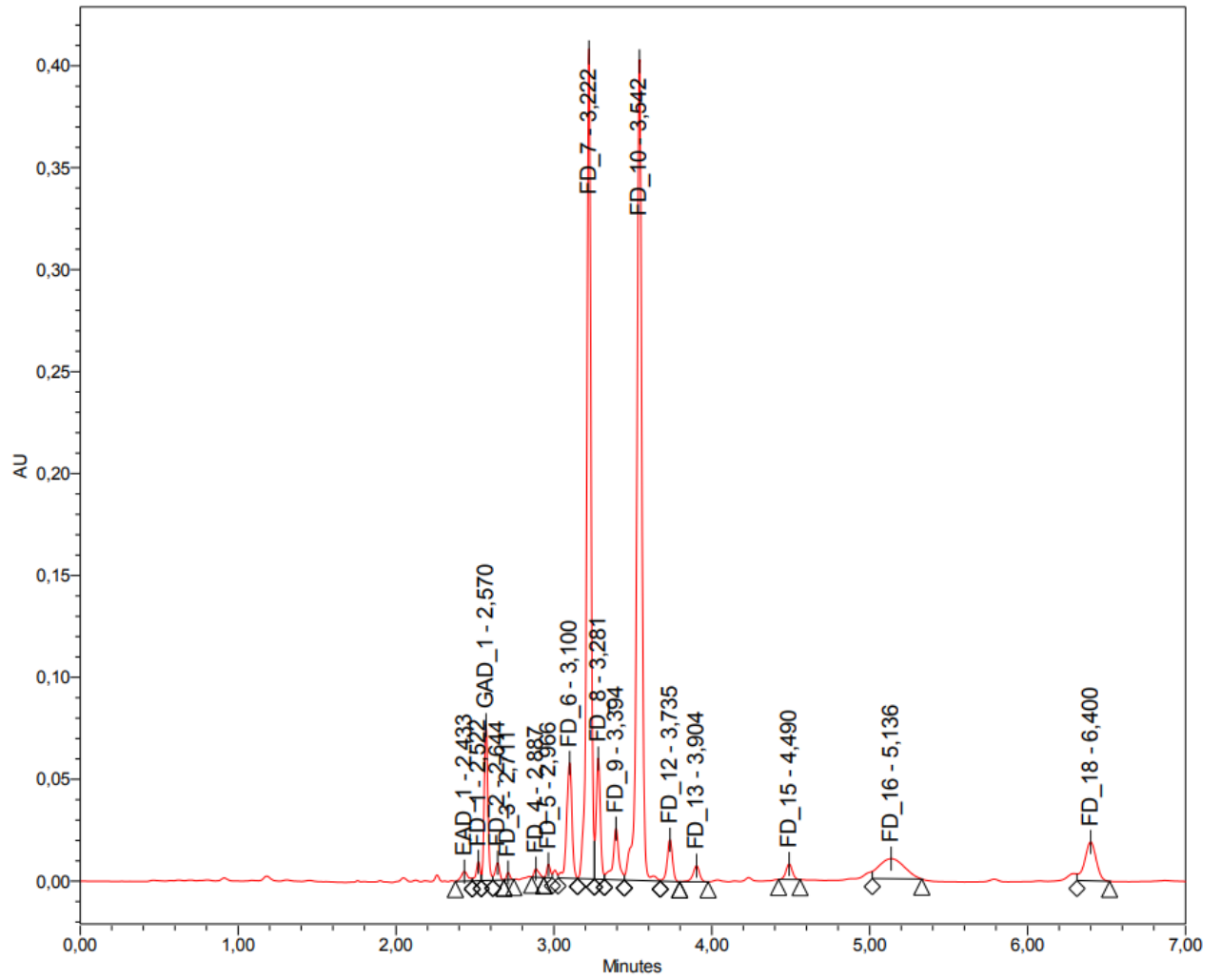
10 суток



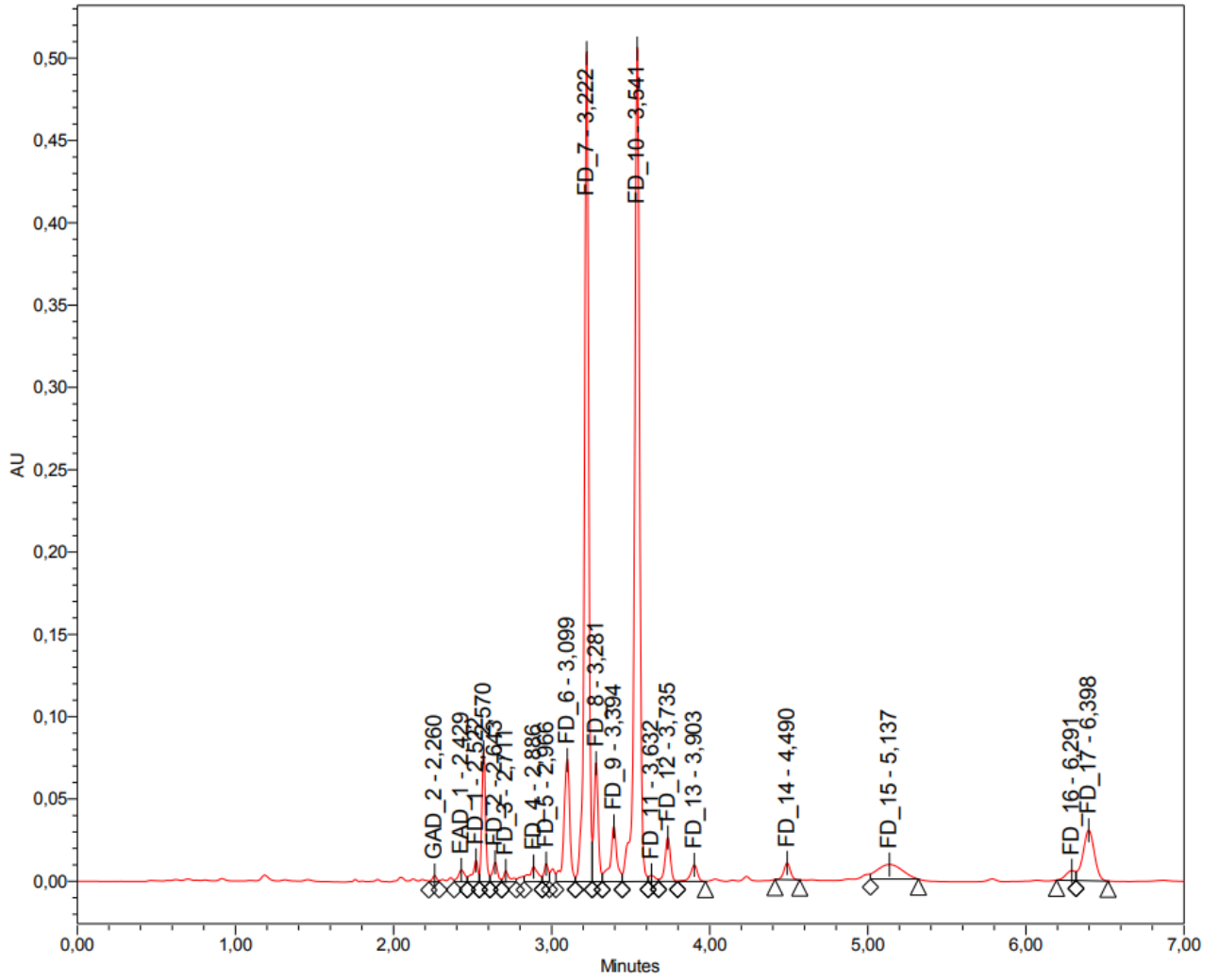
15 суток



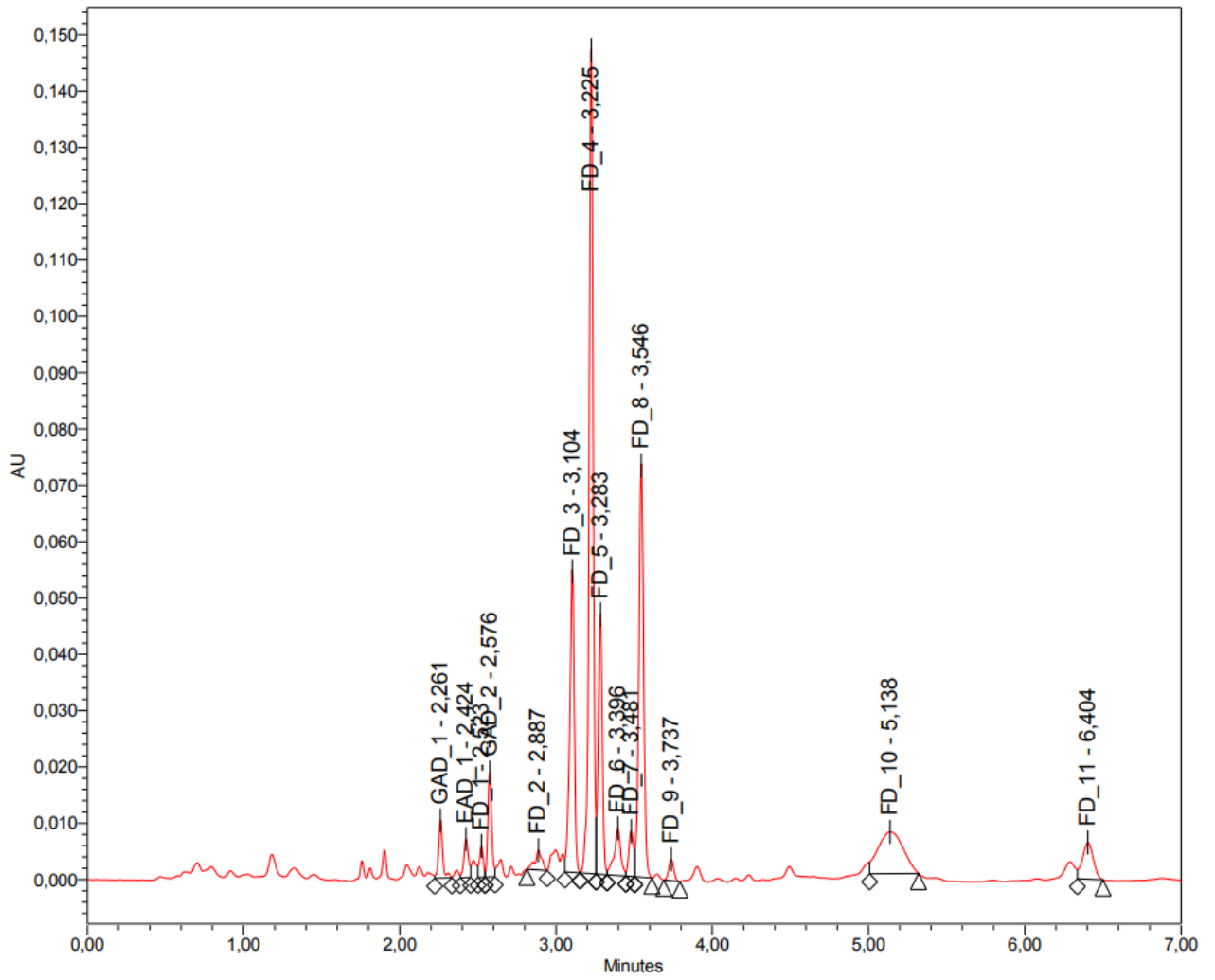
20 суток



25 суток



30 суток





## ПРИЛОЖЕНИЕ 8.

**Относительное содержание фенольных соединений в ацетоновых  
экстрактах суспензионных культур из корня *P. peltatum* L.,  
идентифицированных как минимум при двух сроках культивирования  
методом УЭЖХ\***

Название соединения	Время удерживания	Площадь под кривой при разном сроке культивирования, усл.ед.					
		5 суток	10 суток	15 суток	20 суток	25 суток	30 суток
Производное подофиллотоксина 1	2,044 ± 0,000	0	15314	12129	0	0	0
Производное галловой кислоты 1	2,261 ± 0,001	0	0	0	0	7718	18649
Производное эллаговой кислоты 1	2,427 ± 0,004	0	20271	17628	14277	21214	13763
Производное флавоноидов 1	2,522 ± 0,000	25827	0	0	0	30161	0
Производное флавоноидов 2	2,523 ± 0,001	0	0	0	15884	0	9480
Производное галловой кислоты 2	2,571 ± 0,003	150573	204596	141953	123111	0	31152
Производное флавоноидов 3	2,643 ± 0,001	0	20247	20100	0	26833	0
Производное флавоноидов 4	2,710 ± 0,001	0	13129	11575	0	0	0
Производное флавоноидов 5	2,966 ± 0,001	0	28062	22016	0	20605	0
Производное флавоноидов 6	3,099 ± 0,003	204551	186403	161904	132035	191180	108928
Производное флавоноидов 7	3,222 ± 0,002	844896	793705	826865	752291	946623	267564
Производное флавоноидов 8	3,281 ± 0,001	153388	124762	102701	110602	138474	83851

Производное флавоноидов 9	3,394 ± 0,002	0	0	82029	0	97762	24538
Производное флавоноидов 10	3,542 ± 0,002	1163201	1030527	1030727	895228	1133590	156396
Производное флавоноидов 11	3,627 ± 0,001	0	12261	9960	0	0	0
Производное флавоноидов 12	3,735 ± 0,001	60776	55632	54738	47720	63932	8534
Производное флавоноидов 13	3,903 ± 0,001	0	23210	26137	22731	0	0
Производное флавоноидов 14	4,234 ± 0,002	19104	13926	10055	0	0	0
Производное флавоноидов 15	4,490 ± 0,002	16205	10002	20837	21598	29378	0
Производное флавоноидов 16	5,135 ± 0,003	0	89176	95838	110210	97033	83195
Производное флавоноидов 17	5,788 ± 0,003	12850	14516	0	0	0	0
Производное флавоноидов 18	6,289 ± 0,003	0	0	22410	0	24244	0
Кверцетин	6,400 ± 0,002	59820	54617	101380	97158	155167	31354

\*Содержание основных классов фенольных соединений измеряли полуколичественно, сравнением площадей пиков.