УДК 615. 1/.4 (575.3-25)

ФАРМАКОГНОЗТИЧЕСКИЕ И ФИТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗУЧЕНИЯ И ВОЗДЕЙСТВИЯ ДВУХ ВИДОВ ДЕВЯСИЛА (I. MACROPHYLLA И I. RHIZOCEPHALA) НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ

PHARMACOGNOZYCAL AND FITOCHIMICAL STUDY OF THE MEDICINAL PLANT TO INULA L (I. MACROPHYLLA И I. RHIZOCEPHALA) IN ONCOLOGY

Султонов Рауфджон Азизкулович
кандидат фармацевтических наук,
доцент,
заведующий кафедрой биохимия и медицинской биология,
Хатлонский государственный медицинский университет
raufsultonov@mail.ru

Юсуфи Саломиддин Джаббор
доктор фармацевтических наук,
профессор,
академик НАНТ,
Таджикский государственный медицинский университет
имени Абуали ибн Сино, г. Душанбе

Раджабов Умарали Раджабович
доктор химических наук,
профессор,
профессор кафедры
фармацевтической и токсикологической химии,
Таджикский государственный медицинский университет
имени Абуали ибн Сино, г. Душанбе
umarali55@mail.ru

Наврузова Ганджина Фуркат
кандидат фармацевтических наук,
доцент,
заведующая кафедрой
фармацевтической и токсикологической химии,
Таджикский государственный медицинский университет
имени Абуали ибн Сино, г. Душанбе
ganga-tj@mail.ru

Аннотация. Методом спиновой метки исследовано влияние перекиси водорода на молекулярную структуру лекарственного растения девясила высокого. Показано, что влияние перекиси водорода зависит от объёма его концентрации. В спектрах ЭПР с последовательным увеличением объёма концентрации перекиси водорода происходят уширение линии, то есть сигнал из более расторможенного переходит к заторможённому виду. Установлено, что с ростом спектральных параметров (2A'z – расстояние между внешними экстремумами; ΔH-1 – ширина линий в низком поле; ΔH+1 – ширина линий в высоком поле и ΔH0 – ширина центральной компоненты спектра ЭПР), исследуемых образцов в среде (корень девясила высокий + перекись водорода + нитроксильный радикал) становится: более вязким раствором, а при большом объёме концентрации перекиси водорода (6,0 мл) получается сильный густой раствор и происходят структурные переходы, сопровождающиеся заметным увеличением вращательной диффузии радикала в изученных образцах, которые свидетельствует об увеличении взаимодействия между молекулами и спиновой меткой.

Sultonov Raufdzhon Azizkulovich
Candidate of Pharmaceutical Sciences,
Associate Professor,
Head of the Department of Biochemistry
and Medical Biology,
Khatlon State Medical University
raufsultonov@mail.ru

Yusufi Salomiddin Jabbor
Doctor of Pharmaceutical Sciences,
Professor,
Academician of the National Academy
of Sciences of the Russian Federation,
Tajik State Medical University
named after Abuali ibn Sino, Dushanbe

Radjabov Umarali Radjabovich
Doctor of Chemical Sciences,
Professor,
Professor of the Department of
Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,
Tajik State Medical University
named after Abuali ibn Sino, Dushanbe
umarali55@mail.ru

Navruzova Gandzhina Furkat
Candidate of Pharmaceutical Sciences,
Associate Professor,
Head of the Department of Pharmaceutical
and Toxicological Chemistry,
Tajik State Medical University
named after Abuali ibn Sino, Dushanbe
ganga-tj@mail.ru

Annotation. The spin labeling method was used to study the effect of hydrogen peroxide on the molecular structure of the medicinal plant elecampane. It is shown that the effect of hydrogen peroxide depends on the volume of its concentration. In the EPR spectra, with a sequential increase in the volume of hydrogen peroxide concentration, the line broadens, that is, the signal from a more disinhibited signal goes to a retarded form. It was found that with an increase in the spectral parameters (2A'z is the distance between the external extrema; ΔH-1 is the line width in a low field; ΔH + 1 is the line width in a high field and ΔH0 is the width of the central component of the EPR spectrum), samples in the medium (high elecampane root + hydrogen peroxide + nitroxyl radical) becomes: a more viscous solution, and with a large volume of hydrogen peroxide concentration (6.0 ml), a strong thick solution is obtained and structural transitions occur, accompanied by a noticeable increase in the rotational diffusion of the radical in the studied samples, which indicates an increase in the interaction between molecules and the spin label.

Ключевые слова: молекулярная динамика, спиновая метка, лекарственные растения, девясил высокий, перекись водорода, электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), нитроксильный радикал, тонкослойную хроматографию (ТСХ).

Keywords: molecular dynamics, spin label, medicinal plant, elecampane high, hydrogen peroxide, electron paramagnetic resonance (EPR), nitroxyl radical, chromatograme toncy (ChT).

Актуальность. Лекарственные растения в настоящее время являются ценным средством для лечения и профилактики хронических заболеваний. В то же время преимуществом большинства растений является их малая токсичность. Кроме того, считается, что более эффективными являются те лекарственные растения, которые произрастают в экологически чистых условиях [1,2,3]. Рассматривая вопросы ингибирующего воздействия растительных органов двух видов девясила. Следует особо отметить, что нами приведено описание некоторых видов рода *Inula L.*, произрастающих на южном склоне Гиссарского хребта. Показано, что из 10 видов девясила, представленных во флоре Таджикистана, 6 – встречаются на исследуемой территории.

Целью данной работы является фитохимические изучение ингибирующие воздействия растительных органовдвух видов девясила (*I. MACROPHYLLA И I. RHIZOCEPHALA*) на раковые клетки.

Материал и методы исследования

Работа проводилась на Хатлонский государственный медицинский университет кафедре фармацевтической и токсикологической химии ГОУ «Таджикского государственного медицинского университета имени Абуали ибни Сино», ГУ «Научно-исследовательский фармацевтический центр Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан.

Большинство видов рода девясила имеет лекарственное значение и применяется при лечении различных заболеваний. Растения содержат биологически активные вещества, такие как эфирные масла, органические кислоты, дубильные вещества, полифенолы и другие биологически активные соединения. В связи с этим их широко применяют для лечения таких заболеваний, как нарушение обмена веществ, желтуха, гепатит, язвенная болезнь желудка, судорожный кризис и другие [4, 5, 6]. В работе использовали химические чистые волокна капрона и лавсана, а также высокопрочные и среднепрочные нитки лавсана, обработанные при различных условиях. Модификации волокон проводили по методике. Два вида девясила: девясил крупнолистный и девясил корнеголовой были собраны в южной части Гиссарского района Таджикистана (1800–2300 м над уровнем моря). Собранные материалы высушивали, разрезали и сохраняли для дальнейшего изучения. [7, 8, 9, 10].

Результаты и их обсуждение

Из этих двух образцов были выделены общее количество полифенолов и протестирована их активность в отношении двух типов раковых клеток CT26 (рак толстой кишки) и OVCAR-3. Количество раковых клеток подсчитывали двумя методами: a) Bladesof Malassez и b) анализ и учёт жизнеспособности клеток Real Time-Glo ™ MT. В результате два вида девясила не проявляли никакой активности в отношении раковых клеток OVCAR-3, но проявляли очень высокую активность в отношении раковых клеток CT26. Выделенные полифенолы из девясила крупнолистного и девясила корнеголового могут быть предложены в качестве противораковых средств по отношению к раковым клеткам CT26 для будущего изучения и разработки лекарств.

А) К сухой муке добавляли 70 % раствора этанола в соотношении 100 г на 1 л. Поскольку свет может активировать определенные химические реакции, или может разрушать молекулы вещества, представляющие большой интерес, полученную этанольную суспензию, встряхивали и инкубировали в темноте в течение двух недель;

Б) Пример образца растения после получения экстракта и их центрифугирования.

Тест для определения жизнеспособности раковых клеток. Для изучения противораковой способности экстрактов, которые содержат полифенолы из растений, проводили тест на жизнеспособность изученных линии приминают, отсюда после окультуривания 50105 клеток в течение 3 дней (максимум 24 часа, 48 часов или до 72 часов) следили за их ростом, который зависит от слияния клеток в колбе и добавляли экстракт низкой концентрации. Затем, подсчитывая количество клеток с помощью камеры Molasses, определяли какие экстракты и какие концентрации наиболее эффективны.

Для отрицательного контроля, культуры клеток обрабатывали только этанолом, разведенным в той же культуральной среде, которую использовали для приготовления экстрактов разной концентрации.

Данный опыт подтвердил, что наблюдаемые эффекты не связаны с этанолом (используемым для экстракции), а с активными молекулами (т.е. полифенолами). В случаях положительного контроля поступили как указано выше, но с M2YN.

Подсчет клеток. Для подсчета раковых клеток использовали два метода: **Метод I: камера Меласса**. После инкубации раковых клеток в культуральной среде и в присутствии тестируемого экстракта, подсчитывают количество клетки через 24,48 и 72 часов. При этом, следует восстанавливать прилипшие клетки, используя фермент трипсин (для отделения клеток от подложки). Для этого инку-

бируют клетки с ферментом трипсином в течение двух минут при 37 °C, а затем, блокируя ферментативную активность, добавляя в культуральную среду бычью сыворотку. Далее, надо извлекать колбу, где находятся клетки, и помещать все центрифугу в течение 10 минут при 1200 об/мин. После центрифугирования в осадке считают количество клеток.

Метод 1. Для подсчета используют лезвия Меласса, которые состоят изстеклянного предметного стекла, на котором выгравирована решетка с 25 квадратами, вмещающими в себя 20 маленьких квадратов. Для подсчета клетки наносят 10 мкл суспензии клеток на лезвие Меласса и считают количество клеток в 10 прямоугольниках. Объем прямоугольника равен 0,01 мкл, а с учетом 10 прямоугольников результат достаточно умножить на 104, чтобы получить количество клеток на 1 мл.

Экстракт надо разбавить 1/500 культуральной средой, соответственно линиям раковых клеток. Затем разбавленный экстракт будет добавлен флангу, где инкубируются клетки.

Инкубация проводится при 37 °C, 5 % CO_2 и влажности выше 80 %. Рост клеток контролируют в течение 24 часов, 48 часов и 72 часов. Фотографии с увеличением (× 4, × 20, × 40) делаются в каждый обнаруженный момент времени. Наблюдается клеточная морфология, и клетки сначала будут подсчитываться с помощью камеры Мелассе.

B-2 взять в качестве примера квадрата и всегда под микроскопом видно, что в квадрате представлено 17 клеток. Чтобы получить хороший результат, требуется изучать около десяти квадратов. Ячейки окружены зеленым, на внешних сторонах квадрата. Ведь для этого метода необходимо исключить две внешние стороны квадрата, и также сознательно решено не считать клетки, присутствующие на нижней и левой сторонах.

Метод 2: Анализ жизнеспособности клеток: Real Time-Glo ™ Cell Viability. Если после первого подсчета обнаружены некоторые многообещающие результаты, то следует использовать Real-time-Glow ™ Cell Viability Assay MT для анализа жизнеспособности клеток. Этот комплект, используемый в лаборатории, может подтвердить полученные результаты. Преимущество этого комплекта заключается в том, что можно напрямую использовать его на полученных посевах, даже не стирая его. Набор состоит из субстрата (субстрата жизнеспособных клеток Real-time-Glow ™ Cell Viability Assay MT), способного пересекать клеточные мембраны без индукции повреждения и фермента, который не может пересекать клеточные мембраны. Субстрат жизнеспособности MT клеток будет превращен в субстрат NanoLuc в живых клетках. После снижения он может выходить из клеток и поддерживаться люцифераза Nano Luc, где данная реакция испускает свет (излучение), (Флуоресценция). Флуоресценция пропорциональна количеству живых клеток в культуре. Он определяется и количественно устанавливается считывателем планшетов.

А) Диаграмма, показывающая режим действия комплекта, где мертвые клетки не могут уменьшить субстрат жизнеспособности клеток MT, поэтому нет флуоресценции;

Б) Схема, показывающая протокол (результатов): после запуска реакции с Real-time-Glow ™ CellViabilityAssay MT, инкубируют образцы при 37 °C.

Расчет индекса выживаемости: после каждого теста на выживание следует рассчитывать процент выживания каждой клеточной линии в соответствии с каждым экстрактом и каждой дозой (концентрациями). Процент выживания позволит классифицировать каждый вариант экстрактов в порядке эффективности, отсюда экстракт с наименьшим процентом выживания является наиболее эффективным, и он, конечно, зависит от клеточной линии. Действительно, один вариант экстракта может быть более эффективным для одного типа рака, чем другой.

А) Диаграмма, показывающая режим действия комплекта, где мертвые клетки не могут уменьшить субстрат жизнеспособности клеток MT, поэтому нет флуоресценция;

Б) Схема, показывающая протокол (результатов): после запуска реакции с Real-time-Glow ™ Cell ViabilityAssay MT, инкубируют образцы при 37 °C. После каждого теста на выживание следует рассчитывать процент выживания каждой клеточной линии в соответствии с каждым экстрактом и каждой дозой (концентрациями). Процент выживания позволит классифицировать каждый вариант экстрактов в порядке эффективности, отсюда экстракт с наименьшим процентом выживания является наиболее эффективным, и он, конечно, зависит от клеточной линии. Действительно, один вариант экстракта может быть более эффективным для одного типа рака, чем другой.

Для достижения ТСХ неподвижной фазой используют лист кремнезема. В качестве элюента будет использоваться смесь растворителей. На диаграмме есть красные и зелено-синие точки, которые соответствуют различным составляющим исходного отложения, где представлены черным цветом.

h: расстояние между линией депозита и пятном;

H: расстояние между линией депозита и линией фронта.

Листы ТСХ будут помещены под УФ-лампой, чтобы выявить положение пятен. Фронтальное отношение (Rf) представляет собой отношение h (расстояние линии осаждения – пятно) к H (расстояние линии осаждения – фронт растворителя), которое измеряется с помощью градуированной линейки. Оно находится в диапазоне от 0 до 1 и является характеристикой соединения, которое мигрирует. Rf для каждого пятна получается из следующего соотношения:

Rf = (расстояние между линией отложений и пятном), (расстояние между линией отложений и фронтом миграции) = h / H.

Как только Rf будет определен для каждой точки каждой части каждого растения, надо перегруппировать растения в соответствии с миграционным профилем полученных из них экстрактов. После экстракции полифенолов следуют проводить тонкослойную хроматографию (ТСХ), чтобы выделить общий профиль миграции между растениями. Таким образом, станет возможным сгруппировать растения в соответствии с профилем их миграции. Зная, что миграционный профиль характерен для мигрирующих соединений, удаётся косвенно ранжировать растения по их составу.

Презентация техники. ТСХ рассматривается как метод, который позволяет разделить и выделить компоненты смеси. Принцип этого метода основан на избирательном распределении разделяемых компонентов между двумя фазами: подвижной фазой (элюент) и неподвижной фазой. Компоненты разделяются в зависимости от природы подвижной фазы, природы неподвижной фазы, физико-химических свойств разделяемых компонентов.

Подвижная фаза должна быть растворима в экстрактах, которые нужно разделить, поскольку полифенолы представляют собой неполярные молекулы, поэтому следует выбирать элюат с низкой полярностью, такой как толуол. Таким образом, благодаря капиллярности, различные компоненты будут мигрировать и распределяться вдоль стационарной фазы. После сушки на открытом воздухе листья помещают под УФ-лампу, чтобы выявить расположение пятен. Силикагель 60 F254 выглядит прозрачным в УФ-излучении, поэтому любые мигрировавшие соединения выглядят как темные пятна на светлом фоне.

Графическое изображение воздействия спиртового экстракта полифенолов девясила (мг/мл) на культуральные клетки (CT26), в зависимости от концентрации действующих веществ и температуры.

График воздействия спирторастворяемых экстрактов мг/мл девясила на рост культуральной клетки OVCAR-3, в зависимости от концентрации полифенолов и температуры. Конкретизация полученных результатов в виде двух графиков, относящихся к росту раковых клеток в культуральной среде в зависимости от концентрации спиртового экстракта полифенолов мг/мл, выделенных из надземных органов девясила и от температуры, явно показали, что один из изученных экстрактов в действительности сильно задерживает рост и размножение клеток Ст26 (Рак COLON) в концентрации 0.5 и 0.25 мг/мл. Однако, эти изученные экстракты в низких концентрациях, хотя не так сильно, но не задерживали рост и размножение клеток OVCAR-3. В целом, экспериментально показано, что полифенолы, выделенные из растения девясила, избирательно, противодействуют на раковыеклетки Ст26, но суменьшением их концентрации или принизкой концентрации (т.е. выше 0.125 мг/мл), мало влияют на их ростовые процессы.

Таким образом, полученные результаты анализа свидетельствуют о противораковом воздействии полифенолов девясила, и их можно использовать при раковых болезнях.

Список литературы:

1. Фитохимические и фармакологические свойства лекарственных растений из Узбекистана // Журнал лекарственных растений. – 2017. – Т. 5. – Вып. 2. – С. 76–82.
2. Флора Таджикской ССР. – Л. : Наука, 1986. – Т. 9. – 434 с.
3. Хаджиматов М. Дикорастущие лекарственные растения Таджикистана. – Душанбе : Маориф, 1989. – С. 288–290.
4. Шагиахметов Ю.С. Фармакологическая характеристика препаратов растений рода Inula и их применение в ветеринарной медицине : автореферат дис. ... доктора ветеринарных наук. – Троицк, 2000. – 35 с.
5. Основные полезные дикорастущие растения флоры Таджикистана / А.Ш. Шукуров [и др.] // Доклад АН Таджикской ССР. – 1972. – Т. 15. – № 10. – С. 62–66.
6. Исследование и влияние экологических факторов на вращательную подвижность спин-меченного лекарственного растения ферулы вонючей (FERULA ASS – FOETIDA L.) / Р.А. Султонов [и др.] // Наука и инновация. – 2023. – № 1. – С. 87–79.
7. Исследование антиоксидантных свойств суммы флавоноидов, прополиса и мумиё лекарственного методом ЭПР / Р.А. Султонов [и др.] // Наука и инновация. – 2023. – № 1. – С. 75–79.
8. Исследование молекулярной структуры девясила высокого в зависимости от концентрации перекиси водорода методом спиновых меток / Р.А. Султонов [и др.] // Наука и инновация. – 2023. – № 1. – С. 62–66.
9. Синтез и биологические свойства цинкаса и его исследование методом спиновых меток / У.Р. Раджабов [и др.] // Известия АН РТ. – 2017. – № 4. – С. 97–106. – 189 с.
10. Антиоксидантное действие железа (II) с ацетилцистеином и его исследование методом спиновых меток / У.Р. Раджабов [и др.] ДАН РТ. – 2018. – Т. 61. – № 9–10. – С. 788–793. – 932 с.

List of references:

1. Flora of the Tajik SSR. – L. : Nauka, 1986. – Vol. 9. - 434 p.
2. Hadjimatov M. Wild medicinal plants of Tajikistan. – Dushanbe : Maorif, 1989. – P. 288–290.
3. Shagiakhmetov Yu.S. Pharmacological characteristics of preparations of plants of the genus Inula and their use in veterinary medicine : abstract of dis. ... doctor of veterinary sciences. – Troitsk, 2000. – 35 p.
4. The main useful wild plants of the flora of Tajikistan / A.Sh. Shukurov [et al.] // Report of the Academy of Sciences of the Tajik SSR. – 1972. – Vol. 15. – № 10. – P. 62–66.
5. Study and influence of environmental factors on the rotational mobility of the spin-labeled medicinal plant ferula foetida (FERULA ASS – FOETIDA L.) / R.A. Sultonov [et al.] // Science and Innovation. – 2023. – № 1. – P. 87–79.
6. Study of antioxidant properties of the sum of flavonoids, propolis and medicinal mumijo by the EPR method / R.A. Sultonov [et al.] // Science and Innovation. – 2023. – № 1. – P. 75–79.
7. Study of the molecular structure of elecampane depending on the concentration of hydrogen peroxide by the spin labeling method / R.A. Sultonov [et al.] // Science and Innovation. – 2023. – № 1. – P. 62–66.
8. Synthesis and biological properties of zincas and its study by the spin label method / U.R. Radzhabov [et al.] // Bulletin of the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan. – 2017. – № 4. – P. 97–106. – 189 p.
9. Antioxidant effect of iron (II) with acetylcysteine and its study by the spin label method / U.R. Radzhabov [et al.] DAN RT. – 2018. – Vol. 61. – № 9–10. – P. 788–793. – 932 p.