

АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS PUMILUS* И ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЕГИПТА НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА

Н.С. Карамова¹, П.В. Зеленихин¹, Н.Б. Мирошник¹, Иссам Абдул-Хафиз^{1,2},
Я.Н. Закирова¹, О.Н. Ильинская¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Университет Асьют, Асьют, Египет

Apoptosis-inducing activity of bacillus pumilus ribonuclease and some egyptian medicinal plants extracts on human alveolar adenocarcinoma cells

N.S. Karamova¹, P.V. Zelenikhin¹, N.B. Miroshnik¹, Essam Abdul-Hafeez^{1,2}, Ya.N. Zakirova¹, O.N. Ilinskaya¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² Assiut University, Assiut, Egypt

Антиканцерогенная активность многих препаратов, используемых для лечения пациентов со злокачественными новообразованиями, обусловлена их способностью индуцировать апоптоз опухолевых клеток. В настоящей работе исследовано индивидуальное и сочетанное апоптозиндуцирующее действие РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) и водных экстрактов коры восьми лекарственных растений Египта на клетки аденокарциномы легкого человека А549. Установлено, что биназа в концентрации 300 мкг/мл достоверно повышает процентное содержание апоптических клеток в популяции опухолевых клеток человека А549 через 24 ч. Достоверно значимым дозозависимым апоптогенным эффектом обладали экстракты растений альбиции лебекк (*Albizia lebbek*) и баухинии пестрой (*Bauhinia variegata*). Показано, что комбинация биназы и водных экстрактов коры трех растений *Albizia lebbek*, *Bauhinia variegata*, *Kigelia africana* усиливает индукцию апоптоза клеток аденокарциномы легкого человека А549 по сравнению с действием биназы и экстрактов в отдельности. Полученные результаты позволяют рассматривать комбинацию биназы и водных экстрактов коры растений *Albizia lebbek*, *Bauhinia variegata*, *Kigelia africana* как основу для создания природных щадящих средств, способных индуцировать апоптоз в опухолевых клетках.

Ключевые слова: апоптоз, опухолевые клетки, рибонуклеаза, экстракты растений, проточная цитофлуориметрия.

Введение

Проблема профилактики и терапии онкологических заболеваний остается актуальной во всех странах мира. По данным Международного агентства по исследованию рака в 2012 г. во всем мире было зарегистрировано 14 млн новых случаев заболеваний злокачественными опухолями и по прогнозам, за ближайшие 20 лет это число возрастет примерно на 70% [1].

На сегодняшний день сочетание хирургических методов лечения, лучевой и химиотерапии остается золотым стандартом лечения онкологических больных, что позволило повысить выживаемость пациентов за последние 30 лет до 8 раз [2, 3]. Тем не менее, в силу негативных побочных эффектов химиотерапии с использованием синтетических препаратов (системная токсичность, появление лекарственно-устойчивых клонов опухолевых клеток и т.д.) весьма оправдан возрастающий интерес к разработке новых стратегий лечения на основе природных материалов с низкой токсичностью.

Скрининг лекарственных растений в качестве источника противораковых агентов начался в 50-х годах прошлого века с открытием алкалоидов бар-

Induction of apoptosis is a primary mechanism of anticancer activity of several drugs using for cancer therapy. Apoptosis-inducing activity of *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase) and stem bark aqueous extracts of eight medicinal plants from Egypt in human A549 alveolar adenocarcinoma cells was studied. It was shown that binase (300 µg/ml) significantly increases the portion of apoptic cells in population after 24 h. Extracts of *Albizia lebbek* and *Bauhinia variegata* demonstrated a clear dose-dependent apoptosis-inducing effect. Combined treatment of A549 cells with binase and stem bark aqueous extracts of *Albizia lebbek*, *Bauhinia variegata*, *Kigelia africana* enhances induction of apoptosis in comparison with binase and extracts alone. Results obtained allow to consider combination of binase and stem bark aqueous extracts of *Albizia lebbek*, *Bauhinia variegata*, *Kigelia africana* as a source for development of low toxic, natural drugs to induce apoptosis in tumor cells.

Keywords: apoptosis, tumor cells, ribonuclease, plant extracts, flow cytometry.

винка *Vinca rosea* L., винбластин и винкристин, и выделения цитотоксических подофиллотоксинов [4]. Препараты на основе этого алкалоида сейчас успешно применяют для лечения детской лейкемии, лимфогрануломатоза, острого лейкоза, опухолей мягких тканей. Алкалоид паклитаксел (таксол), выделенный из тиса ягодного (*Taxus baccata*), – один из самых эффективных противоопухолевых препаратов в лечении рака молочной железы, яичников [5].

В настоящее время противоопухолевое действие показано для рибонуклеаз (РНКаз) – важнейших ферментов метаболизма РНК [6-10]. Особый интерес представляют собой РНКазы микробного происхождения, т.к у них нет сродства к ингибитору каталитической активности РНКаз (RI), который присутствует практически во всех тканях млекопитающих, а также в силу широких возможностей для биоинженерии данных ферментов.

Прогрессивным направлением в терапии онкологических заболеваний является комбинирование препаратов, отличающихся по структуре и механизмам действия, что приводит к повышению уровня эффективности лечения злокачественных новообразований.

Целью данного исследования явилась оценка индивидуального и сочетанного действия РНКазы *Bacillus pumilus* и водных экстрактов коры восьми лекарственных растений Египта на индукцию апоптоза в культивируемых опухолевых клетках человека в условиях *in vitro*.

Материал и методы

Растительный материал

Растительный материал — кора лекарственных растений брахихитона разнолистного (*Brachychiton populneus* Schott & Endl.), хлопкового дерева (*Ceiba pentandra* L.), хлопка малабарского (*Bombax malabaricum* DC), хоризии великолепной (*Chorisia speciosa* A.St.-Hil.), альбиции лебекк (*Albizia lebeck* (L.) Benth.), баухинии пестрой (*Bauhinia variegata* L.), кигелии африканской (*Kigelia africana* (Lam.) Benth.), сосны аллепской (*Pinus halepensis* Miller), был собран в ботаническом саду университета г. Асьют, Египет. Высушенный и измельченный до порошкообразного состояния растительный материал хранили в темном, хорошо проветриваемом помещении.

Приготовление водных экстрактов растений.

Водные экстракты растений были получены методом холодной экстракции. Растительный материал (2 г), заливали дистиллированной водой (20 мл). Экстракцию проводили в течение 48 ч. при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Полученную смесь заворачивали в 4–6 слоев марли, отжимали. Экстракт пропускали через фильтровальную бумагу, затем через мембранный фильтр Synrog с диаметром пор 0,2 мкм. Стерильный растительный экстракт разливали в пробирки эппендорф и хранили при температуре -20°C.

Ферментный препарат. В настоящей работе была использована биназа — гуанил-специфичная РНКазы *Bacillus pumilus*. Молекулярная масса 12,3 кДа, 109 аминокислотных остатков, $pI = 9,5$.

Клеточные линии и условия культивирования. Исследования проводили на перевиваемых линиях культуры клеток аденокарциномы легкого человека — А549 (АТСС, Роквилль, Мэриленд, США) в условиях *in vitro*. Клетки культивировали на среде RPMI-1640, с добавлением 10% FBS, 2 мкМ глутамина, 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. По истечении 24 ч. инкубирования клетки А549 высевали в 12-луночные планшеты. Снятие клеток с культуральных сосудов производили согласно описанной ранее методике [11]. Подсчет количества клеток производили в камере Горяева. В каждую лунку вносили 150 тыс. клеток А549 в суспензии. По достижении клетками монослоя (~60%) заменяли среду в лунках на свежую и добавляли исследуемые агенты: биназу в концентрации 300 мкг/мл, водные экстракты растений в концентрациях 150, 300 мкг/мл. Далее клетки культивировали в течение 24 ч. В качестве позитивного контроля использовали классический индуктор апоптоза камптотецин в концентрации 50 мМ [12].

Проточная цитометрия. Апоптотические изменения клеток фиксировали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США) с использованием катионного красителя мероцианина-540, 1 мкг/мл, который связывается с отрицательно заряженным фосфатидилсеринем, появляющимся на внешней стороне клеточной мембраны при апоптозе [13].

Для цитометрической оценки апоптотических изменений опухолевых клеток под действием исследуемого агента отбирали среду из лунок и помещали в пробирки; трипсинизировали монослой в лунках и переносили клетки в ранее отобранную среду. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 об./мин. 5 мин. при 23°C. Клетки ресуспендировали в 1 мл питательной среды RPMI 1640. Каждый образец окрашивали 5 мкл красителя мероцианина-540 при комнатной температуре, в темноте в течение 20 мин., далее проводили цитометрический анализ. Обработку результатов проводили с помощью программы FACSDiva Software (BD).

Апоптоз индуцирующий эффект рассчитывали по формуле:

$$АЭ, \% = \frac{\text{Кол-во апоптотических клеток}}{\text{Общее кол-во клеток}} \times 100.$$

Статистический анализ результатов. Статистическую обработку результатов проводили, используя программу «Microsoft Excel 2003». Анализ цитометрических данных приведен для 100 000 событий. Достоверность различий между группами данных определяли, используя непараметрический критерий Крамера-Уэлча. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Апоптоз индуцирующий эффект РНКазы *Bacillus pumilus* на клетки аденокарциномы легкого человека А 549

Цитометрическое исследование культуры клеток аденокарциномы легкого человека А 549 после воздействием биназы в концентрации 300 мкг/мл в течении 24 ч. показало увеличение интенсивности флуоресценции клеточной суспензии по сравнению с контролем, что свидетельствует о связывании катионного флуоресцентного красителя мероцианин-540 с отрицательно заряженным фосфатилсеринем, появляющегося на поверхности клеток при раннем апоптозе [13]. Согласно полученным данным, обработка биназой клеток А549 приводила к увеличению доли клеток в состоянии апоптоза до 6,075 %, в то время как в контрольном варианте значение данного показателя составило 1,98% (рис.).

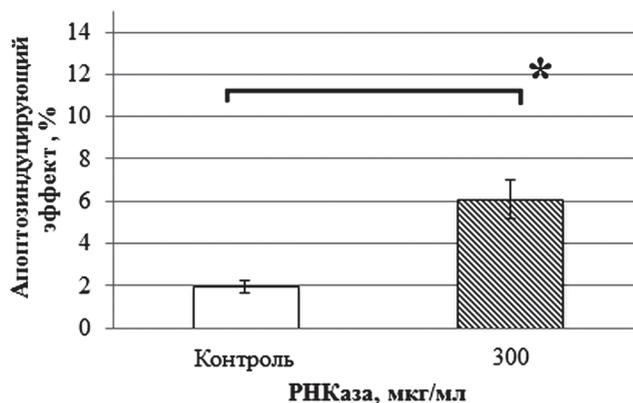


Рис. Индукция апоптоза РНКазой *Bacillus pumilus* (300 мкг/мл) в клетках аденокарциномы легкого человека А549.

* — отличия от контроля значимы при $p \leq 0,05$

Влияние экстрактов растений на апоптоз клеток опухолевых клеток аденокарциномы легких человека А549

Инкубация *in vitro* культуры опухолевых клеток А549 с водными экстрактами коры восьми лекарственных растений в течение 24 ч. приводила к апоптотическим изменениям разной интенсивности. Как следует из результатов, представленных в табл. 1, самый высокий апоптозиндуцирующий эффект проявляет водный экстракт коры альбиции лебекк (*A. lebbeck*) в обеих исследуемых концентрациях: процент апоптотических клеток при действии экстракта увеличился соответственно в 4,2 и 4,6 раза по сравнению с контролем, представленным нативными клетками

А549. Заметное повышение процентной доли апоптотических клеток также наблюдался при действии водного экстракта баухинии пестрой (*B. variegata*): в 3,8 раза при концентрации 300 мкг/мл (табл. 2).

Умеренный апоптозиндуцирующий эффект по отношению к опухолевым клеткам обнаружен для экстрактов коры растений сосны аллепской (*P. halepensis*), кигелии африканской (*K. africana*), хоризии великолепной (*Ch. speciosa*) и брахихитона разнолистного (*B. populneus*) (см. табл. 2).

Водные экстракты коры хлопкового дерева (*Ceiba pentandra*) и хлопка малабарского (*Bombax malabaricum*) не проявили апоптогенной активности в отношении клеток аденокарциномы легких человека А549.

Таблица 1. Апоптозиндуцирующий эффект водных экстрактов коры растений на клетки аденокарциномы легких человека А549

№	Экстракты растений	Доля апоптотических клеток в популяции, %		
		Контроль	150 мкг/мл	300 мкг/мл
1	<i>Brachychiton populneus</i>	2,2±0,45	2,4±0,4	4,7±0,2*
2	<i>Ceiba pentandra</i>	2,2±0,5	1,83±0,23*	1,83±0,39*
3	<i>Bombax malabaricum</i>	1,6±0,63	1,9±0,3*	1,8±0,4*
4	<i>Chorisia speciosa</i>	1,6±0,63	4,3±0,8*	4,7±0,3*
5	<i>Albizia lebbeck</i>	1,67±0,63	7,0±1,9*	7,7±1,1*
6	<i>Bauhinia variegata</i>	2,1±0,45	6,3±1,17*	7,9±1,3*
7	<i>Kigelia africana</i>	1,7±0,4	5,6±1,9*	5,2±1,6*
8	<i>Pinus halepensis</i>	1,7±0,4	2,7±1,09*	3,5±0,47*

* – статистически достоверно отличается от контроля, $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Сочетанный апоптозиндуцирующий эффект РНКазы *Bacillus pumilus* и водных экстрактов коры растений (ВЭ) на клетки аденокарциномы легких человека А549

Растения	Доля апоптотических клеток в популяции, %					
	Контроль	РНКазы, 300 мкг/мл	ВЭ 150 мкг/мл	ВЭ 300 мкг/мл	РНКазы + ВЭ 150 мкг/мл	РНКазы + ВЭ 300 мкг/мл
<i>Brachychiton populneus</i>	2,7±0,45	6,7±1,07*	5,5±1,58*	5,3±1,24*	4,8±0,8	5,9±1,9
<i>Chorisia speciosa</i>	2,8±0,05	8,4±1,07*	3,8±0,52*	4,4±0,47*	6,7±1,63	7,03±1,25
<i>Albizia lebbeck</i>	2,7±0,45	6,7±1,07*	10,3±1,5*	16,8±1,2*	17,7±0,8**	18,3±1,9**
<i>Bauhinia variegata</i>	1,9±0,2	5,4±0,8*	7,1±0,07*	12,3±0,32*	10,03±1,18**	20,13±4,0**
<i>Kigelia africana</i>	1,9±0,2	4,2±0,2*	3,3±0,46*	4,1±0,5*	4,7±1,4**	5,6±1,1**
<i>Pinus halepensis</i>	2,7±0,6	6,7±0,8*	3,03±0,56*	3,9±1,3*	6,5±1,65**	4,06±1,8**

* – статистически достоверно отличается от контроля, $p \leq 0,05$; ** – статистически достоверно отличается от варианта РНКазы 300 мкг/мл, $p \leq 0,05$.

Сочетанный апоптозиндуцирующий эффект
РНКазы *Vacillus pumilus* и водных экстрактов коры
растений на клетки аденокарциномы
легких человека А549

В результате исследования установлено, что комбинация биназы и водных экстрактов коры трех растений *A. lebbeck*, *B. variegata* и *K. africana* усиливает индукцию апоптоза у клеток аденокарциномы легких человека А549. Сочетанное действие биназы (300 мкг/мл) и экстракта *B. variegata* (300 мкг/мл) достоверно повышало процентное содержание апоптических клеток в популяции в 10,6 раз по сравнению с контролем и в 3,7 раз по сравнению с биназой. При совместном действии РНКазы и экстракта коры *A. lebbeck* также происходило увеличение доли апоптических клеток А549: до 6,8 раз над таковым в контроле и в 2,7 раз по сравнению с действием биназы в отдельности. Комбинация биназы с экстрактом *K. africana* вызывала несколько меньшее, но статистически достоверное повышение индукции апоптоза у опухолевых клеток (см. табл. 1). Водный экстракт коры *Ch. speciosa* не повышал апоптоз-индуцирующую активность биназы в отношении клеток А549. В то же время при сочетанном воздействии биназы и данного экстракта наблюдалось дозозависимое повышение апоптогенного эффекта по сравнению с индивидуальным действием самого экстракта (см. табл. 2).

Совместная обработка клеток аденокарциномы легких человека А549 водными экстрактами коры *B. populneus* или *P. halepensis* с биназой не вызывала значимого повышения процентного содержания апоптических клеток, индуцированных ферментным препаратом или экстрактами в отдельности (см. табл. 2).

Обсуждение

Апоптоз — феномен программируемой смерти клеток, необходимый для поддержания гомеостаза организма [14-16]. Нарушение процесса апоптоза характерно для ряда патологических процессов: нейродегенеративные заболевания, ишемические повреждения, аутоиммунные заболевания и канцерогенез [17, 18]. Механизмы регуляции программируемой смерти клеток представляют значительный интерес для создания эффективных и безопасных противоопухолевых препаратов [19, 20]. Существующие в настоящее время неинвазивные, чувствительные методы исследования процесса апоптоза позволяют сравнительно быстро проводить первичную оценку антиканцерогенных веществ [21, 16]. В настоящей работе представлены результаты исследования индивидуального и сочетанного апоптоз-индуцирующего действия ферментного препарата РНКазы *V. pumilus* и водных экстрактов коры восьми лекарственных растений Египта в отношении клеток аденокарциномы легких человека А549.

Установлено, что биназа в концентрации 300 мкг/мл достоверно повышает процентное содержание апоптических клеток в популяции опухолевых клеток человека линии А549 по сравнению с контролем. Полученные нами результаты подтверждают представленные ранее в литературе данные о селективном апоптоз-индуцирующем и антипролиферативном действии РНКазы *B. intermedius*, или *B. pumilus* в соответствии с международной классификацией [22], на различные линии опухолевых клеток: миеломных

клеток человека К562, моноклеарных клеток периферической крови, трансгенных миелоидных клеток FDC-P1iR117 с экспрессирующимся *kit*-онкогеном, фибробластов NIH3T3 с экспрессирующимся *ras*-онкогеном [8, 23-26], клеток карциномы легкого человека А549 [27, 28]. Цитотоксическое действие на опухолевые клетки посредством индукции различными путями программируемой смерти клеток — один из существенных аргументов, свидетельствующих о перспективности использования РНКаз для элиминации опухолей. Механизмы клеточной гибели при действии биназы могут быть обусловлены каспазо-зависимыми процессами, изменениями определенных белков и низкомолекулярных соединений [10]. Показано в частности, что гибель клеток Касуми-1, полученных из периферической крови больного миелоидным лейкозом, и клеток экспериментальной модели меланомы В-16 под действием биназы может происходить по пути как митохондриального, так и лигандного апоптоза [29, 30].

Среди восьми исследованных водных экстрактов коры лекарственных растений Египта достоверно значимым дозо-зависимым апоптогенным эффектом в отношении клеток аденокарциномы легких человека А549 обладали экстракты растений альбиции лебекк (*A. lebbeck*) и баухинии пестрой (*B. variegata*). Для экстрактов коры еще трех растений: сосны алеппской (*P. halepensis*), кигелии африканской (*K. africana*), хоризии великолепной (*Ch. speciosa*) и брахихитона разнолистного (*B. populneus*) показан умеренный апоптоз-индуцирующий эффект.

Ранее сообщалось, что органические экстракты альбиции лебекк (*A. lebbeck*) оказывают цитотоксическое действие в отношении клеточных линий рака молочной железы MCF-7 и аденокарциномы толстой кишки человека HT-29, подавляя рост опухолевых клеток на 62,94% и 44,29% соответственно [31].

Противоопухолевый эффект органического экстракта *B. variegata* показан в отношении лимфомы Дальтона у мышей *Swiss albino*, индуцированной N-нитрозодизетиламином модельной опухоли печени крыс [32], и линии опухолевых клеток человека: рака эпителия гортани Her2 и рака молочной железы HBL-100 [33]. Сведения о способности экстракта баухинии пестрой ингибировать кластогенный эффект циклофосфамида в клетках костного мозга мышей [34] и препятствовать возникновению повреждений ДНК в присутствии перекиси водорода [35] также свидетельствует об антиканцерогенном потенциале данного растения.

Ранее нами было показано, что водные экстракты коры растений *A. lebbeck*, *B. variegata*, *K. africana*, *P. halepensis* обладают высокой антиоксидантной активностью и это свойство коррелирует с содержанием полифенольных соединений [36].

Многочисленные данные о биологических свойствах полифенолов, представленные в научной литературе, позволяют рассматривать эти соединения в качестве перспективных потенциальных агентов для профилактики и терапии онкологических заболеваний [37-39]. Показано, что полифенолы могут участвовать в регуляции генов, участвующих в контроле жизнеспособности пролиферации и клеток [40], индуцировать разные пути апоптоза [41], ингибировать фактор роста эндотелия сосудов [42], препятствуя тем самым развитию процесса ангиогенеза и метастаз. Например, ресвератрол, (-)-эпигалокатехин-

3-галлат, куркумин и птеростилбен могут влиять на важнейшие сигнальные пути апоптоза в клетках разных видов опухолей посредством регуляции активности проапоптотических и антиапоптотических белков, индукции ядерного фактора транскрипции NF- κ B, активация белка p53 [39].

Экспериментальные данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что комбинация РНКазы *B. pumilus* с водными экстрактами коры трех растений *A. lebbek*, *B. variegata* и *K. africana* повышает эффективность индукции апоптоза у клеток аденокарциномы легких человека А549 по сравнению с индивидуальным действием биназы и экстрактов. Результаты исследования коррелируют с данными других авторов, демонстрирующими возможность повышения активности апоптоза опухолевых клеток при сочетанном действии вторичных метаболитов растений с другими препаратами. Например, комбинированное действие полифенолов чая с аторвастатином ингибировало онкогенез легких мышей и рост опухолевых клеток H1299 и P460, вероятнее всего усиливая их апоптоз [43]. Препараты эксперименты с использованием

ксенографтов показали, что комбинированное применение полифенолов птеростилбена, кверцетина и FOLFOX6 (оксалиплатин, лейковорин и 5-фторурацил) и радиотерапии приводит к элиминации опухоли *in vivo* и длительной выживаемости [44].

Таким образом, результаты о сочетанном апоптоз-индуцирующем действии биназы и водных экстрактов коры растений *A. lebbek*, *B. variegata* и *K. africana* на клетки аденокарциномы легких человека А549 позволяют рассматривать комбинацию данных препаратов как основу для создания природных щадящих средств, способных индуцировать апоптоз в опухолевых клетках и обуславливают необходимость исследований по определению клеточных мишеней и механизмов действия.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета, поддержана грантом РФФИ № 14-14-00522 и частично грантом РФФИ № 15-54-61024.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Stewart B.W., Wild C.P. World Cancer Report 2014. IARC Nonserial Publication. WHO Press; 2014.
2. Паутина О.А., Миронова Н.Л., Власов В.В. и др. Новейшие подходы к лечению онкологических заболеваний: противоопухолевые препараты на основе ген-направленных нуклеиновых кислот. *Acta Naturae* 2009; 2: 47-66.
3. Mitsiades C.S., Davies F.E., Laubach J.P. et al. Future directions of next-generation novel therapies, combination approaches, and development of personalized medicine in myeloma. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29 (14): 1916-23.
4. Cragg G.M., Paul G., Grothaus P.G., Newman D.J. Impact on natural products on developing new anticancer agents. *Chem. Rev.* 2009; 109 (7): 3012-43.
5. Khani S., Barar J., Movafeghi A. et al. Production of anticancer secondary metabolites: impacts of bioprocess engineering. In: Orhan I.E., editor. *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*. Bentham Science Publishers; 2012: 215-41.
6. Leland P.A., Raines R.T. Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue. *Chem. Biol.* 2001; 8 (5): 405-13.
7. Matousek J. Ribonucleases and their antitumor activity. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2001; 129 (3): 175-91.
8. Saxena S.K., Shogen K., Ardeli W. Onconase and its therapeutic potential. *Lab. Med.* 2003; 34: 380-6.
9. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *Bioessays*. 2008; 30 (8): 781-90.
10. Митькевич В.А., Макаров А.А., Ильинская О.Н. Клеточные мишени противоопухолевых рибонуклеаз. *Молекулярная биология* 2014; 48 (2): 214-22.
11. Freshney R.J. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 3rd ed. New York: Wiley; 1993.
12. Smolewski P., Grabarek J., Lee B.W. et al. Kinetics of HL-60 cell entry to apoptosis during treatment with TNF- α or camptothecin assayed by the stathmo-apoptosis method. *Cytometry* 2002; 47 (3): 143-9.
13. Laakko T., King L., Fraker P. Versatility of merocyanine 540 for the flow cytometric detection of apoptosis in human and murine cells. *J. Immunol. Methods*. 2002; 261 (1-2): 129-39.
14. Pereire W.O., Amarante-Mendes G.P. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scand. J. Immunol.* 2011; 73 (5): 401-07.
15. Ulukaya E., Acilan C., Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell. Biochem. Funct.* 2011; 29 (6): 468-80.
16. Demchenko A.P. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*. 2013; 65 (2): 157-72.
17. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2007.
18. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
19. Wong R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2011; 30 (1): 87-100.
20. Bai L., Wang S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 2014; 65: 139-55.
21. Martinez M.M., Reif R.D., Pappas D. Detection of apoptosis: a review of conventional and novel techniques. *Anal. Methods* 2010; 2 (8): 996-1004.
22. Шарипова М.Р., Тойменцова А.А. Сабирова А.Р. и др. Новое филогенетическое положение штамма *Bacillus intermedius* 3-119. *Микробиология* 2011; 80 (3): 424-6.
23. Ilinskaya O.N., Decker K., Koschinski A. et al. *Bacillus intermedius* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current. *Toxicology* 2001; 156 (2-3): 101-7.
24. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y. et al. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 361(4): 1000-5.
25. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H. et al. RNase-induced apoptosis: fate of calcium-activated potassium channels. *Biochimie* 2008; 90(5): 717-25.
26. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.V. et al. Oncogenic c-kit transcript is a target for binase. *Cell Cycle* 2010; 9(13): 2674-8.
27. Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Черепнев Г.В. и др. Индукция апоптоза опухолевых клеток биназой. *Молекулярная биология* 2005; 39(3): 457-63.
28. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M. et al. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces human alveolar adenocarcinoma cell death. *Toxicol.* 2013; 69: 219-26.
29. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y. et al. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. *Biochimie* 2013; 95(6): 1344-9.
30. Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A. et al. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells. *Cell Cycle*. 2013; 12(13): 2120-31.
31. Sankara A.J., Naresh A., Mokkapati K.L. Evaluation of *in vitro* cytotoxicity of *Andrographis paniculata*, *Duranta serratifolia* and *Albizia lebbek* whole plant extracts by MTT assay against MCF-7 and HT-29 cell lines. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 2: 351-3.
32. Raj Kapoor B., Jayakar B., Muruges N. Antitumor activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascetic lymphoma. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 89 (1): 107-9.
33. Raj Kapoor B., Jayakar B., Muruges N. et al. Chemoprevention and cytotoxic effect of *Bauhinia variegata* against N-nitrosodiethylamine induce liver tumors and human cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 104 (3): 407-9.
34. Pandey S., Agrawal R.C. Clastogenic analysis of *Bauhinia variegata* bark extract using micronucleus assay in mouse bone marrow cells. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 2010; 2 (2): 112-4.
35. Sharma N., Bhardwaj R., Kumar S. et al. Evaluation of *Bauhinia variegata* L. bark fractions for *in vitro* antioxidant potential and protective effect against H₂O₂ – induced oxidative damage to pBR322 DNA. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2011; 5 (12): 1494-500.

36. Abdul-Hafeez E.A., Karamova N.S., Ilinskaya O.N. Antioxidant activity and total phenolic compounds content of certain medicinal plants. *Int. J. Biosci.* 2014; 5(9): 213-22.

37. Stoner G.D., Mukhtar H. Polyphenols as anticancer chemopreventive agents. *J. Cell Biochem. Suppl.* 1995; 22: 169-80.

38. Han D.H., Lee M.J., Kim J.H. Antioxidant and apoptosis-inducing effect of ellagic acid. *Anticancer Res.* 2006; 26 (5A): 3601-6.

39. Rodriguez M., Estrela J.M., Ortega A. Natural polyphenols and apoptosis induction in cancer therapy. *J. Carcinog. Mutagen.* 2013; S6: 004.

40. Kang N.J., Shin S.H., Lee H.J. et al. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* 2011; 130 (3): 310-24.

41. Giovannini C., Masella R. Role of polyphenols in cell death control. *Nutr. Neurosci.* 2012; 15 (3): 134-49.

42. Oak M.H., El Bedoui J., Schini-Kerth V.B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J. Nutr. Biochem.* 2005; 16(1): 1-8.

43. Lu G., Xiao H., You H. et al. Synergistic inhibition of lung tumorigenesis by a combination of green tea polyphenols and atorvastatin. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(15): 4981-8.

44. Priego S., Feddi F., Ferrer P. et al. Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. *Mol. Cancer. Ther.* 2008; 7(10): 3330-42.

Поступила: