

УДК 57.033+57.085.23

**ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ И АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩЕЕ
ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА
ASPARAGACEAE ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛЕТКАМ
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА**

*Я.Н. Камалова¹, В.В. Штырёва¹, Иссам Абдул-Хафиз²,
Омер Х.М. Ибрагим², П.В. Зеленихин¹, Н.С. Карамова¹, О.Н. Ильинская¹*

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Асьютский университет, г. Асьют, 71515, Арабская Республика Египет

Аннотация

Для ряда лекарственных растений характерны противоопухолевые свойства в отношении широкого спектра злокачественных клеток. В настоящей работе исследовано апоптозиндуцирующее действие экстрактов растений семейства Asparagaceae на клетки аденокарциномы легкого человека А549. Показано, что водные растворы растительных компонентов (50 мкг/мл), полученных из листьев *Polianthes tuberosa* и *Furcraea gigantea* экстракцией метанолом с последующим высушиванием, не проявляли острой токсичности, и при обработке ими клеток аденокарциномы легких человека А549 в течение 24 ч индуцировали апоптоз 21% и 15% клеток соответственно. Апоптозиндуцирующее действие экстрактов других исследованных растений проявилось при использовании более высоких концентраций. При инкубировании с экстрактами в концентрации 100 и 300 мкг/мл доля апоптотических клеток составляет 45% и 73% для экстракта луковиц *Polianthes tuberosa* и 11% и 81% для экстрактов листьев *Yucca filamentosa* соответственно. Таким образом, установлено, что экстракты данных растений содержат соединения с противоопухолевой активностью, следовательно, могут рассматриваться как источник потенциальных агентов терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: рак, апоптоз, растительные экстракты, Asparagaceae

Введение

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) охарактеризовала рак как неинфекционную болезнь, опосредованную неконтролируемой пролиферацией отдельных генетически измененных клеток, способных мигрировать и размножаться в различных органах и тканях организма, что приводит к феномену метастазирования, который является основной причиной смерти от рака [1]. В развитых странах онкопатологии занимают второе место по уровню смертности населения после сердечно-сосудистых заболеваний, а в развивающихся странах – третье место после инфекционных и сердечно-сосудистых болезней [2]. В 2008 г. было зафиксировано 12.7 млн новых случаев заболевания раком, в 2012 г. – 14 млн, а к 2030 году это число может вырасти до 21.4 млн [1].

Вследствие высокой смертности и серьезных побочных эффектов химиотерапии и радиотерапии [3] – методов, традиционно используемых в настоящее время при лечении рака, ведется поиск альтернативных противоопухолевых препаратов с более эффективным избирательным действием, обладающих меньшей токсичностью по отношению к здоровым органам, тканям и организму в целом, среди которых особое внимание привлекают агенты натурального растительного [4] и микробного происхождения [5].

Растения традиционно используют для лечения различных заболеваний человека и животных. В клинической практике более 50% всех современных лекарств, многие из которых могут контролировать рост раковых клеток, имеют естественное, в основном растительное, либо микробное происхождение [3]. Известно более 3000 видов растений, используемых в терапии онкологических заболеваний и представляющих собой основу для создания новых лекарственных средств, эффективность которых связана со сложным синергическим взаимодействием различных компонентов растительного происхождения [6].

Лекарственные свойства растений обусловлены широким рядом вторичных метаболитов, таких как терпеноиды, фенольные кислоты, лигнаны, дубильные вещества, флавоноиды, хиноны, кумарины, алкалоиды, которые проявляют значительную антиоксидантную, антимуtagenную, противовоспалительную, иммуномодулирующую, противоопухолевую активности [7–10]. По данным ВОЗ, около 80% населения в мире использует растения в качестве основного источника лекарственных средств, и, кроме того, традиционная медицина остается единственным способом лечения, доступным примерно 60% населения планеты, особенно в развивающихся странах [11].

Целью настоящего исследования явилась оценка апоптозиндуцирующего действия экстрактов растений семейства *Asparagaceae* по отношению к злокачественным клеткам аденокарциномы легкого человека A549 в условиях *in vitro*.

1. Материалы и методы

1.1. Растительный материал. В работе был использован материал растений семейства *Asparagaceae*: сансевиерия цилиндрическая и трехполосная (*Sansevieria cylindrica*, *Sansevieria trifasciata*), полиантес клубненосный (*Polianthes tuberosa*), юкка нитчатая (*Yucca filamentosa*) и фуркрея гигантская (*Furcraea gigantea*) (табл. 1).

1.2. Приготовление растительных экстрактов. Свежий растительный материал (200 г, за исключением образца 3–100 г), вносили в 2 л 80%-ного метанола и выдерживали в течение 48 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Полученную смесь гомогенизировали на механическом гомогенизаторе в течение 15 мин, а затем профильтровали через бумажный фильтр в системе вакуумной фильтрации. Осажденный растительный материал дважды подвергали экстрагированию тем же способом. Полученные фильтраты объединили и упарили при пониженном давлении, используя роторный испаритель (Hidolph VV2000, Gemini BV, Нидерланды). Готовые высушенные экстракты хранили в плотно закупоренных сосудах при 2–4 °С. Для тестирования приготовили водные растворы в концентрации 20 мг/мл.

Табл. 1

Растительный материал

№	Латинское название растения	Орган растения	Источник
1	<i>Sansevieria cylindrica</i>	Листья	Египетская Зеленая ферма (Сафват Хабиб) в районе Мансорейя, Гиза, Египет
2	<i>Sansevieria cylindrica</i>	Корневище	
3	<i>Polianthes tuberosa</i>	Листья	Хозяйство Моньер для луковичных, город Куанатар, область Куалюбия, Египет
4	<i>Polianthes tuberosa</i>	Луковицы	
5	<i>Sansevieria trifasciata</i>	Листья	Декоративная ферма растений, факультет сельского хозяйства, Университет Асьют, Асьют, Египет
6	<i>Sansevieria trifasciata</i>	Корневище	
7	<i>Yucca filamentosa</i>	Листья	Сад кактусов и суккулентов хостела короля Фарука, город Пелпейс, регион Шаркия, Египет
8	<i>Furcraea gigantea</i> (var. <i>watsoniana</i>)	Листья	

1.3. Культивирование клеток. В исследовании была использована перевиваемая линия культуры клеток аденокарциномы легкого человека – А549 (ATCC, Роквилл, Мэриленд, США) в условиях *in vitro*. Работы с клеточной культурой осуществляли согласно [12], подсчет количества клеток вели в камере Горяева, клетки культивировали в 12-луночных планшетах с начальной плотностью $2 \cdot 10^5$ клеток/луночку (всего по 10 биологических повторов (лунок) на каждый опытный образец, эксперименты повторяли три раза), в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (HyClone, Австралия), 2 мМ глутамин и 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина, при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. По достижении монослоем клеток 60% конfluence-энтности заменяли среду в лунках на свежую с добавлением экстрактов (концентрации 10, 25, 50 и 100 мкг/мл в объеме 1, 2.5, 5 и 10 мкл/луночку соответственно), затем инкубировали в течение 2 и 4 ч (для определения острой токсичности) либо 24 ч (для выявления апоптоз-индуцирующих свойств). В качестве негативного контроля использовали необработанные клетки, а позитивным контролем при определении апоптоз-индуцирующего действия служил известный индуктор апоптоза камптотетин в конечной концентрации 20 мкМ [13].

1.4. Проточная цитометрия. Анализ острой токсичности и апоптоз-индуцирующих свойств экстрактов осуществляли с применением проточной цитофлуориметрии. При подготовке проб все содержимое лунок переносили в центрифужные пробирки объемом 15 мл и осаждали 5 мин при 1000 об/мин на центрифуге (Eppendorf Centrifuge 5702R, США). Известно, что растительные соединения, идентифицированные как антоцианидины, полифенолы или терпеноиды, могут оказывать сильные цитотоксические или мутагенные эффекты на клетки и ткани животных [14]. Прежде чем использовать растения или препараты на их основе в качестве лекарственных средств, следует убедиться в отсутствии у них выраженной токсичности. Одним из маркеров токсического действия агента на клетки является нарушение целостности цитоплазматической мембраны (ЦПМ). Данный показатель характеризовали, определяя проницаемость ЦПМ для йодида пропидия (PI). При оценке острой токсичности ресуспендировали осадок клеток в 1 мл PBS, окрашивали 5 мкл раствора PI

(1 мг/мл) в течение 5 мин в темноте при комнатной температуре [15]. При исследовании апоптозиндуцирующей активности клетки ресуспендировали в 1 мл полной среды RPMI-1640 и окрашивали флуоресцентным красителем мероцианином 540 (5 мкл, 1 мг/мл) при 37 °С в течение 15 мин [16].

Апоптотические и некротические изменения клеток фиксировали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США). Обработку результатов проводили с помощью программы FACSDiva Software (BD).

1.5. Статистический анализ результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0. В каждом измерении анализировали 10 тыс. клеток. Достоверность различий между группами определяли с помощью критерия Манна – Уитни. Различия считались достоверными при $p \leq 0.05$.

2. Результаты

2.1. Оценка острой токсичности растительных экстрактов. При культивировании клеток A549 в течение 2 и 4 ч в среде с добавлением растительных экстрактов в концентрации 10, 25, 50 и 100 мкг/мл, экстракты листьев и корневищ *S. cylindrica*, *S. trifasciata*, а также экстракт луковиц *P. tuberosa* и листьев *Y. filamentosa* не оказывали токсического действия на клетки аденокарциномы легких человека во всем исследованном диапазоне концентраций (табл. 2).

Экстракт листьев *F. gigantea* в концентрации 100 мкг/мл по истечении 2 ч культивирования вызывал гибель 11% клеток линии A549, а через 4 ч доля погибших клеток увеличилась в 2.7 раза и составила 29%. Экстракт листьев *P. tuberosa* в той же концентрации оказал наиболее выраженное токсическое действие, проявившееся в гибели 46% клеток популяции уже после 2 ч и в гибели 59% клеток после 4 ч инкубирования (табл. 2).

Апоптогенность экстрактов оценивали в диапазоне нетоксичных концентраций 50–300 мкг/мл для *S. cylindrica*, *S. trifasciata*, луковиц *P. tuberosa* и листьев *Y. filamentosa* и в концентрации 50 мкг/мл для листьев *F. gigantea* и *P. tuberosa*.

2.2. Влияние экстрактов растений на апоптоз клеток аденокарциномы легких человека A549. При действии 50, 100 и 300 мкг/мл экстрактов листьев и корневищ *S. cylindrica*, *S. trifasciata* доля апоптотических клеток в популяции статистически значимо не отличается от значений данного показателя для варианта без обработки (рис. 1). Экстракты листьев *P. tuberosa* и *F. gigantea*, обладавшие острой токсичностью, в нетоксичной концентрации 50 мкг/мл вызывают апоптоз клеток линии A549. Доля клеток в состоянии апоптоза составила $(21.35 \pm 1.86)\%$ и $(15.6 \pm 3.23)\%$ при обработке экстрактами листьев *P. tuberosa* и *F. gigantea* соответственно (рис. 1). Экстракты луковиц *P. tuberosa* и листьев *Y. filamentosa* проявляли значительное апоптозиндуцирующее действие в концентрациях 100 и 300 мкг/мл. Для данных экстрактов при концентрации 100 мкг/мл доля апоптотических клеток составляла $(45.76 \pm 1.34)\%$ и $(11.33 \pm 1.02)\%$, а при концентрации 300 мкг/мл значение этого показателя возросло до $(73.33 \pm 3.05)\%$ и $(81.75 \pm 4.07)\%$ соответственно (рис. 1).

Табл. 2

Цитотоксичность растительных экстрактов по отношению к клеткам аденокарциномы легких человека A549

№	Экстракты растений	Концентрация экстрактов, мкг/мл	Доля погибших клеток в популяции,% **		
			Время культивирования, ч		Без добавления экстрактов
			2	4	
1	<i>Sansevieria cylindrica</i> (Листья)	10	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.2
		25	0.5 ± 0.7	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2
		50	1.2 ± 1.8	1.8 ± 0.5	0.4 ± 0.2
		100	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.4	1.3 ± 0.9
2	<i>Sansevieria cylindrica</i> (Корневище)	10	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.5	0.4 ± 0.2
		25	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.4 ± 0.2
		50	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2
		100	1.0 ± 0.2	1.8 ± 0.4	1.3 ± 0.9
3	<i>Polianthes tuberosa</i> (Листья)	10	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2
		25	1.0 ± 0.7	3.1 ± 0.4	0.4 ± 0.2
		50	2.1 ± 0.7	3.9 ± 0.2	0.4 ± 0.2
		100	46.0 ± 7.6*	59.2 ± 4.5*	1.3 ± 0.9
4	<i>Polianthes tuberosa</i> (Луковицы)	10	0.9 ± 0.3	1 ± 0.9	0.4 ± 0.2
		25	1.1 ± 0.8	1.2 ± 0.4	0.4 ± 0.2
		50	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.4	0.4 ± 0.2
		100	2.6 ± 1.6	2.7 ± 0.8	1.3 ± 0.9
5	<i>Sansevieria trifasciata</i> (Листья)	10	0.7 ± 0.7	0.8 ± 0.1	0.4 ± 0.2
		25	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.4	0.4 ± 0.2
		50	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0.4 ± 0.2
		100	2.2 ± 0.4	2.7 ± 0.1	1.3 ± 0.9
6	<i>Sansevieria trifasciata</i> (Корневище)	10	0.7 ± 0.6	0.9 ± 0.8	0.4 ± 0.2
		25	1.1 ± 1.0	1.1 ± 0.4	0.4 ± 0.2
		50	1.9 ± 1.0	2.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2
		100	2.5 ± 3.2	2.7 ± 0.1	1.3 ± 0.9
7	<i>Yucca filamentosa</i> (Листья)	10	0.4 ± 2.1	0.4 ± 1.1	0.4 ± 0.2
		25	0.6 ± 0.5	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.2
		50	0.7 ± 0.6	1.2 ± 0.7	0.4 ± 0.2
		100	1.1 ± 0.7	1.7 ± 0.9	1.3 ± 0.9
8	<i>Furcraea gigantea</i> (Листья)	10	0.6 ± 0.9	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2
		25	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2
		50	1.3 ± 0.5	3.6 ± 1.0	0.4 ± 0.2
		100	11.0 ± 2.1*	29.4 ± 1.2*	1.3 ± 0.9

* Отличия от варианта без обработки экстрактами статистически значимы при $p \leq 0.05$.

** За 100% принято общее количество клеток в популяции.

3. Обсуждение

В настоящее время пристальное внимание исследователей привлекают потенциальные противоопухолевые агенты, полученные из растений и обладающие способностью подавлять пролиферацию раковых клеток и индуцировать их апоптоз. Это обусловлено тем фактом, что многие из классических противоопухолевых препаратов имеют весомые побочные эффекты и действуют также на здоровые клетки. Растения представляют собой источник широкого спектра альтернативных противоопухолевых агентов, которые могут отличаться меньшей

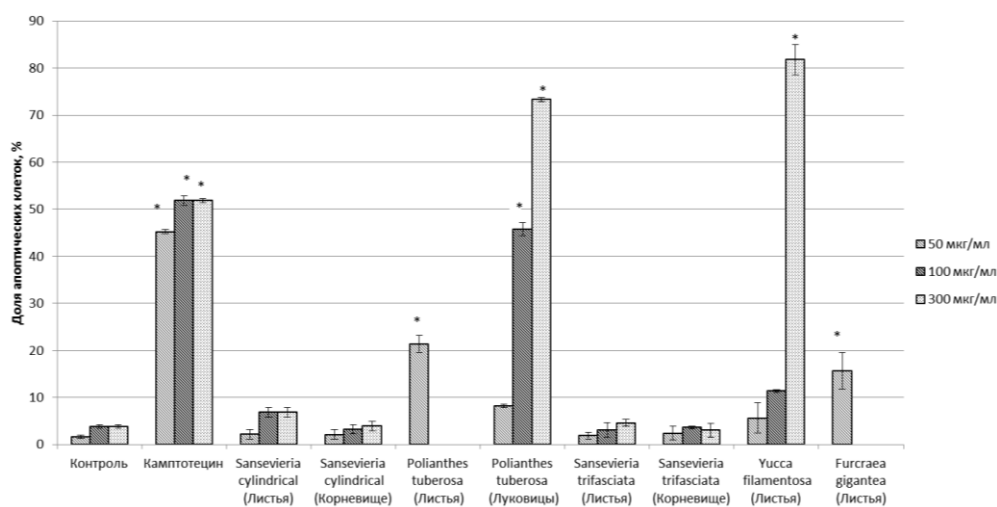


Рис. 1. Апоптозіндуціруюче дієння екстрактів. Звездочкой обозначены отличия от контроля, статистически значимые при $p \leq 0.05$

токсичностью, но большей доступностью и дешевизной по сравнению с современными аллопатическими препаратами. Уже применяемые в онкологической практике противоопухолевые препараты винбластин и винкристин, полученные из *Catharanthus roseus*, обусловили поиск других эффективных агентов растительного происхождения, которые могут быть использованы в качестве средств терапии злокачественных новообразований [17].

Представители подсемейств Nolinoideae и Agavoideae популярны в традиционной медицине при лечении многих заболеваний благодаря своим противовоспалительным, противомикробным и другим свойствам (см. [18–26]).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстракты листьев и корневищ *S. cylindrica* и *S. trifasciata* не обладали апоптозіндуціруючим дієнням на клетки линии A549, однако известно, что другие виды рода *Sansevieria* могут продуцировать вещества с противоопухолевой активностью. Так, например, водные и спиртовые экстракты биомассы корней *S. liberica*, содержащие масла, сахара, алкалоиды, сапонины, антрахиноны и дубильные вещества [18], проявляют анальгетические, антибиотические и противовоспалительные свойства [19], а также активны в отношении раковых клеток линии HeLa, НСТ-116, ТНР-1, А549 и саркомы-180 [20]. Компоненты экстракта корневища *S. roxburghiana* обладали антиоксидантным действием [21] и проявляли цитотоксичность по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха [22].

Нами показано, что экстракт листьев *Yucca filamentosa* проявляет значительное дозозависимое апоптозіндуціруюче дієння на клетки аденокарциномы легких человека А549. Ранее сообщалось, что из коры *Y. schidigera* были получены ресвератрол и другие фенольные соединения, которые снижают перекисное окисление липидов и оксидативный стресс в тромбоцитах и ингибируют рост клеток саркомы Капоши [23], а водно-спиртовой экстракт из свежих цветов *Y. glauca* Nutt. обладает противоопухолевой активностью в отношении меланомы В16 у мышей [27].

Мы установили, что экстракты листьев и корневищ *Polianthes tuberosa* и листьев *Furcraea gigantea* обладают высокой цитотоксической и апоптоз-индуцирующей активностью. Известно, что *P. tuberosa* богат стероидными сапонинами, сапонинами, гликозидами, некоторые из них обладают цитотоксической активностью против злокачественных клеточных линий A549, HSC-2 и HSC-4, HL-60 [28]. Из экстракта листьев *F. foetida* ранее был выделен фуркреастин, стероидный сапонин, оказывающий избирательное цитотоксическое действие на экспрессирующие мутантный белок p53 фибробласты мыши [29], а также стероидные гликозиды, обладающие цитотоксичностью по отношению к малигнизированным клеточным линиям A549, HSC-2, HSC-4 [30].

Дозозависимый апоптогенный эффект в отношении клеток аденокарциномы легкого человека A549 ранее нами был показан для водных экстрактов растений Египта альбиции лебекк (*Albizzia lebeck*) и баухинии пестрой (*Bauhinia variegata*). Было также установлено, что комбинация водных экстрактов коры трех растений *Albizzia lebeck*, *Bauhinia variegata*, *Kigelia africana* и РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) усиливает индукцию апоптоза клеток аденокарциномы легких человека A549 по сравнению с действием биназы и экстрактов в отдельности [31].

Таким образом, согласно полученным результатам экстракты листьев и луковец *Polianthes tuberosa*, а также листьев *Furcraea gigantea* и *Yucca filamentosa* можно рассматривать в качестве источников перспективных агентов, способных индуцировать апоптоз опухолевых клеток.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета, а также при поддержке РФФИ (проект № 15-54-61024) и Фонда развития науки и технологии Египта (STDF) (проект № 13821).

Литература

1. Sawadogo W.R., Schumacher M., Teiten M.-H., Dicato M., Diederich M. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy // *Biochem. Pharmacol.* – 2012. – V. 84, No 10. – P. 1225–1240. – doi: 10.1016/j.bcp.2012.07.021.
2. Mbaveng A.T., Kuete V., Mapunya B.M., Beng V.P., Nkengfack A.E., Meyer J.J.M., Lall N. Evaluation of four Cameroonian medicinal plants for anticancer, antigonorrheal and anti-reverse transcriptase activities // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2011. – V. 32, No 2. – P. 162–167. – doi: 10.1016/j.etap.2011.04.006.
3. Unmati S., Ripal S., Sanjeev A., Niyati A. Novel anticancer agents from plant sources // *Chin. J. Nat. Med.* – 2013. – V. 11, No 1. – P. 16–23. – doi: 10.1016/S1875-5364(13)60002-3.
4. Alonso-Castro A.J., Villarreal M.L., Salazar-Olivo L.A., Gomez-Sanchez M., Dominguez F., Garcia-Carranca A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies // *J. Ethnopharmacol.* – 2011. – V. 133, No 3. – P. 945–972. – doi: 10.1016/j.jep.2010.11.055.
5. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A.I., Zelenikhin P.V., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces human alveolar adenocarcinoma cell death // *Toxicol.* – 2013. – V. 69, No 3. – P. 219–226. – doi: 10.1016/j.toxicol.2013.03.015.
6. Khazir J., Mir B.A., Pilcher L., Riley D.L. Role of plants in anticancer drug discovery // *Phytochem. Lett.* – 2014. – V. 7. – P. 173–181. – doi: 10.1016/j.phytol.2013.11.010.

7. Tagne R.S., Telefo B.P., Nyemb J.N., Yemele D.M., Njina S.N., Goka S.M., Lienou L.L., Nwabo Kamdje A.H., Moundipa P.F., Farooq A.D. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants // Asian Pac. J. Trop. Med. – 2014. – V. 7, Suppl. 1. – P. S442–S447. – doi: 10.1016/S1995-7645(14)60272-8.
8. Karamova N.S., Fatykhova D.G., Abdrakhimova J.R., Ilinskaya O.N. An investigation of antigenotoxic properties of plant extracts of *Chelidonium majus* L., *Plantago major* L. and *Tussilago farfara* L. // Russ. J. Genet.: Appl. Res. – 2011. – V. 1, No 5. – P. 371–378. – doi: 10.1134/S207905971105008X.
9. Abdul-Hafeez E.Y., Karamova N.S., Ilinskaya O.N. Antioxidant activity and total phenolic compounds content of certain medicinal plants // Int. J. Biosci. – 2014. – V. 5, No 9. – P. 213–222. – doi: 10.12692/ijb/5.9.213-222.
10. Abdul-Hafeez E.Y., Nguyen T.N., Karamova N.S., Ilinskaya O.N. Antibacterial activity of certain medicinal plants on different bacterial strains associated with colorectal cancer // Int. J. Biosci. – 2014. – V. 5, No 7. – P. 219–229. – doi 10.12692/ijb/5.7.219-229.
11. El-Seedi H.R., Burman R., Mansour A., Turki Z., Boulos L., Gullbo J., Göransson U. The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: discovery of an active cardiac glycoside from *Urginea maritima* // J. Ethnopharmacol. – 2013. – V. 145, No 3. – P. 746–757. – doi: 10.1016/j.jep.2012.12.007.
12. Freshney R.I. Culture of animal cells: A manual of basic techniques. – N. Y.: Wiley-Liss, 1994. – 486 p. – doi: 10.1002/cbf.646.
13. Smolewski P., Grabarek J., Lee B.W., Johnson G.L., Darzynkiewicz Z. Kinetics of HL-60 cell entry to apoptosis during treatment with TNF-alpha or camptothecin assayed by the stathmo-apoptosis method // Cytometry. – 2002. – V. 47, No 3. – P. 143–149.
14. Rezk A., Al-Hashimi A., John W., Schepker H., Ullrich M.S., Brix K. Assessment of cytotoxicity exerted by leaf extracts from plants of the genus *Rhododendron* towards epidermal keratinocytes and intestine epithelial cells // BMC Complementary Altern. Med. – 2015. – V. 15. – Art. 364, P. 1–18. – doi: 10.1186/s12906-015-0860-8.
15. Lizard G., Monier S., Cordelet C., Gesquière L., Deckert V., Gueldry S., Lagrost L., Gambert P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall // Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. – 1999. – V. 19, No 5. – P. 1190–1200.
16. 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. – V. 261, No 1–2. – P. 129–139.
17. Fabricant D.S., Farnsworth N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery // Environ. Health. Perspect. – 2001. – V. 109, Suppl. 1. – P. 69–75.
18. Adeyemi O.O., Akindele A.J., Ogunleye E.A. Evaluation of the antidiarrhoeal effect of *Sansevieria liberica* Gerome & Labroy (Agavaceae) root extract // J. Ethnopharmacol. – 2009. – V. 123, No 3. – P. 459–463. – doi: 10.1016/j.jep.2009.03.023.
19. Amida M.B., Yemitan O.K., Adeyemi O.O. Toxicological assessment of the aqueous root extract of *Sansevieria liberica* Gerome and Labroy (Agavaceae) // J. Ethnopharmacol. – 2007. – V. 113, No 1. – P. 171–175.
20. Akindele A.J., Wani Z.A., Sharma S., Mahajan G., Satti N.K., Adeyemi O.O., Mondhe D.M., Saxena A.K. In vitro and in vivo anticancer activity of root extracts of *Sansevieria liberica* Gerome and Labroy (Agavaceae) // Evidence-Based Complementary Altern. Med. – 2015. – V. 2015. – Art. ID 560404, P. 1–11. – doi:10.1155/2015/560404.

21. Roy J., Kuddus M., Begum B., Choudhury H. Evaluation of analgesic, cytotoxic and antioxidant activities of *Sansevieria roxburghiana* Schult. and Schult. f. // Asian Pac. J. Tropic Biomed. – 2012. – V. 2, No 2. – P. S723–S726. – doi: 10.1016/S2221-1691(12)60303-7.
22. Haldar P.K., Kar B., Bala A., Bhattacharya S., Mazumder U.K. Antitumor activity of *Sansevieria roxburghiana* rhizome against Ehrlich ascites carcinoma in mice // Pharm. Biol. – 2010. – V. 48, No 12. – P. 1337–1343. – doi: 10.3109/13880201003792592.
23. Balestrieri C., Felice F., Piacente S., Pizza C., Montoro P., Oleszek W., Visciano V., Balestrieri M.L. Relative effects of phenolic constituents from *Yucca schidigera* Roetzl. bark on Kaposi's sarcoma cell proliferation, migration, and PAF synthesis // Biochem. Pharmacol. – 2006. – V. 71, No 10. – P. 1479–1487.
24. Andhare R.N., Raut M.K., Naik S.R. Evaluation of antiallergic and anti-anaphylactic activity of ethanolic extract of *Sansevieria trifasciata* leaves (EEST) in rodents // J. Ethnopharmacol. – 2012. – V. 142, No 3. – P. 627–633. – doi: 10.1016/j.jep.2012.05.007.
25. Simmons-Boyce J.L., Tinto W.F., McLean S., Reynold W.F. Saponins from *Furcraea selloa* var. *marginata* // Fitoterapia. – 2004. – V. 75, No 7–8. – P. 634–638.
26. Cigerci I.H., Fidan A.F., Konuk M., Yuksel H., Kucukkurt I., Eryavuz A., Sozibilir N.B. The protective potential of *Yucca schidigera* (Sarsaponin 30) against nitrite-induced oxidative stress in rats // J. Nat. Med. – 2009. – V. 63, No 3. – P. 311–317. – doi: 10.1007/s11418-009-0338-4.
27. Ali M.S., Sharma G.C., Asplund R.O., Nevins M.P., Garb S. Isolation of antitumor polysaccharide fractions from *Yucca glauca* Nutt. (Liliaceae) // Growth. – 1978. – V. 42, No 2. – P. 213–223.
28. Mimaki Y., Yokosuka A., Sashida Y. Steroidal glycosides from the aerial parts of *Polygonum tuberosum* // J. Nat. Prod. – 2000. – V. 63, No 11. – P. 1519–1523.
29. Itabashi M., Segawa K., Ikeda Y., Kondo S., Naganawa H., Koyano T., Umezawa K. A new bioactive steroidal saponin, furcreastatin, from the plant *Furcraea foetida* // Carbohydr. Res. – 2000. – V. 323, No 1–4. – P. 57–62.
30. Yokosuka A., Sano T., Hashimoto K., Sakagami H., Mimaki Y. Steroidal glycosides from *Furcraea foetida* and their cytotoxic activity // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2009. – V. 57, No 10. – P. 1161–1166.
31. Карамова Н.С., Зеленихин П.В., Мирошник Н.Б., Иссам Абдул-Хафиз, Закирова Я.Н., Ильинская. О.Н. Апоптоз индуцирующее действие рибонуклеазы *Bacillus pumilus* и экстрактов лекарственных растений Египта на клетки аденокарциномы легких человека // Гены и клетки. – 2015. – Т. 10, Вып. 3. – С. 62–67.

Поступила в редакцию
27.06.16

Камалова Язгуль Насиковна, аспирант кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: yazgulen@mail.ru

Штырёва Виктория Витальевна, студент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: vika1411akva0903@rambler.ru

Иссам Абдул-Хафиз, PhD, доцент

Асьютский университет
г. Асьют, 71515, Арабская Республика Египет
E-mail: noresam_2000@yahoo.com

Омер Х.М. Ибрагим, PhD, доцент

Асьютский университет
г. Асьют, 71515, Арабская Республика Египет
E-mail: omer_hooo@yahoo.com

Зеленихин Павел Валерьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: pasha_mic@mail.ru

Карамова Назира Сунагатовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: nskaramova@mail.ru

Ильинская Ольга Николаевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ilinskaya_kfu@mail.ru

ISSN 1815-6169 (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE
NAUKI

(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2016, vol. 158, no. 3, pp. 338–350

**Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activity of Plants from the Family Asparagaceae
in Relation to Human Alveolar Adenocarcinoma Cells**

Y.N. Kamalova^{a*}, *V.V. Shtyreva*^a, *Essam Abdul-Hafeez*^{b**}, *Omer H.M. Ibrahim*^{b***},
P.V. Zelenikhin^{a****}, *N.S. Karamova*^{a*****}, *O.N. Ilinskaya*^{a*****}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bAssiut University, Assiut 71515 Arab Republic of Egypt

E-mail: *yazgulen@mail.ru, **noresam_2000@yahoo.com, ***omer_hooo@yahoo.com,
****pasha_mic@mail.ru, *****nskaramova@mail.ru, *****ilinskaya_kfu@mail.ru

Received June 27, 2016

Abstract

Cancer is known as the second major mortality cause. The number of new cases is increasing every year. Thus, it is urgent for scientists to search for alternative drugs with selective antitumor action and minimal side effects. It is known that some plant metabolites exhibit antioxidant, cytotoxic, and anti-tumor activity, while at the same time being less toxic than modern allopathic drugs. In this work, we have investigated the cytotoxic and apoptosis-inducing effects of extracts obtained from plants of the family Asparagaceae on A549 human lung adenocarcinoma cells. The analysis has been performed using flow cytometry. If extracts showed cytotoxicity, the apoptosis-inducing action has been evaluated at the concentration of 50 µg/mL; in other cases, the analyzed concentration range was 50–300 µg/mL. On the basis of the experiments carried out, the following conclusions have been made. Extracts of the leaves and rhizomes of *Sansevieria cylindrica* and *Sansevieria trifasciata* do not possess anti-tumor activity. Extracts of the leaves of *Polygonum tuberosum* and *Furcraea gigantea*, which were cytotoxic at high concentrations, cause cell death at 50 µg/mL in the amount of 21.35 ± 1.86 and 15.6 ± 3.23, respectively. Extracts of *Polygonum tuberosum* bulbs and *Yucca filamentosa* leaves are able

to induce apoptosis at higher concentrations. When the concentration reaches 100 µg/mL, the proportion of apoptotic cells for these plants is 45.76 ± 1.34 and 11.33 ± 0.07 , respectively. The number of dead cells at the concentration of 300 µg/mL increased up to 73.33 ± 3.05 and 81.75 ± 4.07 . The results have great importance for development of new drugs based on metabolites from these plant extracts.

Keywords: cancer, apoptosis, plant extracts, Asparagaceae

Acknowledgments. This study was supported by the state program for increasing the competitiveness of Kazan Federal University, Russian Foundation for Basic Research (project no. 15-54-61024), and Science Technology Development Fund (STDF) of Egypt (project no. 13821).

Figure Captions

Fig. 1. Apoptosis-inducing effect of plant extracts. Differences from control significant at $p \leq 0.05$ are marked with asterisks.

References

1. Sawadogo W.R., Schumacher M., Teiten M.-H., Dicato M., Diederich M. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 2012, vol. 84, no. 10, pp. 1225–1240. doi: 10.1016/j.bcp.2012.07.021.
2. Mbaveng A.T., Kuete V., Mapunya B.M., Beng V.P., Nkengfack A.E., Meyer J.J.M., Lall N. Evaluation of four Cameroonian medicinal plants for anticancer, antigonorrheal and antireverse transcriptase activities. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2011, vol. 32, no. 2, pp. 162–167. doi: 10.1016/j.etap.2011.04.006.
3. Unnati S., Ripal S., Sanjeev A., Niyati A. Novel anticancer agents from plant sources. *Chin. J. Nat. Med.*, 2013, vol. 11, no. 1, pp. 16–23. doi: 10.1016/S1875-5364(13)60002-3.
4. Alonso-Castro A.J., Villarreal M.L., Salazar-Olivo L.A., Gomez-Sanchez M., Dominguez F., Garcia-Carranca A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.*, 2011, vol. 133, no. 3, pp. 945–972. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.055.
5. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A.I., Zelenikhin P.V., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces human alveolar adenocarcinoma cell death. *Toxicol.*, 2013, vol. 69, no. 3, pp. 219–226. doi: 10.1016/j.toxicol.2013.03.015.
6. Khazir J., Mir B.A., Pilcher L., Riley D.L. Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochem. Lett.*, 2014, vol. 7, pp. 173–181. doi:10.1016/j.phytol.2013.11.010.
7. Tagne R.S., Telefo B.P., Nyemb J.N., Yemele D.M., Njina S.N., Goka S.M., Lienou L.L., Nwabo Kamdje A.H., Moundipa P.F., Farooq A.D. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2014, vol. 7, suppl. 1, pp. S442–S447. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60272-8.
8. Karamova N.S., Fatykhova D.G., Abdrakhimova J.R., Ilinskaya O.N. An investigation of antitumor properties of plant extracts of *Chelidonium majus* L., *Plantago major* L. and *Tussilago farfara* L. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.*, 2011, vol. 1, no. 5, pp. 371–378. doi:10.1134/S207905971105008X.
9. Abdul-Hafeez E.Y., Karamova N.S., Ilinskaya O.N. Antioxidant activity and total phenolic compounds content of certain medicinal plants. *Int. J. Biosci.*, 2014, vol. 5, no. 9, pp. 213–222. doi: 10.12692/ijb/5.9.213-222.
10. Abdul-Hafeez E.Y., Nguyen T.N., Karamova N.S., Ilinskaya O.N. Antibacterial activity of certain medicinal plants on different bacterial strains associated with colorectal cancer. *Int. J. Biosci.*, 2014, vol. 5, no. 7, pp. 219–229. doi 10.12692/ijb/5.7.219-229.
11. El-Seedi H.R., Burman R., Mansour A., Turki Z., Boulos L., Gullbo J., Göransson U. The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: discovery of an active cardiac glycoside from *Urginea maritime*. *J. Ethnopharmacol.*, 2013, vol. 145, no. 3, pp. 746–757. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.007.
12. Freshney R. I. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques. New York, Wiley-Liss, 1994, 3 ed. 486 p. doi: 10.1002/cbf.646.

13. Smolewski P., Grabarek J., Lee B.W., Johnson G.L., Darzynkiewicz Z. Kinetics of HL-60 cell entry to apoptosis during treatment with TNF-alpha or camptothecin assayed by the stathmo-apoptosis method. *Cytometry*, 2002, vol. 47, no. 3, pp. 143–149.
14. Rezk A., Al-Hashimi A., John W., Schepker H., Ullrich M.S., Brix K. Assessment of cytotoxicity exerted by leaf extracts from plants of the genus *Rhododendron* towards epidermal keratinocytes and intestine epithelial cells. *BMC Complementary Altern. Med.*, 2015, vol. 15, art. 364, pp. 1–18. doi: 10.1186/s12906-015-0860-8.
15. Lizard G., Monier S., Cordelet C., Gesquière L., Deckert V., Gueldry S., Lagrost L., Gambert P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7b-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, 1999, vol. 19, no. 5, pp. 1190–1200.
16. 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, vol. 261, nos. 1–2, pp. 129–139.
17. Fabricant D.S., Farnsworth N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.*, 2001, vol. 109, suppl. 5, pp. 69–75.
18. Adeyemi O.O., Akindele A.J., Ogunleye E.A. Evaluation of the antidiarrhoeal effect of *Sansevieria liberica* Gerome & Labroy (Agavaceae) root extract. *J. Ethnopharmacol.*, 2009, vol. 123, no. 3, pp. 459–463. doi: 10.1016/j.jep.2009.03.023.
19. Amida M.B., Yemitan O.K., Adeyemi O.O. Toxicological assessment of the aqueous root extract of *Sansevieria liberica* Gerome and Labroy (Agavaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 2007, vol. 113, no. 1, pp. 171–175.
20. Akindele A.J., Wani Z.A., Sharma S., Mahajan G., Satti N.K., Adeyemi O.O., Mondhe D.M., Saxena A.K. In vitro and in vivo anticancer activity of root extracts of *Sansevieria liberica* Gerome and Labroy (Agavaceae). *J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, 2015, vol. 2015, art. ID 560404, pp. 1–11. doi:10.1155/2015/560404.
21. Roy J., Kuddus M., Begum B., Choudhury H. Evaluation of analgesic, cytotoxic and antioxidant activities of *Sansevieria roxburghiana* Schult. and Schult. f. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2012, vol. 2, no. 2, pp. S723–S726. doi:10.1016/S2221-1691(12)60303-7.
22. Haldar P.K., Kar B., Bala A., Bhattacharya S., Mazumder U.K. Antitumor activity of *Sansevieria roxburghiana* rhizome against Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Pharm. Biol.*, 2010, vol. 48, no. 12, pp. 1337–1343. doi: 10.3109/13880201003792592.
23. Balestrieri C., Felice F., Piacente S., Pizza C., Montoro P., Oleszek W., Visciano V., Balestrieri M.L. Relative effects of phenolic constituents from *Yucca schidigera* Roetzl. bark on Kaposi's sarcoma cell proliferation, migration, and PAF synthesis. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, vol. 71, no. 10, pp. 1479–1487.
24. Andhare R.N., Raut M.K., Naik S.R. Evaluation of anti-allergic and anti-anaphylactic activity of ethanolic extract of *Sanseveiria trifasciata* leaves (EEST) in rodents. *J. Ethnopharmacol.*, 2012, vol. 142, no. 3, pp. 627–633. doi: 10.1016/j.jep.2012.05.007.
25. Simmons-Boyce J.L., Tinto W.F., McLean S., Reynold W.F. Saponins from *Furcraea selloa* var. *marginata*. *Fitoterapia*, 2004, vol. 75, nos. 7–8, pp. 634–638.
26. Cigerci I.H., Fidan A.F., Konuk M., Yuksel H., Kucukkurt I., Eryavuz A., Sozbilir N.B. The protective potential of *Yucca schidigera* (Sarsaponin 30) against nitrite-induced oxidative stress in rats. *J. Nat. Med.*, 2009, vol. 63, no. 3, pp. 311–317. doi: 10.1007/s11418-009-0338-4.
27. Ali M.S., Sharma G.C., Asplund R.O., Nevins M.P., Garb S. Isolation of antitumor polysaccharide fractions from *Yucca glauca* Nutt. (Liliaceae). *Growth*, 1978, vol. 42, no. 2, pp. 213–223.
28. Mimaki Y., Yokosuka A., Sashida Y., Steroidal glycosides from the aerial parts of *Polianthes tuberosa*. *J. Nat. Prod.*, 2000, vol. 63, no. 11, pp. 1519–1523.
29. Itabashi M., Segawa K., Ikeda Y., Kondo S., Naganawa H., Koyano T., Umezawa K. A new bioactive steroidal saponin, furcreastatin, from the plant *Furcraea foetida*. *Carbohydr. Res.*, 2000, vol. 323, nos. 1–4, pp. 57–62.

30. Yokosuka A., Sano T., Hashimoto K., Sakagami H., Y. Mimaki. Steroidal glycosides from *Furcraea foetida* and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 2009, vol. 57, no. 10, pp. 1161–1166.
31. Karamova N.S., Zelenikhin P.V., Miroshnik N.B., Abdul-Hafeez E.Y., Zakirova Ya.N., Pinskaya O.N. Apoptosis-inducing activity of *Bacillus pumilus* ribonuclease and some Egyptian medicinal plants extracts on human alveolar adenocarcinoma cells. *Genes Cells*, 2015, vol. 10, no. 3, pp. 62–67. (In Russian)

Для цитирования: Камалова Я.Н., Штырёва В.В., Абдул-Хафиз Иссам, Ибрагим Омер Х.М., Зеленихин П.В., Карамова Н.С., Ильинская О.Н. Цитотоксическое и апоптоз-индуцирующее действие экстрактов растений семейства Asparagaceae по отношению к клеткам аденокарциномы легких человека // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 3. – С. 338–350.

For citation: Kamalova Y.N., Shtyryeva V.V., Essam Abdul-Hafeez, Omer H.M. Ibrahim, Zelenikhin P.V., Karamova N.S., Pinskaya O.N. Cytotoxic and apoptosis-inducing activity of plants from the family Asparagaceae in relation to human alveolar adenocarcinoma cells. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2016, vol. 158, no. 3, pp. 338–350. (In Russian)