

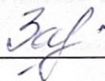
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего  
образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭКСТРАКТОВ ЭНДОФИТНЫХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Обучающийся 2 курса  
группы 01-240-2



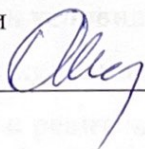
Залилова Ю.М.

Научный руководитель  
канд. биол. наук, доцент



Карамова Н.С.

Заведующий кафедрой микробиологии  
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Общая характеристика и разнообразие эндофитной микробиоты растений .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Роль эндофитных микроорганизмов в жизни растений: стимуляторы роста и агенты биоконтроля .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1 Производство фитогормонов .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2 Участие в биологической фиксации азота.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.3 Увеличение биодоступности фосфора.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.4 Продукция сидерофоров .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.5 Роль антимикробных веществ, продуцируемых эндофитами, в биоконтроле фитопатогенов .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Эндофитные микроорганизмы как источник биоактивных соединений, имеющих биомедицинское применение .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1 Антимикробный потенциал эндофитных микроорганизмов .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.2 Противоопухолевая активность эндофитных микроорганизмов....</b>	<b>20</b>
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>	<b>25</b>
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Материалы исследования .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.1 Эндофитные микроорганизмы и условия их культивирования.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.2 Клеточные линии и условия их культивирования.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.3 Питательные среды, растворы и реактивы .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Методы исследования .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.1 Характеристика морфологических и культуральных свойств эндофитных микроорганизмов.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.2 Идентификация эндофитных микроорганизмов с помощью масс-спектрометрического анализа .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.3 Получение этилацетатных экстрактов из культуральной жидкости эндофитных микроорганизмов.....</b>	<b>28</b>

2.2.4 Измерение абсолютно сухого веса этилацетатных экстрактов эндофитных микроорганизмов.....	29
2.2.5 Оценка цитотоксичности этилацетатных экстрактов эндофитных микроорганизмов в колориметрическом МТТ-тесте .....	29
2.3 Статистическая обработка результатов.....	31
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>32</b>
3.1 Культурально-морфологические характеристики изолятов эндофитных микроорганизмов.....	32
3.2 Идентификация изолятов эндофитных бактерий .....	35
3.3 Оценка цитотоксического потенциала этилацетатных экстрактов культуральной жидкости изолятов эндофитных микроорганизмов в МТТ-тесте .....	36
3.4 Определение полумаксимальных ингибирующих концентраций этилацетатных экстрактов культуральной жидкости изолятов эндофитных микроорганизмов.....	42
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>46</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>47</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших и по сей день требующих решения проблем общественного здравоохранения во всем мире является рак – патология, по смертности уступающая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям. Несмотря на огромный прогресс в развитии медицины, достигнутый в последние десятилетия, глобальное бремя онкологических заболеваний неуклонно растет. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2022 году заболеваемость раком составила около 20 миллионов новых случаев, а число зарегистрированных смертей от онкологических заболеваний превысило 9.7 миллионов. При этом ожидается, что уже к 2050 году число новых случаев заболевания раком составит 35 миллионов, что на 77% больше имеющегося на сегодняшний день показателя. Наиболее распространенным видом злокачественных новообразований, а также ведущей причиной смертности от онкологических заболеваний в мире является рак легкого (18.7% от общего числа смертей от рака) [Bray *et al.*, 2024].

Традиционные методы лечения рака, такие как лучевая терапия и химиотерапия, наиболее часто используются в медицинской практике, однако обладают серьезными недостатками, в частности, тяжелыми побочными эффектами, обусловленными неспецифической цитотоксичностью, а также недостаточной эффективностью ввиду генетической гетерогенности опухолей и приобретения опухолевыми клетками лекарственной устойчивости, что значительно усложняет борьбу с онкологическими заболеваниями [Bhadresha *et al.*, 2022]. Одним из способов преодоления данной проблемы может стать выявление недостаточно изученных или неизученных природных источников биологически активных веществ, обладающих противоопухолевым потенциалом, с целью создания новых безопасных препаратов, эффективных в лечении онкологических заболеваний [Kousar *et al.*, 2022].

Эндوفитные микроорганизмы, бессимптомно обитающие во внутренних тканях большинства видов растений, играют важную роль в жизни

своих хозяев [Digra, Nonzom, 2023]. Состоящие в симбиотических отношениях с растениями эндофиты способны повышать их выживаемость в экстремальных условиях, защищая их от биотического и абиотического стресса, а также непосредственно или косвенно стимулировать рост растений, продуцируя фитогормоны или увеличивая доступность питательных веществ почвы для растений [Agrawal, Bhatt, 2023]. Эндофитные микроорганизмы являются резервуаром многих биологически активных метаболитов, таких как алкалоиды, фенольные соединения, стероиды, дубильные вещества, хиноны, терпеноиды, сапонины и многие другие вещества, которые обладают противоопухолевыми, антибактериальными, противогрибковыми, противовирусными, инсектицидными, антиоксидантными, иммуносупрессивными и другими полезными свойствами, и поэтому потенциально могут найти широкое применение во многих областях промышленности, сельского хозяйства и медицины [Shah *et al.*, 2023]. Внутренняя природа сложных взаимодействий между эндофитами, растениями-хозяевами и вредителями растений, опосредованных биологически активными соединениями, является основой для открытия новых природных биоактивных соединений [Majumdar *et al.*, 2020].

Хорошо известно, что лекарственные растения служат богатым источником фармакологически важных натуральных соединений с разнообразным терапевтическим потенциалом и имеют широкое применение в традиционной и современной медицине [Dar *et al.*, 2023]. Разумно предполагать, что эндофитные микроорганизмы, населяющие такие растения, как и их хозяева, способны продуцировать широкий спектр метаболитов, проявляющих различную биологическую активность, в том числе и противоопухолевую.

Вследствие этого, **целью** данной работы явилась характеристика цитотоксического действия экстрактов трех изолятов эндофитных микроорганизмов на клетки карциномы легкого человека.

В ходе работы решались следующие **задачи**:

1) Охарактеризовать морфологические и культуральные свойства трех изолятов эндофитных микроорганизмов, выделенных из тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.), тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) и цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.).

2) Определить цитотоксическую активность этилацетатных экстрактов культуральной жидкости изолятов эндофитных микроорганизмов в отношении опухолевых клеток линии A549.

3) Оценить влияние этилацетатных экстрактов культуральной жидкости изолятов эндофитных микроорганизмов на выживаемость клеток эпителия легкого коровы LEC.

## ВЫВОДЫ

1) Два изолята эндофитных актинобактерий, выделенные из корней тимьяна обыкновенного и тысячелистника обыкновенного, на основе MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа были идентифицированы как представители рода *Streptomyces*. Изолят эндофитных микромицетов CI 05 L, выделенный из листьев цикория обыкновенного, на основе морфологических и культуральных свойств был первично идентифицирован как представитель рода *Penicillium*.

2) Этилацетатные экстракты культуральной жидкости изолятов *Streptomyces sp.* TV 02 R, *Streptomyces sp.* AM 08 R и *Penicillium sp.* CI 05 L обладают дозозависимым цитотоксическим эффектом в отношении линии клеток карциномы легкого человека A549 со значениями  $IC_{50}$  1137.9, 602.2 и 138.5 мкг/мл, соответственно. Экстракт TV 02 R в концентрации 3000 мкг/мл вызывает гибель 50% опухолевых клеток. Экстракт AM 08 R в концентрации 2500 мкг/мл подавляет жизнедеятельность клеток A549 на 88%. Выживаемость раковых клеток при действии экстракта CI 05 L в концентрации 250 мкг/мл составила 7.92%.

3) Выживаемость клеток эпителия легкого коровы LEC при воздействии этилацетатных экстрактов культуральной жидкости изолятов *Streptomyces sp.* TV 02 R, *Streptomyces sp.* AM 08 R и *Penicillium sp.* CI 05 L сравнительно выше таковой для клеток карциномы легкого человека. Значение  $IC_{50}$  для данных экстрактов в отношении клеток линии LEC составило 1154.1, 744.9 и 167.5 мкг/мл, соответственно.