

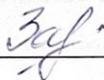
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

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



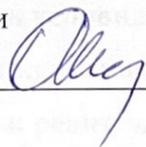
Залилова Ю.М.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



Карамова Н.С.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

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

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
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	32
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
ВЫВОДЫ.....	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47

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].

Эндофитные 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.