

## ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ *NIGELLA SATIVA*, *SALVIA OFFICINALIS* И ПЕПТИДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *STREPTOMYCES MIRABILIS* FK749 ПРОТИВ РАКОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ HELA И MCF-7

С.М.А. Эльшафей<sup>1,2</sup>, А.А. Абдельрахман<sup>1,2</sup>, Ш.Д. Валидов<sup>1</sup>, А.Г. Бикмуллин<sup>1</sup>, Э.Р. Санатова<sup>1</sup>, Л.М. Залыютдинова<sup>1</sup>, А.Н. Фаттахова<sup>1</sup>, Ф.К. Алимова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Университет Минья, Эль-Минья, Египет

### Cytotoxic activity of plant oils of *Nigella sativa*, *Salvia officinalis* and peptide metabolites of *Streptomyces mirabilis* FK749 against HeLa and MCF-7 cancer cell lines

S.M.A. El-Shafei<sup>1,2</sup>, A.A. Abd El-Rahman<sup>1,2</sup>, S.Z. Validov<sup>1</sup>, A.G. Bikmullin<sup>1</sup>, E.R. Sanatova<sup>1</sup>, L.M. Zalyalyutdinova<sup>1</sup>, A.N. Fattakhova<sup>1</sup>, F.K. Alimova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Minia University, El-Minia, Egypt

В последние годы наблюдается существенное расширение использования растительного сырья и метаболитов микроорганизмов для разработки новых медицинских препаратов и способов лечения опухолевых заболеваний. В связи с этим, в данной работе проведено изучение цитотоксической активности масел *Nigella Sativa* (NS), *Salvia officinalis* (SO) и пептидных метаболитов *Streptomyces mirabilis* FK749 по отношению к жизнеспособности линий клеток HeLa и MCF-7. Для достижения этой цели, клетки подвергались воздействию масел и фракции пептидных метаболитов (ФПМ) в концентрациях 0, 20, 40, 60, 80 и 100 мг/мл. После 24 ч инкубации было изучено влияние масел и ФПМ *S. mirabilis* FK749 на жизнеспособность клеточных линий путем окрашивания трипановым синим, апоптотическая активность масел и ФПМ *S. mirabilis* FK749 путем окрашивания TMRE, а также изменения в морфологии клеток. Кроме того, определялись средние токсические дозы исследуемых образцов в течение 72 ч. Показано, что обработка маслами NS, SO и ФПМ *S. mirabilis* FK749 приводит к снижению жизнеспособности клеток в диапазоне концентраций от 40 до 100 мг/мл. Изменение морфологии клеток при обработке маслами NS, SO и ФПМ *S. mirabilis* FK749 носит зависимый от концентрации характер. Линия клеток HeLa оказалась наиболее устойчивой к воздействию компонентов масел и ФПМ *S. mirabilis* FK749, чем линия клеток MCF-7.

**Ключевые слова:** *Nigella sativa*, *Salvia officinalis*, *Streptomyces mirabilis*, HeLa, MCF-7, цитотоксическая активность.

Растительные препараты имеют важное значение в разработке современных инновационных технологий не только в области растениеводства и животноводства, но и в медицине и природоохранной сфере [1–3]. Известно, что препараты на основе натуральных веществ с конца XX века занимают все большее место в разработке современных инновационных технологий [4].

Тмин черный (*Nigella sativa*, NS) является одной из традиционно используемых трав, с определенными целебными свойствами. NS — однолетнее цветущее растение родом из юго-западной Азии, культивируемое в средних регионах Восточного Средиземноморья, на юге Европы, в Сирии, Турции, Саудовской Аравии, Пакистане и Индии [5]. С давних времен ученые изучали воздействие черного тмина на человека, особенно его роль в процессе заживления ран. При изучении состава семян тмина было обнаружено, что тмин содержит множество

В последние годы наблюдается существенное расширение использования растительного сырья и метаболитов микроорганизмов для разработки новых медицинских препаратов и способов лечения опухолевых заболеваний. В связи с этим, в данной работе проведено изучение цитотоксической активности масел *Nigella Sativa* (NS), *Salvia officinalis* (SO) и пептидных метаболитов *Streptomyces mirabilis* FK749 по отношению к жизнеспособности линий клеток HeLa и MCF-7. Для достижения этой цели, клетки подвергались воздействию масел и фракции пептидных метаболитов (ФПМ) в концентрациях 0, 20, 40, 60, 80 и 100 мг/мл. После 24 ч инкубации было изучено влияние масел и ФПМ *S. mirabilis* FK749 на жизнеспособность клеточных линий путем окрашивания трипановым синим, апоптотическая активность масел и ФПМ *S. mirabilis* FK749 путем окрашивания TMRE, а также изменения в морфологии клеток. Кроме того, определялись средние токсические дозы исследуемых образцов в течение 72 ч. Показано, что обработка маслами NS, SO и ФПМ *S. mirabilis* FK749 приводит к снижению жизнеспособности клеток в диапазоне концентраций от 40 до 100 мг/мл. Изменение морфологии клеток при обработке маслами NS, SO и ФПМ *S. mirabilis* FK749 носит зависимый от концентрации характер. Линия клеток HeLa оказалась наиболее устойчивой к воздействию компонентов масел и ФПМ *S. mirabilis* FK749, чем линия клеток MCF-7.

**Key words:** *Nigella sativa*, *Salvia officinalis*, *Streptomyces mirabilis*, HeLa, MCF-7, cytotoxic activity.

витаминов, минералов и растительного протеина, а также жирные нерастворимые кислоты, важные для здоровья кожи, волос и слизистой оболочки носа, которые уравнивают выработку гормонов и положительно влияют на жизненно важные функции организма [6].

Шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*, SO) — лекарственное растение, культивируемое в Крыму, Украине, на Северном Кавказе и в Молдавии [7]. Оно используется как вяжущее, бактерицидное и противовоспалительное средство в форме настоя, в составе грудных сборов. Лечебный эффект препаратов шалфея лекарственного связан с присутствием в их составе эфирного масла и дубильных веществ, причем компоненты эфирного масла считаются главными биологически активными веществами [8].

Актиномицеты рода *Streptomyces* являются эффективными промышленными продуцентами антибиотиков. В последние годы интерес к стрептомицетам

возрос в связи с потенциальным использованием их в качестве продуцентов фракции пептидных метаболитов (ФПМ), обладающих антибиотической и противоопухолевой активностями [9].

В связи с вышеизложенным, в настоящей работе предпринята попытка к дальнейшей оценке цитотоксического действия масел *NS*, *SO* и ФПМ *S. mirabilis FK749* на жизнеспособность линий клеток HeLa и MCF-7.

### Материал и методы

Объектом исследования явились клеточные линии HeLa и MCF-7, которые были предоставлены научно-образовательным центром фармацевтики «ФАРМА 2020» Казанского федерального университета. Растительные масла *NS* и *SO* являются коммерческими препаратами фирмы El Nawag Factory (Египет).

Штамм *Streptomyces mirabilis FK 749* был выделен в лаборатории прикладной биохимии Казанского Федерального Университета из дерново-подзолистых почв Елабужского лесничества республики Татарстан. Генетическая идентификация проводилась в лаборатории генетического анализа КФУ. ФПМ *S. mirabilis FK 749* была выделена из культуральной жидкости методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Фракция содержит метаболиты белковой природы молекулярной массы в диапазоне 680-1800 Da.

Клетки выращивали в среде DMEM (дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), 0,5% пенициллина-стрептомицина и 0,5% L-глутамин 200 mM). Инкубировали в увлажненном инкубаторе (ESCO, CelCulture, CO<sub>2</sub>-инкубатор) с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Перед началом экспериментов оценивали жизнеспособность клеток.

Для приготовления растворов исследуемых масел 1 мл масла растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО), взбалтывали. Из полученного раствора готовили смесь масло-ДМСО и Full- $\alpha$ -DMEM из расчета 1:100, соответственно.

#### Анализ жизнеспособности клеток

Клетки HeLa и MCF-7 высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 0,5×10<sup>5</sup> клеток/мл. Через 24 ч заменили питательную среду, добавив тестируемые соединения в различных концентрациях (0, 20, 40, 60, 80 и 100 мг/мл) и инкубировали еще 24 ч. Определяли жизнеспособность клеток методом исключения красителя трипанового синего. Живые клетки не проницаемы для красителей, а мертвые клетки проницаемы и поэтому окрашиваются. Для определения количества живых клеток были смешаны равные количества (~40  $\mu$ l) суспензии клеток и 0,4% (w/v) раствора красителя в HBSS. 10  $\mu$ l смеси вносили под покровное стекло камеры Горяева. Долю жизнеспособных клеток определяли по формуле [10]:

$$V = \frac{(a - b) \times 100\%}{a},$$

где *a* – общее количество клеток; *b* – количество мертвых клеток.

#### Анализ цитотоксичности

Клетки высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 0,5×10<sup>5</sup> кл/мл. Через 24 ч заменяли питательную среду, добавив тестируемые соеди-

нения в различных концентрациях, и инкубировали в течение 72 ч. После культивирования питательную среду заменяли на свежую, содержащую реагент 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия бромид – МТТ, растворенный в 1,7мМ фосфатном солевом буфере (ФСБ) в конечной концентрации 0,5 мг/мл и pH = 7,4. После 4 ч инкубации среду с красителем аспирировали и добавили ДМСО для растворения продукта восстановления МТТ жизнеспособными клетками – формазана. Регистрация продукта восстановления МТТ проводилась на микропланшетном ридере (TECAN Infinite M200 Pro) при длине волны 555 нм. За ингибирующую концентрацию (IC50) принималась концентрация тестируемых веществ, вызывающая ингибирование роста клеток на 50% относительно контроля с использованием линейной регрессии кривых доза-ответ по SOFTmaxPro [10].

#### Оценка изменения морфологии клеток

Клетки высевали в 48-луночные планшеты в концентрации 1×10<sup>5</sup> кл/мл. Через 24 ч питательная среда была заменена на новую, содержащую тестируемые вещества в различных концентрациях. Инкубировали следующие 24 ч. Удалили среду с веществами, заливали клетки раствором Хэнкса. Изменения в морфологии клеток под воздействием масел и пептидных метаболитов оценивали с помощью оптического микроскопа (Zeiss Axio Vert. A1) [11].

#### TMRE-анализ мембранного потенциала митохондрий клеток

TMRE-краситель применим для оценки митохондриального мембранного потенциала клеток в методах проточной цитометрии, планшетной спектрофотометрии и флуоресцентной микроскопии. Для проведения данной оценки клетки высевали в 48-луночные планшеты в концентрации 1×10<sup>5</sup> кл/мл. Через 24 ч питательная среда была заменена на новую, содержащую тестируемые вещества в различных концентрациях. Инкубировали следующие 24 ч. Удалили среду с веществами, залили клетки раствором Хэнкса.

Затем в каждую лунку последовательно были внесены 100 нМ FCCP (carbonilcyanide p-trifluoro methoxyphenylhydrazone) и TMRE до конечной концентрации 50–1000 нМ (важно, чтобы TMRE был доведен до комнатной температуры). После этого следовала инкубация при 37°C в течение 20 мин. Затем клетки были отмыты 0,2% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБ. Затем проводилось измерение флуоресценции клеток на флуоресцентном цитометре (Guava easycyte 8ht). Длина волны возбуждения равна 549 нм, испускания – 575 нм.

#### Статистический анализ

Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ SPSS версия 17. На первом этапе определяли вид распределения количественных признаков. Затем методами описательной статистики рассчитывали средние значения, средние квадратические отклонения, медианы,

межквартильные интервалы. Статистическую значимость различий определяли с использованием ANOVA. Результаты представлены как среднее значение и стандартное отклонение. Нулевую гипотезу отклоняли при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Для решения прикладных задач в современной цитологии требуется оценка параметров клеток, которые определяют жизнеспособность их популяций [12]. В связи с этим нами было изучено влияние растительных масел *NS*, *SO* и ФПМ *S. mirabilis FK 749* на жизнеспособность клеток HeLa и MCF-7. До инкубации с исследуемыми веществами жизнеспособность клеток составляла более 95%.

Было установлено, что концентрация масла *NS*, наиболее сильно снижающая жизнеспособность клеток HeLa и MCF-7, равна 100 мг/мл. При данной концентрации жизнеспособность клеток HeLa и MCF-7 достоверно снижается на 68% и 50%, соответственно, относительно контроля. Кроме того, нами было выявлено, что масло *NS* не влияет на жизнеспособность клеток MCF-7 в концентрациях 20 и 40 мг/мл (рис. 1А).

Обработка маслом *SO* клеток HeLa в концентрациях 20 и 40 мг/мл приводила к повышению жизнеспособности на 9,27% и 7,5%, соответственно. При этом, масло *SO* достоверно снижало жизнеспособ-

ность клеток HeLa и MCF-7 при концентрациях 100 и 80 мг/мл на 55,5 и 62,13%, соответственно, относительно контроля (рис. 1Б).

При обработке клеточных линий HeLa фракцией пептидных метаболитов *S. mirabilis FK 749* в концентрации 20 мг/мл и 100 мг/мл наблюдалось наибольшее снижение жизнеспособности – на 39,55% и 59,7%, соответственно. В случае с клеточной линией MCF-7 наибольшее снижение жизнеспособности выявлялось при концентрации метаболитов 60 мг/мл и 80 мг/мл: 66,62% и 50,04%, соответственно (рис. 1В).

Данные результаты убедительно доказывают, что масла *NS*, *SO* и ФПМ *S. mirabilis FK 749* в дозозависимой манере снижают жизнеспособность клеток HeLa и MCF-7.

На следующем этапе исследования мы определили ингибирующую концентрацию (IC50), за которую принималась концентрация тестируемых веществ, вызывающая снижение пролиферативной активности клеток на 50% по сравнению с контролем с помощью МТТ-теста. Нами было показано, что через 72 ч средняя токсическая доза масла *NS* для линии клеток HeLa и MCF-7 составила 1,70 мг/мл и 1,49 мг/мл, соответственно, а средняя токсическая доза масла *SO* – 5,66 и 0,68 мг/мл, соответственно. В случае ФПМ *S. mirabilis FK 749* концентрация составила 26,44 и 10,12, соответственно (рис. 2).

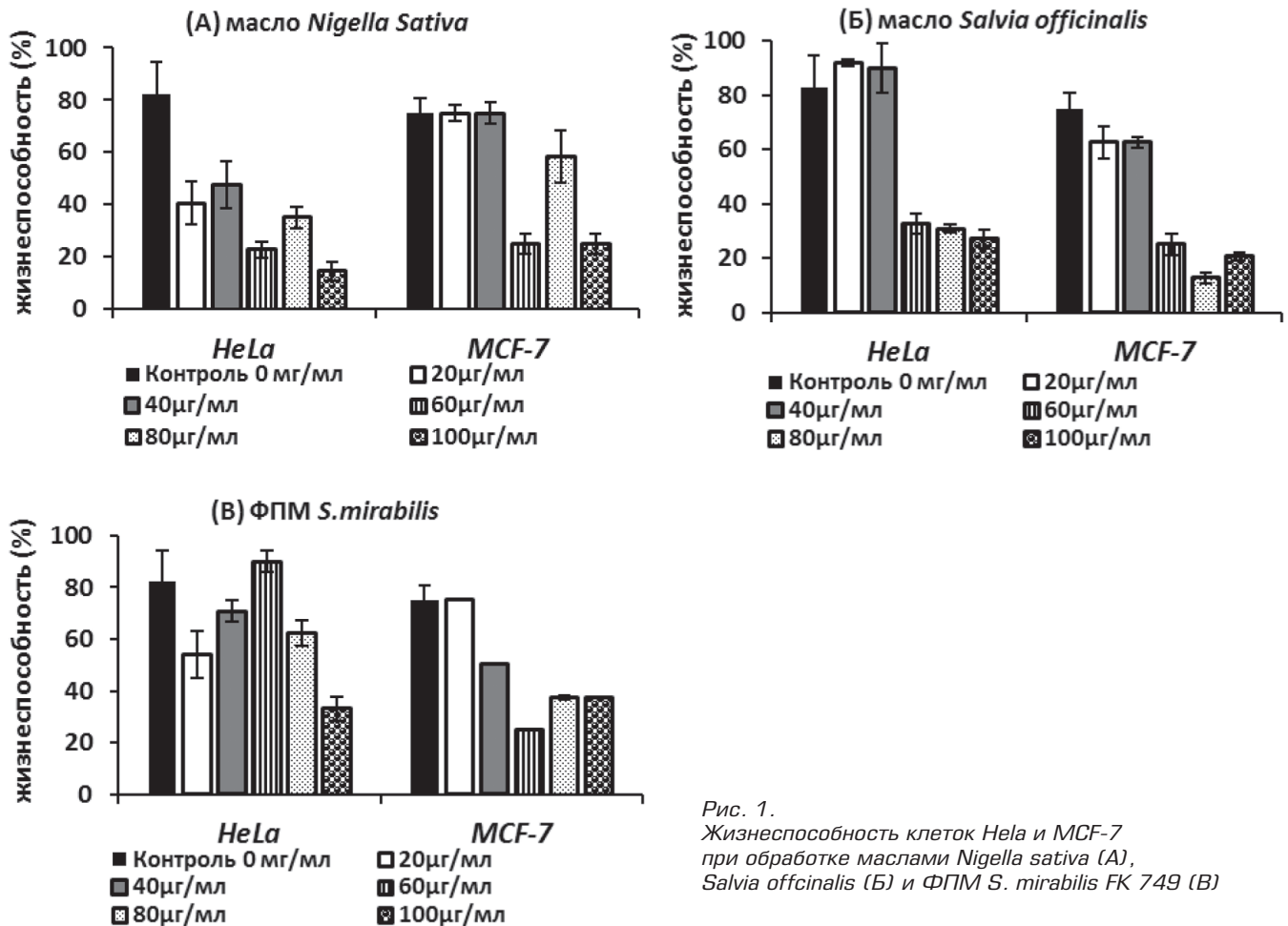


Рис. 1. Жизнеспособность клеток HeLa и MCF-7 при обработке маслами *Nigella sativa* (А), *Salvia officinalis* (Б) и ФПМ *S. mirabilis FK 749* (В)

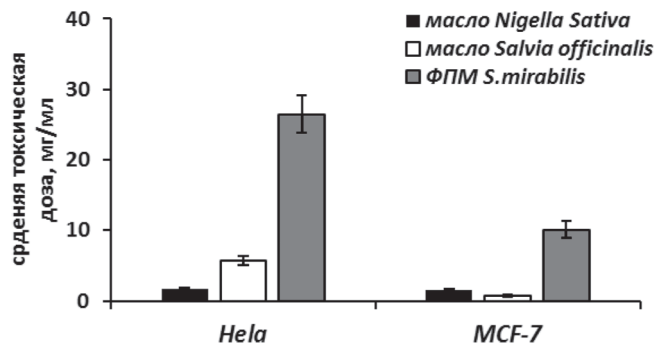


Рис. 2. Средняя токсическая доза (мг/мл) масел *Nigella sativa*, *Salvia officinalis* и ФПМ *S. mirabilis* FK 749 для клеток HeLa и MCF-7 в течение 72 ч экспозиции

Следует заметить, что наибольшее значение IC<sub>50</sub> относительно клеточных линий HeLa и MCF-7 наблюдалось у ФПМ *S. mirabilis* FK 749, в отличие от масел SO и NS. Также полученные результаты указывают на то, что линия клеток HeLa оказалась наиболее устойчивой к воздействию ФПМ *S. mirabilis* FK 749, чем MCF-7. Кроме того, SO менее токсично в отношении клеток HeLa и MCF-7, чем масло NS, а клетки HeLa более устойчивы к токсическому действию масел, чем клетки MCF-7.

Известно, что внешний вид клеток может дать различную информацию о них, в том числе о содержании в них определенных веществ и о внутриклеточной структуре [12]. Поэтому нами было изучено действие исследуемых масел и метаболитов на морфологию клеток. Изучая изменения в морфологии, мы отметили ослабление межклеточных контактов.

Клетки обрабатывались исследуемыми маслами и ФПМ *S. mirabilis* FK 749 в концентрациях от 20 до 100 мг/мл, затем был проведен визуальный анализ с помощью оптического микроскопа (Zeiss Axio Vert. A1) (×40). Фотографирование проводилось при помощи встроенной цифровой камеры.

Изменение в морфологии при обработке клеток маслами NS, SO и ФПМ *S. mirabilis* FK749 носило зависимый от концентрации характер. Нами было выявлено, что при обработке линии клеток HeLa исследуемыми маслами (рис. 3А, Б), наблюдалось изменение в морфологии клеток: они приобретали округлую форму и уменьшались в размерах, пропадали межклеточные контакты; клетки обособлялись. При обработке клеток HeLa фракцией пептидных метаболитов *S. mirabilis* FK 749 в концентрации 20 мкг/мкл и 100 мкг/мкл можно отметить, что с увеличением концентрации ФПМ происходили аналогичные изменения, а также деградация клеточных мембран (рис. 3В).

Кроме того, при обработке линии клеток MCF-7 маслом NS происходило увеличение размеров клеток с появлением различных, нехарактерных для них «выростов» цитоплазматической мембраны (рис. 4А). При концентрации NS выше 80 мг/мл происходило уменьшение размеров и гибель клеток. Масло SO (рис. 4Б) оказывало негативное воздействие уже при концентрации 60 мг/мл: клетки округлялись, откреплялись от дна лунки планшета и плавали в толще среды, т.е. погибали. При обработке клеток MCF-7 ФПМ *S. mirabilis* FK 749 в концентрации 60 мкг/мкл и 80 мкг/мкл, с увеличением концентрации уменьшался объем клеток, происходила потеря контактов между ними. Клетки приобретали округлую форму, наблюдалась деградация клеточных мембран (рис. 4В).

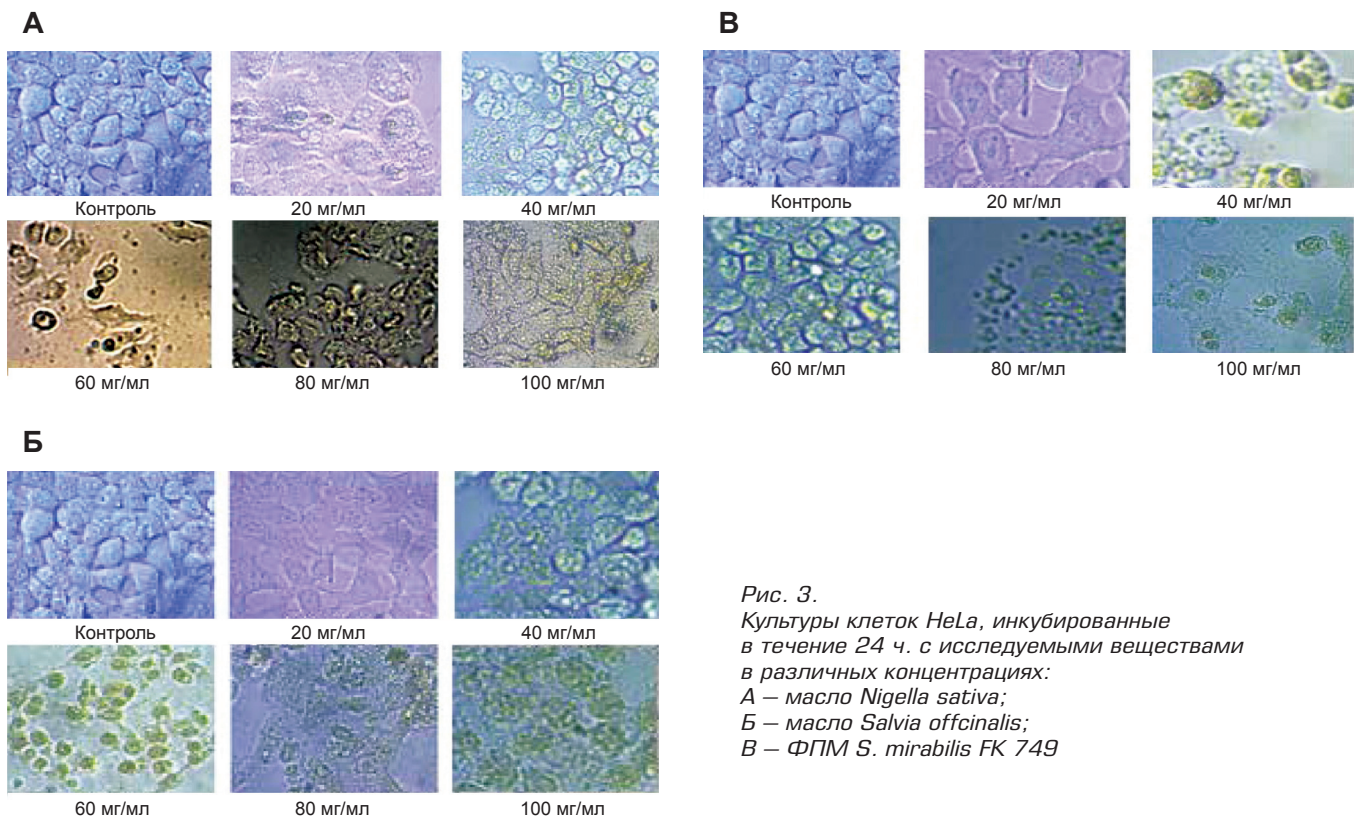


Рис. 3. Культуры клеток HeLa, инкубированные в течение 24 ч. с исследуемыми веществами в различных концентрациях: А – масло *Nigella sativa*; Б – масло *Salvia officinalis*; В – ФПМ *S. mirabilis* FK 749

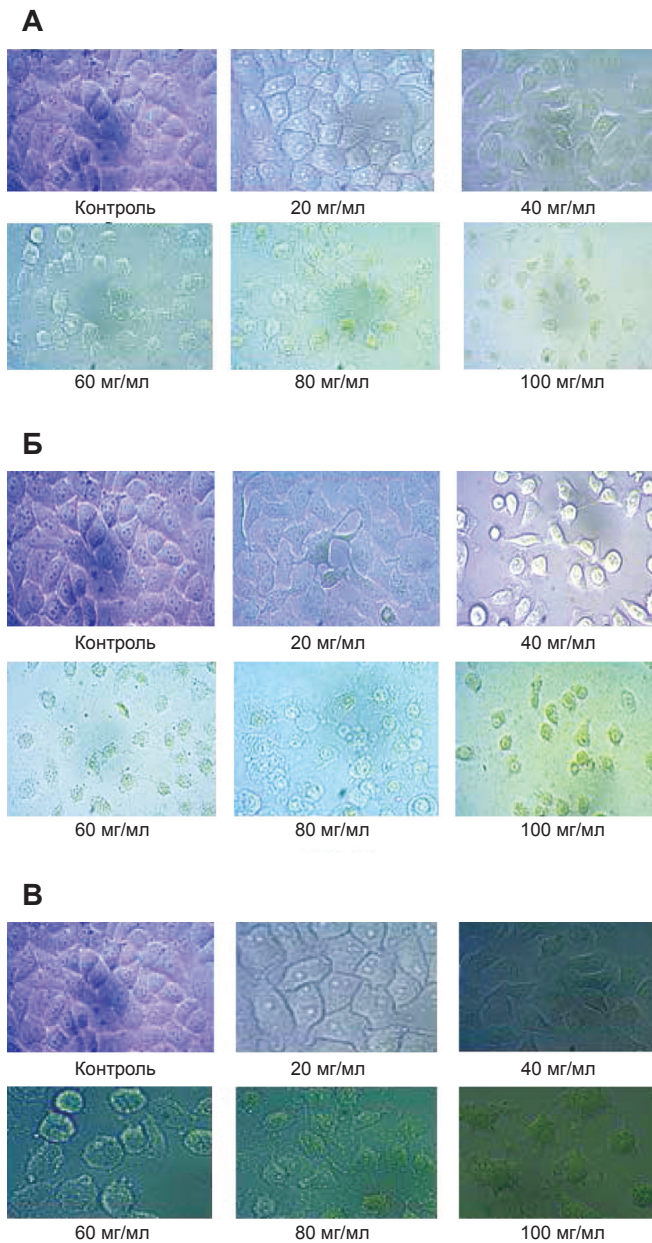


Рис. 4. Культуры клеток MCF-7, инкубированные в течение 24 ч с исследуемыми веществами в различных концентрациях:

А – масло *Nigella sativa*;

Б – масло *Salvia officinalis*;

В – ФПМ *S. mirabilis* FK 749

Апоптоз играет центральную роль в регуляции гомеостаза нормальной ткани и принимает участие в устранении потенциально опасных клеток, в том числе и предшественников опухолевых клеток. В настоящее время большинство противоопухолевых агентов воздействуют на трансформированные клетки через стимуляцию их проапоптотических механизмов. Процессы гибели клетки в результате апоптоза и её выход из клеточного цикла скоординированы друг с другом. Действительно эти механизмы важны для регуляции клеточного цикла и влияя на процесс клеточной смерти [13]. Митохондрия играет важную роль в регуляции процесса апоптоза. В частности, на ранних стадиях апоптоза наблюдалось выделение нескольких белков, в том числе цитохрома-с

и апоптоз-индуцирующего фактора, обычно расположенных в межмембранном пространстве [14]. Это связано с изменением проницаемости митохондриальной мембраны. Исходя из вышесказанного, нами была поставлена задача определить действие исследуемых нами препаратов на мембранный потенциал митохондрий клеток.

Величину мембранного потенциала митохондрий и количество апоптотических/некротических клеток после культивирования с препаратами оценивали методом проточной цитометрии – по флуоресценции 100 нМ TMRE (этилового эфира тетраметилродамина).

TMRE представляет собой проникающий в клетку положительно заряженный красно-оранжевый краситель, который быстро накапливается в активных митохондриях, так как они имеют относительно отрицательный заряд. Деполяризованные или неактивные митохондрии, имеющие сниженный мембранный потенциал, не в состоянии изолировать TMRE.

ФССР (карбонил цианида 4-(трифторметокси)фенилгидразон) представляет собой ионофор-разобщитель окислительного фосфорилирования. Обработка клетки с ФССР устраняет митохондриальный мембранный потенциал и, соответственно, окрашивание TMRE. TMRE подходит для маркировки митохондрий в живых клетках и не совместим с фиксацией.

Нами было показано, что в контрольной пробе HeLa – клетках без обработки – доля мертвых клеток составила 24,1% (рис. 5А). В наибольшей степени стимулировало апоптотическую активность клеток HeLa масло SO – доля позитивных, т.е. мертвых клеток в пробе достигала 64,9% (рис. 5В). Доля клеток в состоянии апоптоза при обработке маслом NS и ФПМ *S. mirabilis* FK749 составила 59,5 и 53,5%, соответственно (рис 5Б, Г).

В контрольной пробе MCF-7 доля погибших клеток составила 22,6% (рис. 6А). Наибольшей апоптотической активностью также обладало масло SO – доля погибших клеток достигала 37,4% (рис. 6В). Доля позитивных клеток при обработке маслом NS и ФПМ *S. mirabilis* FK749 составил 28,2 и 28,3%, соответственно (рис. 6Б, Г).

Исходя из полученных данных можно предположить, что тестируемые нами препараты: масла NS и SO, а также ФПМ *S. mirabilis* FK749 – стимулировали процесс апоптоза в раковых клетках HeLa и MCF-7. Данные представляют особый интерес, хотя требуются дальнейшие исследования для определения их потенциального возможного терапевтического применения.

Таким образом, результаты данного исследования заключаются в том, что обработка клеток HeLa и MCF-7 маслами NS, SO и ФПМ *S. mirabilis* FK749 приводила к снижению жизнеспособности в диапазоне концентраций от 40 до 100 мг/мл. Масло NS обладало большей токсичностью по отношению к клеткам линий HeLa и MCF-7, по сравнению с маслом SO и ФПМ *S. mirabilis* FK 749. Наименьшая токсичность наблюдалась у пептидных метаболитов. Изменение морфологии клеток при обработке маслами NS, SO и ФПМ *S. mirabilis* FK749 носило дозозависимый характер. При всех видах обработки наблюдалось уменьшение межклеточных контактов, открепление клеток от поверхности культового пластика.

Выполненные исследования не позволяют в полной мере постулировать противоопухолевый эффект исследованных веществ NS, SO и ФПМ *S. mirabilis FK749*, так как их влияние определялось только

на линии трансформированных клеток. В этой связи, требуется проведение дальнейших исследований, включающих сравнение биологических эффектов масел и ФПМ на линии опухолевых и нормальных клеток.

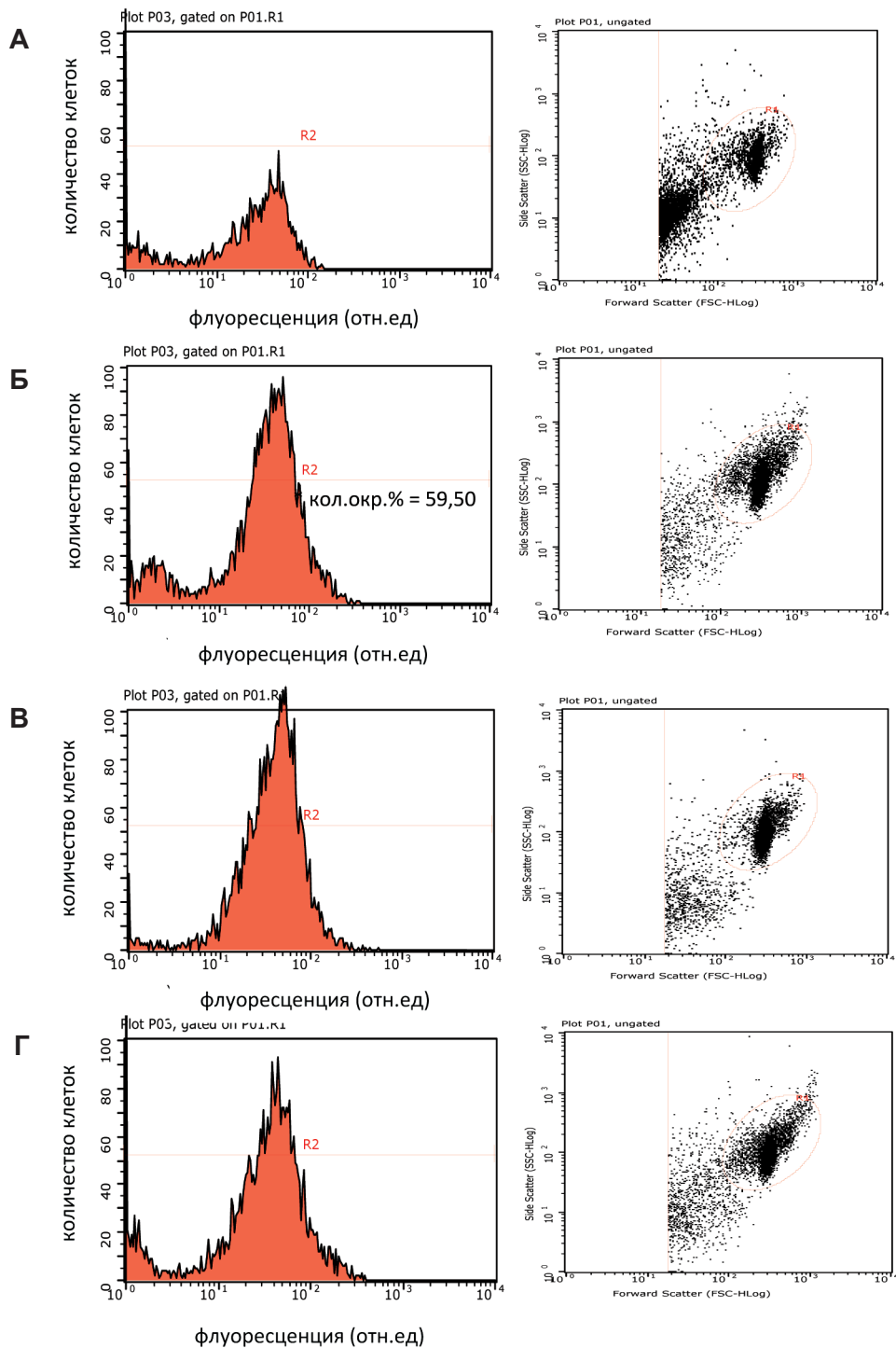


Рис. 5. Распределение флуоресценции 100 нМ TMRE в клетках HeLa после инкубирования с исследуемыми веществами: А – контроль (культура без дополнительных веществ); Б – масло *Nigella sativa*; В – масло *Salvia officinalis*; Г – ФПМ *S. mirabilis FK 749*. Проточная цитометрия.

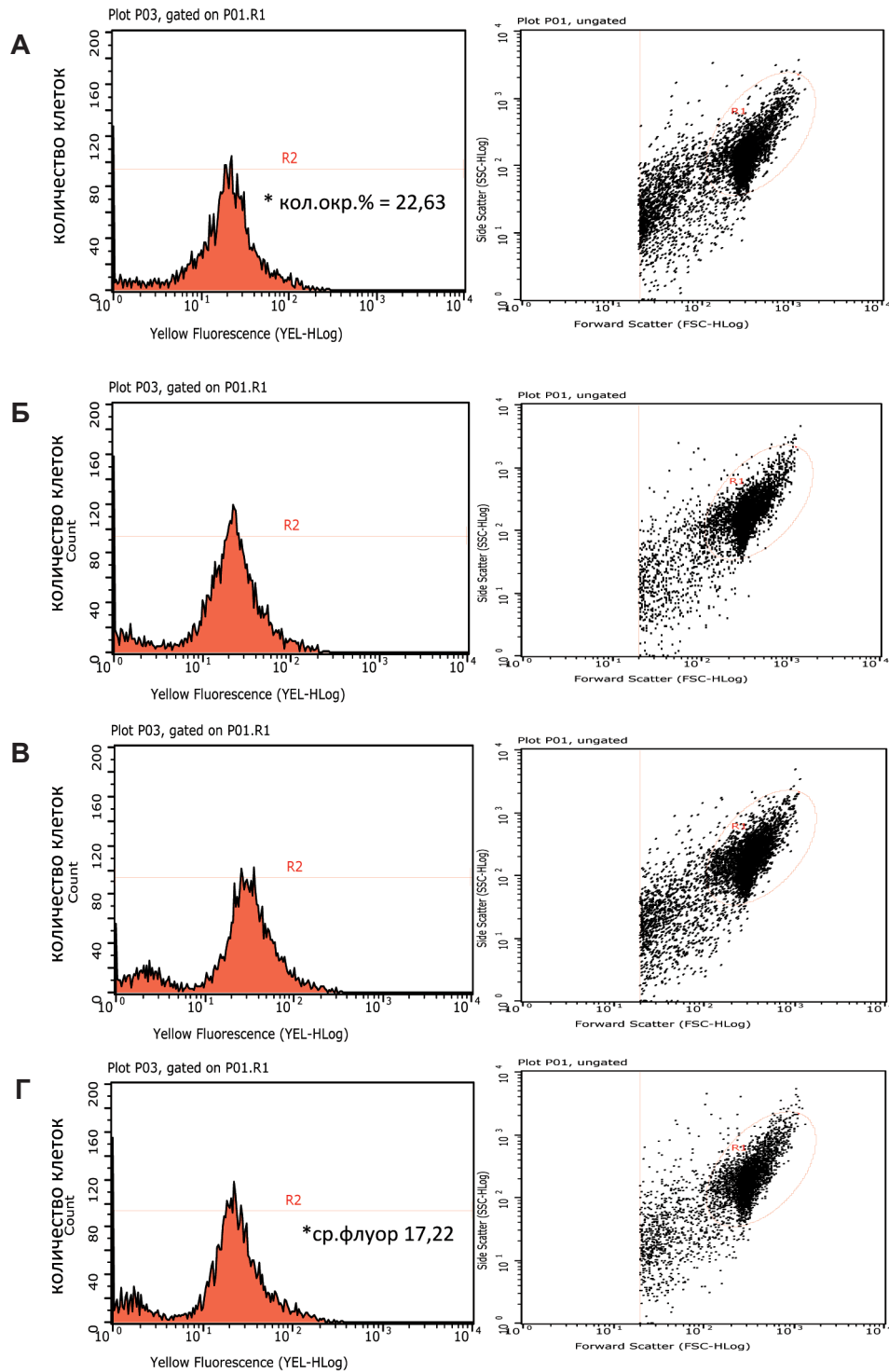


Рис. 6. Распределение флуоресценции 100 нМ TMRE в клетках MCF-7 после инкубирования с исследуемыми веществами:

А – контроль (культура без дополнительных веществ);

Б – масло *Nigella sativa*;

В – масло *Salvia officinalis*;

Г – ФПМ *S. mirabilis* FK 749.

Проточная цитометрия

### Благодарности

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образова-

тельных центров. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Алимова Ф.К., Тазетдинова Д.И., Тухбатова Р.И. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*: учебно-методическое пособие. Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина; 2007.
2. Атаханов А.Ш. Получение лекарственных препаратов на основе растительного сырья чистеца (сухой экстракт, таблетки) [диссертация]. Ташкент: Ташкентский фармацевтический институт; 2009.
3. Киселёва И.А., Тёплая Е.В. Каминский применение растительного препарата «альба» в лечении больных с патологией щитовидной железы. *Врачебное дело* 2012; 8: 1–4.
4. Воронина Л.П., Якименко О.С., Терехова В.А. Оценка биологической активности промышленных гуминовых препаратов. *Агрехимия* 2012; 6: 50–7.
5. Zaman R.U., Akhtar M.S., Khan M.S. Gastroprotective and anti-secretory effect of *Nigella sativa* seed and its extracts in indomethacin-treated rats. *Pak. J. Biol. Sci.* 2004; 7: 995–1000.
6. Llaiyaraja N., Khanum F. *Nigella Sativa* L: a review of therapeutic applications. *J. Herb. Med. Toxicol.* 2010; 4: 1–8.
7. Гуринович Л.К., Пучкова Т.В. Эфирные масла: химия, анализ и применение. Москва: Школа косметических химиков; 2005.
8. Wen L.X., Hedge I.C. *Salvia L.* *Flora of China* 1994; 17: 195–222.
9. Um S., Choi T.J., Kim H. et al. Ohmyungamycins A and B: cytotoxic and antimicrobial cyclic peptides produced by *Streptomyces* sp. from a volcanic island. *J. Org. Chem.* 2013; 20; 78(24): 12321–9.
10. Patel S., Cheewala N., Suthar A. et al. In vitro cytotoxicity of *Solanum nigrum* extract against HeLa cell line and Vero cell line. *Inter. J. Pharm. Sci.* 2009; 1: 38–46.
11. Al-Sheddi E.S., Farshori N.N., Al-Oqail M.M. et al. Cytotoxicity of *Nigella Sativa* Seed Oil and extract against human lung cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014; 15: 983–7.
12. Герасимов И.Г., Попандопуло А.Г. Оценка жизнеспособности клеток по их морфометрическим параметрам на примере культивируемых фибробластов. *Цитология* 2007; 49: 204–9.
13. Evan G.I., Vousden K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342–8.
14. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770–6.

Поступила 12.08.2015