



УДК 615.275.4; 582.926.1; 576.3

КЛЕТОЧНАЯ БИОДОСТУПНОСТЬ КУМАРИНОВ БОРЩЕВИКА СОСНОВСКОГО

Лукашов Р.И.¹, Лавровский А.В.¹, Боброва Н.М.²,
Северин И.Н.², Дорошенко Т.М.², Портянко А.С.²

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н.Н. Александрова

Кумарины растений рода *Heracleum*, в частности борщевика Сосновского (*Heracleum Sosnowskyi Manden.*), представляют значительный интерес как потенциальные противоопухолевые агенты природного происхождения. Цель исследования заключалась в определении степени клеточной биодоступности кумаринов, содержащихся в извлечениях из различных частей растения, и установлении взаимосвязи между поглощением активных веществ и ингибированием пролиферации опухолевых клеток. Оценку биодоступности проводили *in vitro* на клеточных линиях ZR-75 (карцинома молочной железы), HROG04 (gliобластома), NIH:OVCAR-3 (адено-карцинома яичников) и нормальных фибробластах Bj-hTERT. Количественный анализ остаточных кумаринов в культуральной жидкости после инкубации с клетками выполняли методом ВЭЖХ. Экстракти борщевика Сосновского проявляют избирательную цитостатическую активность: нормальные фибробlastы Bj-hTERT относительно устойчивы к их действию, тогда как опухолевые клетки характеризуются высокой чувствительностью (процент подавления роста опухолевых клеток до 92,1%). Кумариновые соединения, особенно ксантолоксин и бергаптен, эффективно проникают внутри клеток, преимущественно опухолевых, что указывает на высокую клеточную биодоступность. Однако между уровнем поглощения и выраженностю цитостатического эффекта прямой зависимости не выявлено: активность кумаринов сохраняется даже при низких внутриклеточных концентрациях. Селективное поглощение кумаринов опухолевыми клетками подтверждает перспективность дальнейшего изучения борщевика Сосновского и его вторичных метаболитов, как потенциальных противоопухолевых агентов.

Ключевые слова: кумарины; клеточная биодоступность; борщевик Сосновского; опухолевые клеточные линии; ВЭЖХ.

Введение. Злокачественные новообразования остаются одной из наиболее значимых медико-социальных проблем современности, занимая второе место среди причин смертности населения после сердечно-сосудистых заболеваний. По данным ВОЗ, ежегодно от онкологических заболеваний умирает свыше 10 миллионов человек, и эта цифра продолжает расти. При этом более 70 % летальных исходов приходится на страны со средне-низким уровнем доходов. Высокая распространенность опухолей молочной железы, яичников и головного мозга в сочетании с возрастанием резистентности к существующим химиотерапевтическим лекарственным препаратам подчеркивает необходимость поиска инновационных противоопухолевых агентов с избирательной цитотоксичностью и оптимальным профилем безопасности [1].

Особый научный интерес в онкофармакологии представляют вторичные метаболиты растительного происхождения, прежде всего фенольные соединения. К числу таких соединений относятся кумарины – природные

производные бензо- α -пирона, характеризующиеся широким спектром фармакологической активности. Результаты исследований цитостатической активности кумаринов *in vitro* демонстрируют эффективность в отношении подавления роста различных линий опухолевых клеток [2].

Перспективным источником соединений кумариновой природы являются представители рода *Heracleum* L., семейство *Apiaceae*, в частности борщевик Сосновского (*Heracleum Sosnowskyi Manden.*), отличающийся высоким содержанием фуранокумаринов. В предыдущем исследовании, направленном на изучение цитостатического действия извлечений, полученных из различных частей данного растения, установлена выраженная противоопухолевая активность в отношении клеток карциномы молочной железы, глиобластомы и адено-карциномы яичников. Однако ключевым фактором, определяющим эффективность биологически активных соединений, является их способность взаимодействовать с клетками-мишениями и накапливаться в концентра-

циях, необходимых для реализации фармакологического эффекта или метаболизироваться до активных веществ [3; 4].

Целью настоящего исследования является изучение клеточной биодоступности кумаринов борщевика Сосновского в отношении различных линий опухолевых и нормальных клеток *in vitro* и установление зависимости между уровнем поглощения кумаринов и степенью ингибирования пролиферативной активности клеток.

Материалы и методы. В качестве испытуемых извлечений использовали полученные ранее извлечения из травы, корней и соцветий борщевика Сосновского [4]. Исследование выполняли на клеточных линиях ZR-75 (карцинома молочной железы), HROG04 (глиобластома), NIH:OVCAR-3 (аденокарцинома яичников) и нормальных клетках Bj-hTERT (иммортализованные фибробласты крайней плоти).

Для оценки клеточной биодоступности подготовлены три типа проб. Исследуемые образцы представляли собой культуральные жидкости, полученные после инкубации клеточных линий в питательной среде с добавлением испытуемых извлечений. В качестве контрольных образцов использовали два типа растворов: первый – подготовленные в тех же условиях, но без добавления клеток, что позволяло оценить изменения в составе извлечений; второй – культуральные жидкости, полученные после инкубации клеток в среде без извлечений, с целью исключения вклада питательных компонентов среды в хроматографические профили. Оценка цитостатической активности и условия культивирования проводили по методике, ранее апробированной в рамках исследования на других клеточных линиях [4].

Для оценки степени поглощения индивидуальных веществ использован метод высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Хроматографирование осуществляли на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США). Условия хроматографирования: колонка внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная *силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р* с размером частиц 5 мкм, температура колонки – 25 °С, подвижные фазы: А – ацетонитрил; В – 0,5 %-ая ортофосфорная кислота (в градиентном режиме элюирования: 0–40 мин – 95–

20 % В, 40–41 мин – 20–95 % В, 41–48 мин – 95 % В), скорость подвижной фазы: 1 мл/мин, спектрофотометрический детектор с длиной волны 250 нм, объем вводимой пробы: 20 мкл.

Оценка характера взаимодействия компонентов извлечений из травы, корней и соцветий борщевика Сосновского с исследуемыми клеточными линиями осуществлялась методом сравнительного анализа хроматографических профилей культуральных жидкостей. Для этого анализировали состав культуральной жидкости, полученной после инкубации клеточных линий с соответствующими извлечениями, и сравнивали его с составом среды, инкубированной в идентичных условиях, но без присутствия клеток (модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) + извлечения, без клеток). При анализе учитывали два ключевых показателя: количество детектированных соединений, определенных по индивидуальным хроматографическим пикам, и суммарная площадь этих пиков, отражающая интегральное содержание фенольных соединений: кумаринов, флавоноидов и других компонентов вторичного метаболизма растения.

Для более наглядного представления результатов по поглощению кумаринов данные представлены в виде тепловой карты в виде отношений площадей хроматографических пиков кумаринов в культуральной среде (DMEM + извлечения) к значениям после инкубации с клеточными линиями, что отражает относительную степень поглощения соединений клетками (значения, близкие к единице, указывают на отсутствие или незначительную степень клеточного поглощения соединения, более высокие значения свидетельствуют о выраженном снижении концентрации вещества в культуральной среде, что интерпретируется как результат его активного поглощения клетками).

Статистическую обработку проводили при помощи компьютерной программы STATISTICA 12.6.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 и 2 представлены результаты хроматографического анализа: в табл. 1 отражена динамика количества детектированных соединений, в табл. 2 – динамика суммарной площади хроматографических пиков обнаруженных веществ.

Таблица 1 – Динамика количества детектированных соединений

Часть растения	DMEM	Bj-hTERT	ZR-75	HROG04	NIH-OVCAR3
Трава	108	107	102	103	107
Корни	115	94	89	101	98
Соцветия	108	85	116	112	108

Таблица 2 – Динамика суммарной площади детектированных соединений

Часть растения	DMEM	Bj-hTERT	ZR-75	HROG04	NIH-OVCAR:3
Трава	359,6624	332,1316	325,5056	330,2447	332,7699
Корни	180,3079	283,5816	202,5731	262,5512	195,7894
Соцветия	593,3396	507,2581	592,8376	538,8898	504,5547

Нормальные фибробlastы Bj-hTERT демонстрировали относительно стабильный уровень подавления роста под воздействием исследуемых растворов – в диапазоне 81,4–83,4 %, независимо от количества поглощенных соединений и изменения суммарной площади детектированных веществ. Анализ не выявил явной зависимости между степенью ингибиции и интенсивностью поглощения веществ

или их накоплением внутри клеток, что свидетельствует о сравнительной устойчивости нормальных клеток к воздействию экстрактов при различных концентрациях активных компонентов.

На рис. 1 и 2 представлена зависимость процента подавления роста опухолевых (нормальных) клеток от количества и площади детектированных соединений в культуральной

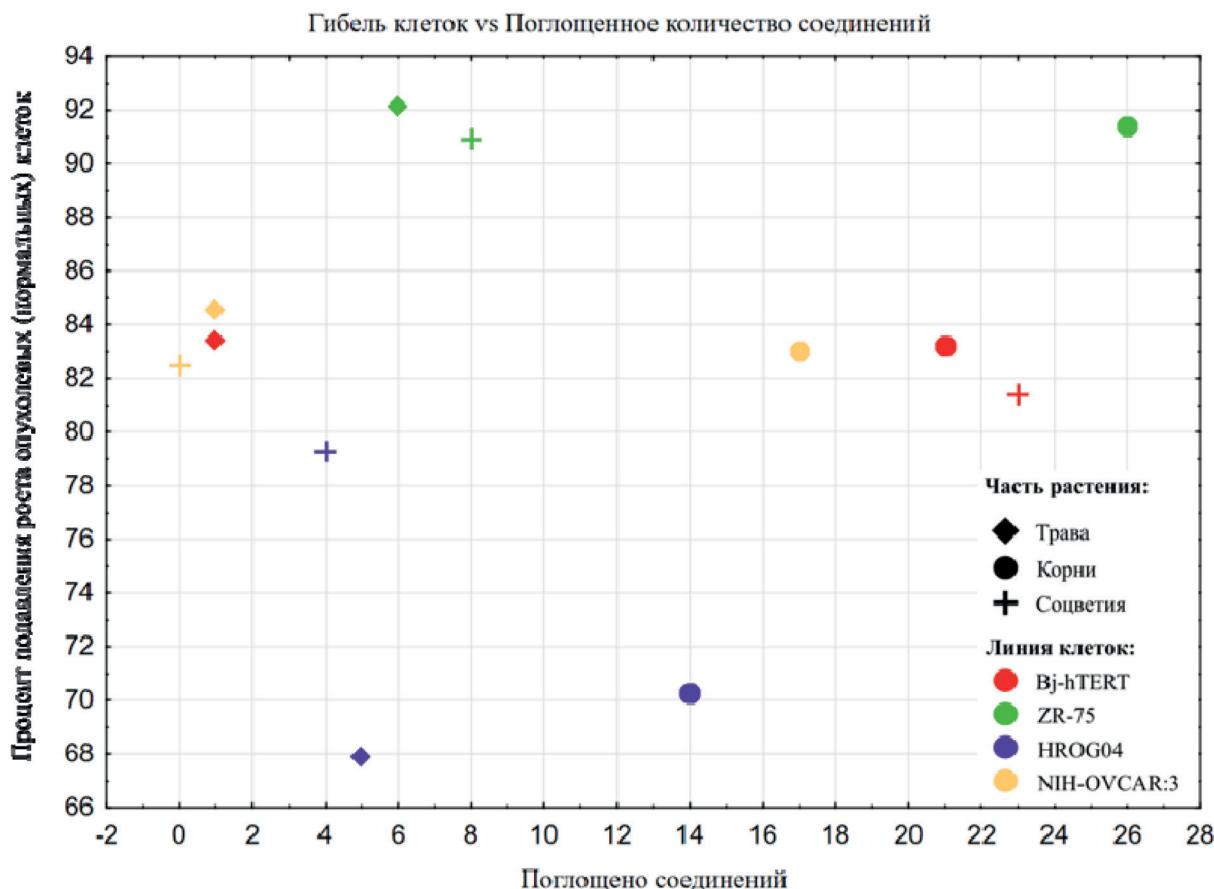


Рис. 1. Зависимость процента подавления роста опухолевых (нормальных) клеток от количества детектированных соединений в культуральной жидкости после обработки извлечениями из борщевика Сосновского

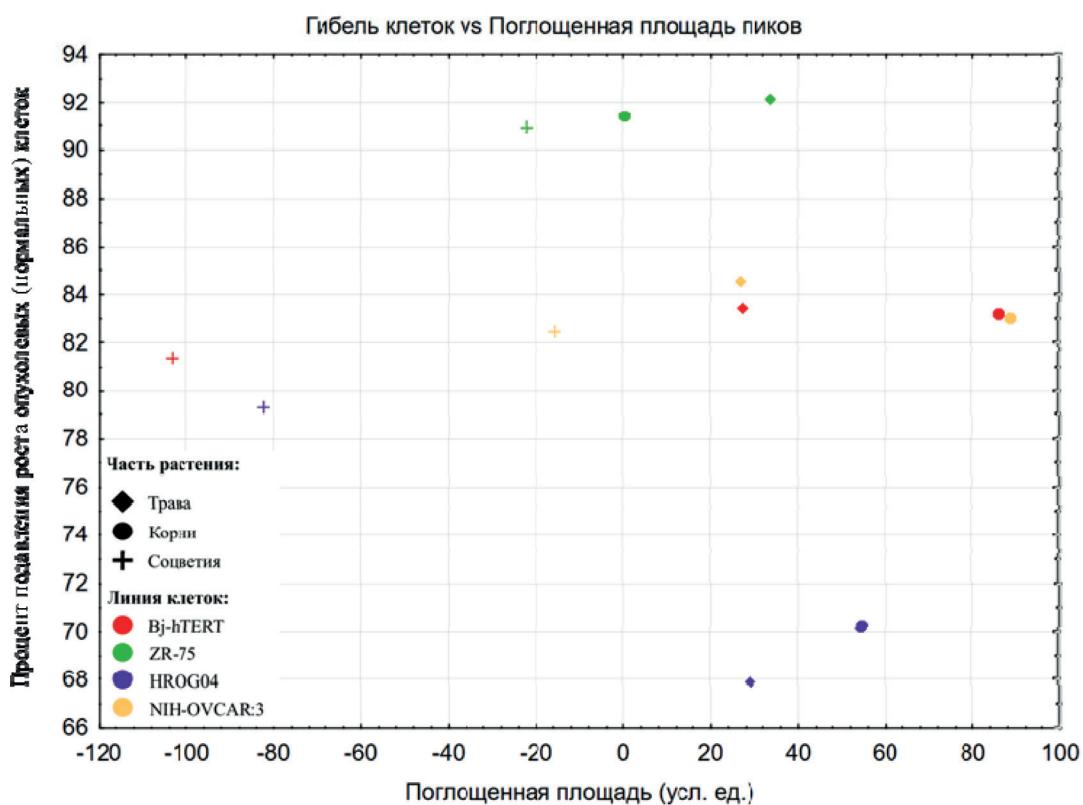


Рис. 2. Зависимость процента подавления роста опухолевых (нормальных) клеток от площади детектированных соединений в культуральной жидкости после обработки извлечениями из борщевика Сосновского

жидкости после обработки извлечениями из борщевика Сосновского.

В отличие от нормальных клеток опухолевые клеточные линии ZR-75, HROG04 и NIH-OVCAR:3 характеризуются значительно более высоким уровнем ингибирования пролиферации, вплоть до 92,1 %, который практически не коррелирует с величиной поглощения соединений. Так, линия ZR-75 достигала уровня ингибирования более 90 % даже при минимальном поглощении и увеличении значений площадей хроматографических пиков, что указывает на увеличение содержания активных соединений в культуральной среде после инкубации. Данный факт может свидетельствовать о присутствии в исследуемых извлечениях биологически активных веществ с высокой активностью, либо же о том, что противоопухолевое действие экстрактов реализуется преимущественно посредством внеклеточных механизмов, таких как активация рецептор-опосредованных сигнальных путей и индукция окислительного стресса, не требующих активного транспорта компонентов внутрь клетки.

На рис. 3 представлены хроматограммы, полученные в результате анализа среды после инкубации с извлечением из травы борщевика Сосновского на различных клеточных линиях.

Несмотря на схожесть хроматограмм, анализ показал значительные изменения в количественном содержании некоторых соединений, особенно кумаринового ряда, в клеточной жидкости после инкубации по сравнению с контрольной средой DMEM. Количественные изменения кумаринов травы представлены в табл. 3.

На рис. 4 представлена тепловая карта отношения «площадь пиков кумаринов травы в сливах DMEM + извлечения/площадь пиков кумаринов травы в сливах после инкубации с клеточными линиями Bj-hTERT, ZR-75, HROG04, NIH-OVCAR:3

Как видно из рис. 4, все исследуемые кумарины (псорален, ангелицин, ксантотоксин, бергаптен) способны проникать внутрь клеток, о чем свидетельствуют значения поглощения, превышающие 1,0 во всех клеточных линиях. Наиболее выраженное поглощение отмечено для ксантотоксина, особенно клеточными



Рис. 3. Хроматографические профили культуральной жидкости после инкубации извлечений из травы борщевика Сосновского с клеточными линиями Bj-hTERT, ZR-75, HROG04, NIH-OVCAR:3

Таблица 3 – Количествоизменения содержания соединений кумаринового ряда травы борщевика Сосновского

Соединение	Клеточная линия				
	DMEM	Bj-hTERT	ZR-75	HROG04	NIH-OVCAR:3
Псорален, Sp	2,8978	2,2407	2,3690	2,4082	2,4392
Ангелицин, Sp	3,7065	2,9546	2,5590	2,2228	2,4268
Ксантотоксин, Sp	11,9499	7,8724	5,5085	4,1679	4,4852
Бергаптен, Sp	3,2069	2,2673	1,9336	1,8752	1,4133

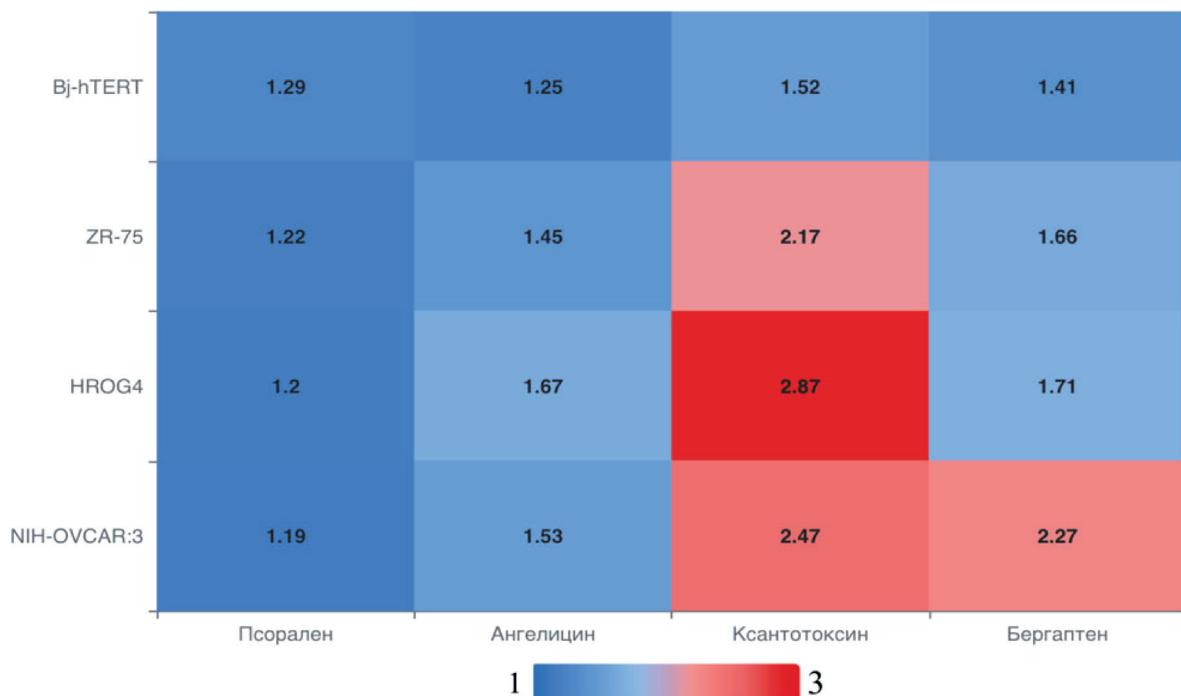


Рис. 4. Тепловая карта отношения «площадь пиков кумаринов травы в сливах DMEM + извлечения/площадь пиков кумаринов травы в сливах после инкубации с клеточными линиями Bj-hTERT, ZR-75, HROG04, NIH-OVCAR:3

линиями HROG04 (2,87) и NIH-OVCAR:3 (2,47). Ангелицин также показал устойчивую степень поглощения во всех линиях, особенно в отношении HROG04 и ZR-75, тогда как псорален характеризовался наименьшими значениями поглощения (1,19–1,29). Бергаптен продемонстрировал умеренное поглощение с максимальными значениями в отношении NIH-OVCAR:3 (2,27). Зависимость ингибирования клеточной пролиферации разных линий от степени поглощения кумаринов травы представлена на рис. 5.

На основании данных на рис. 4 и 5 можно сделать вывод, что цитостатическая активность кумаринов травы борщевика Сосновского определяется преимущественно типом клеточной линии-мишени, а не уровнем поглощения кумаринов клетками (максимальный процент подавления роста клеток наблюдается при минимальных значениях поглощения кумаринов). Данное явление может быть обусловлено высокой биологической активностью изучаемых кумариновых соединений,

что обеспечивает проявление цитостатического эффекта даже при относительно низких концентрациях внутри клеток.

На рис. 6 представлены хроматограммы, полученные в результате анализа среды после инкубации с извлечением из соцветий борщевика Сосновского на различных клеточных линиях.

В табл. 4 представлены количественные изменения соединений кумаринового ряда соцветий борщевика Сосновского.

Как видно из рисунка 6, хроматограммы показывают внешнюю схожесть, однако значительно отличаются концентрацией отдельных соединений.

Как и в случае с травой, для более наглядного представления результатов данные представлены в виде тепловой карты на рис. 7.

Исходя из данных, представленных в табл. 4 и на рис. 7, наиболее выраженное погложение отмечено у ксантотоксина, особенно в отношении клеток HROG04 (2,5) и Bj-hTERT (2,44), что указывает на его высокую клеточную

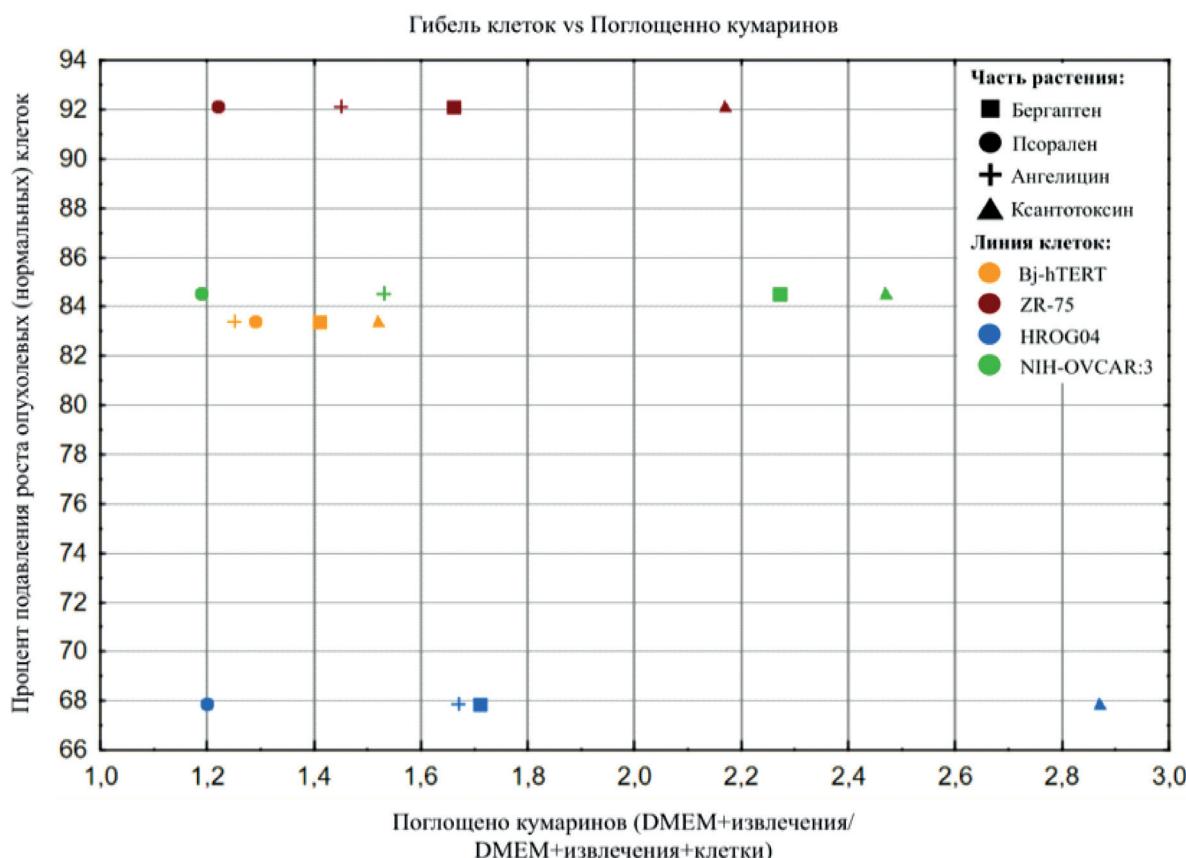


Рис. 5. Зависимость ингибирования клеточной пролиферации разных линий от степени поглощения кумаринов травы борщевика Сосновского



Рис. 6. Хроматографические профили культуральной жидкости после инкубации извлечений из соцветий борщевика Сосновского с клеточными линиями Bj-hTERT, ZR-75, HROG04, NIH-OVCAR:3

Таблица 4 – Количествоизменения соединений кумаринового ряда соцветий борщевика Сосновского

Соединение	Клеточная линия				
	DMEM	Bj-hTERT	ZR-75	HROG04	NIH-OVCAR:3
Псорален, Sp	4,0425	0,4954	2,0302	3,3125	2,8878
Ангелицин, Sp	4,5564	2,4593	4,4816	2,7815	4,309
Ксантотоксин, Sp	19,5424	8,0182	13,6836	7,8367	13,7412
Бергаптен, Sp	3,0248	0,8639	1,9224	2,7886	2,9824

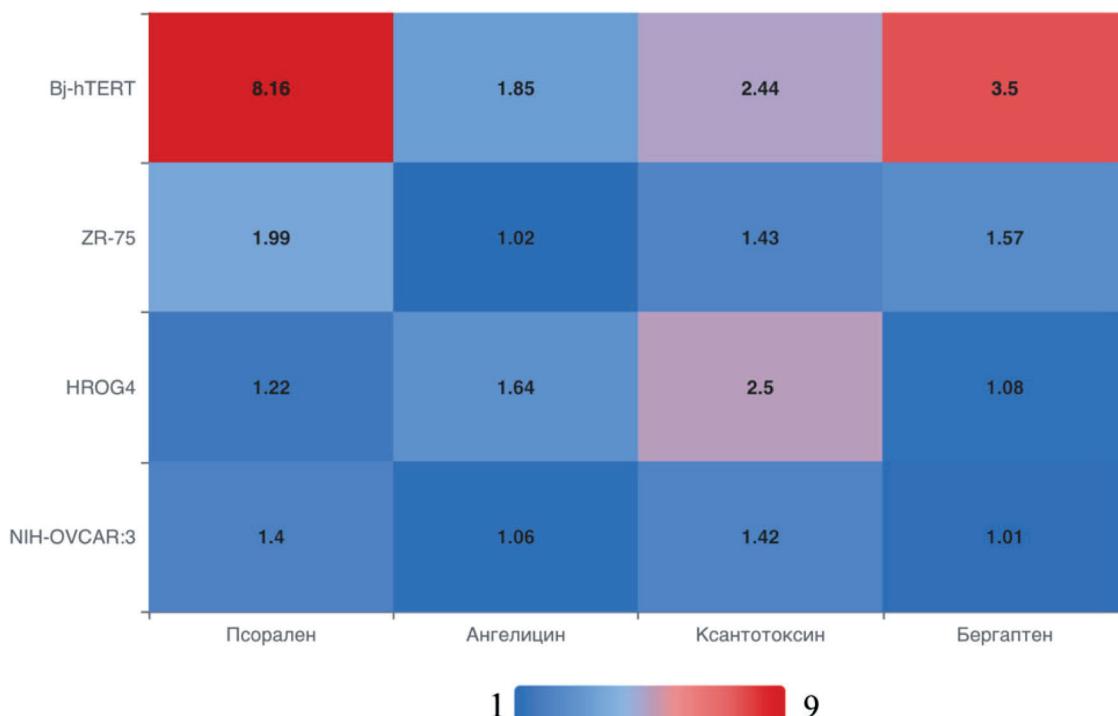


Рис. 7. Термовая карта отношения «площадь пиков кумаринов соцветий в сливах DMEM + извлечения/площадь пиков кумаринов соцветий в сливах после инкубации с клеточными линиями Bj-hTERT, ZR-75, HROG04, NIH-OVCAR:3

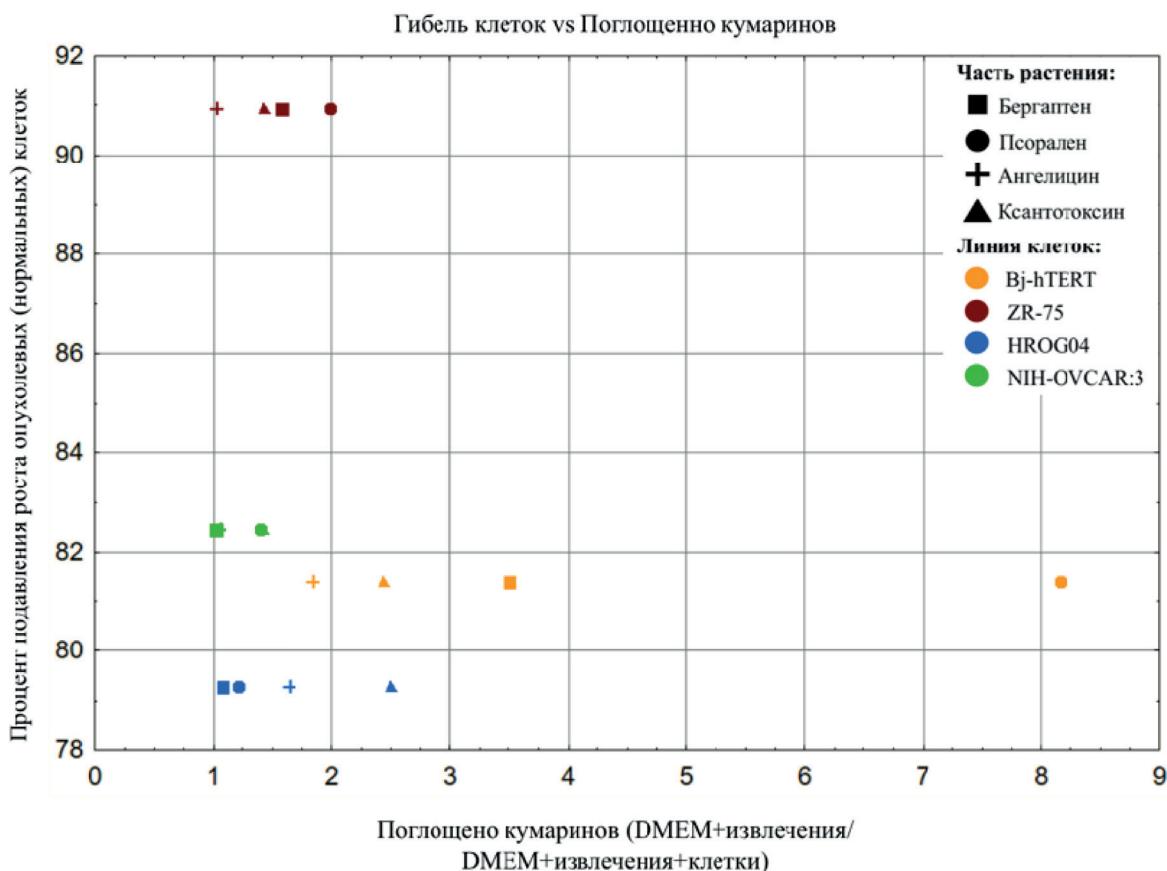


Рис. 8. Зависимость ингибирования клеточной пролиферации разных линий от степени поглощения кумаринов соцветий борщевика Сосновского

проницаемость. Ангелицин проявил стабильное поглощение во всех линиях, особенно в отношении HROG04 (1,64) и ZR-75 (1,85). Псорален показал значения поглощения – от 1,22 в отношении HROG04, до 8,16 в отношении нормальных клеток Bj-hTERT. Бергаптен характеризовался умеренным поглощением, с минимальным значением в отношении NIH-OVCAR:3 (1,01) и максимальным в отношении Bj-hTERT (3,5).

Зависимость ингибирования клеточной пролиферации разных линий от степени поглощения кумаринов соцветий представлена на рис. 8.

На основании представленных данных на рис. 7 и 8 можно сделать вывод, что цитостатическая активность кумаринов (псоралена, ангелицина, ксантотоксина и бергаптена) соцветий борщевика Сосновского, также как и кумаринов травы определяется преимущественно типом клеточной линии-мишени, а не уровнем поглощения кумаринов клетками.

На рис. 9 представлены хроматограммы, полученные в результате анализа среды после инкубации с извлечением из корней борщевика Сосновского на различных клеточных линиях.

В таблице 5 представлены количественные изменения соединений кумариновой природы из корней борщевика Сосновского

Как и в случае с травой и соцветиями, для более наглядного представления результатов данные представлены в виде тепловой карты на рис. 10.

Исходя из данных, представленных на рис. 10 и в табл. 5, наиболее выраженное поглощение среди исследуемых соединений наблюдается у бергаптена и ксантотоксина в отношении клеточной линии ZR-75 (2,17 и 2,00 соответственно), что может свидетельствовать о высокой проницаемости этих соединений в отношении клеток данной линии. Умеренно высокое поглощение ксантотоксина отмечено в линиях NIH-OVCAR:3 (1,79) и HROG04 (1,66),

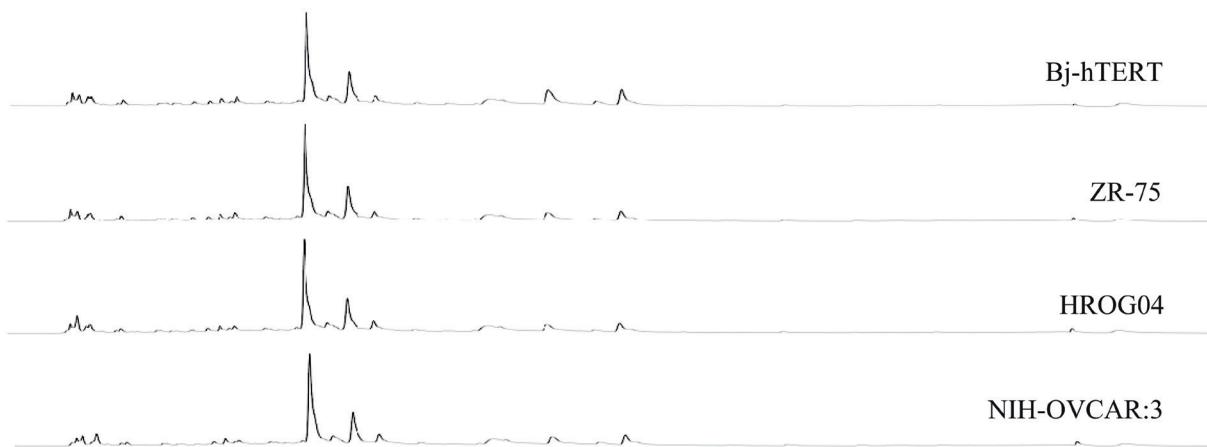


Рис. 9. Хроматографические профили культуральной жидкости после инкубации извлечений из корней борщевика Сосновского с клеточными линиями Bj-hTERT, ZR-75, HROG04, NIH-OVCAR:3

Таблица 5 – Качественные изменения соединений кумаринового ряда корней борщевика Сосновского

Соединение	Клеточная линия				
	DMEM	Bj-hTERT	ZR-75	HROG04	NIH-OVCAR:3
Ксантотоксин, Sp	6,3511	6,2412	3,1649	3,8179	3,5473
Бергаптен, Sp	3,4976	3,096	1,6118	3,3638	2,357
Умбеллиферон, Sp	0,8591	0,8303	0,7866	0,5787	0,6747
Сфондин, Sp	3,8851	3,7852	2,855	3,6581	2,9075

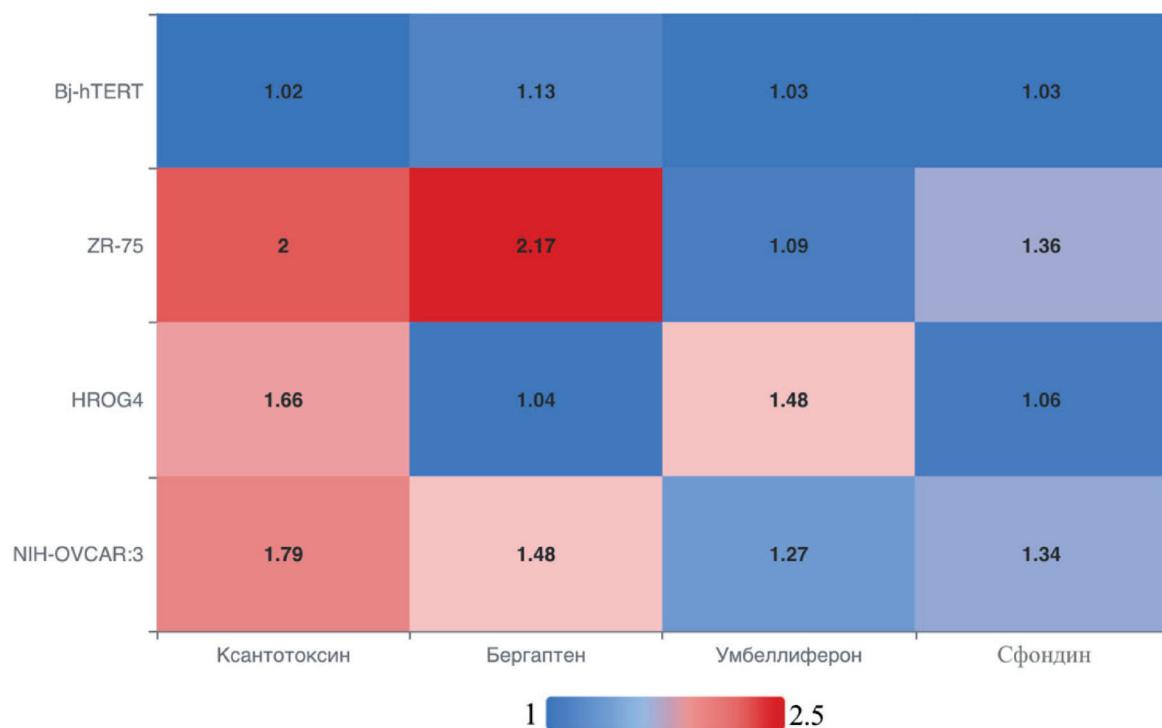


Рис. 10. Термовая карта отношения «площадь пиков кумаринов корней в сливах DMEM + извлечения/площадь пиков кумаринов корней в сливах после инкубации с клеточными линиями Bj-hTERT, ZR-75, HROG04, NIH-OVCAR:3

что указывает на его сравнительно хорошую клеточную проницаемость в опухолевые клетки. В то же время в нормальных фибробластах Bj-hTERT все соединения характеризовались низкими значениями поглощения, варьирующими от 1,02 (ксантотоксин) до 1,13 (бергаптен). Умбеллиферон и сфондин демонстрирует наиболее умеренные показатели поглощения во всех клеточных линиях (1,03–1,48), что указывает на умеренную степень поглощения.

Таким образом, кумарины корней показывают максимальные значения клеточного поглощения в отношении опухолевых линий клеток, тогда как в нормальных фибробластах (Bj-hTERT) степень их проникновения остается на минимальном уровне.

Зависимость ингибирования клеточной пролиферации разных линий от степени поглощения кумаринов корней представлена на рис. 11.

На основании данных, представленных на рис. 10 и 11, можно сделать вывод, что биологическая активность кумаринов, выделенных из корней борщевика Сосновского, так же как

и кумаринов, полученных из надземной части растения, в большей степени определяется типом клеточной линии-мишени, нежели уровнем их внутриклеточного накопления.

Заключение. В результате исследования установлено, что нормальные фибробlastы Bj-hTERT относительно устойчивы к воздействию извлечений из борщевика Сосновского, тогда как опухолевые клетки проявляют высокую чувствительность к воздействию извлечений, независимо от степени поглощения веществ. Это указывает на возможную реализацию цитостатического эффекта преимущественно за счет внеклеточных механизмов действия.

Соединения кумаринового ряда травы, соцветий и корней борщевика Сосновского способны эффективно проникать внутрь различных клеточных линий, что подтверждается значительным снижением их концентрации в культуральной среде после инкубации. Наиболее высокая степень поглощения характерна для ксантотоксина и бергаптена, особенно в опухолевых клеточных линиях (HROG04,

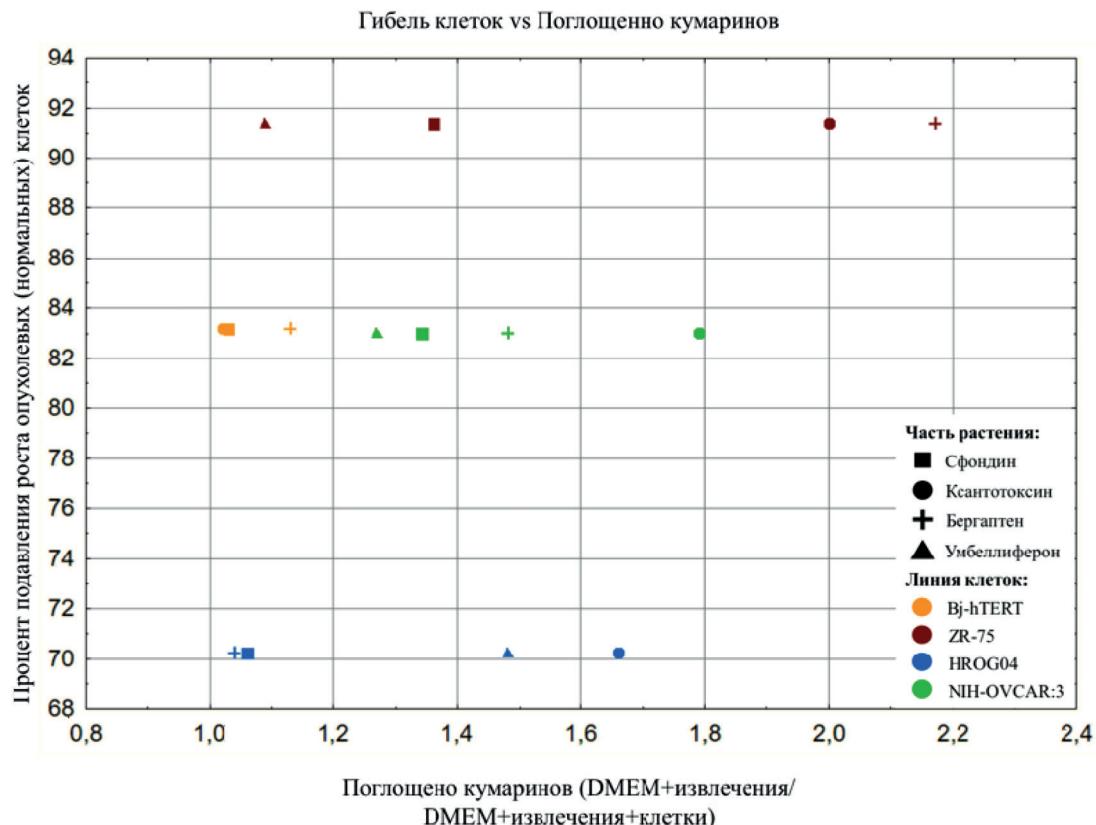


Рис. 11. Зависимость ингибирования клеточной пролиферации разных линий от степени поглощения кумаринов корней борщевика Сосновского

NIH-OVCAR:3, ZR-75), что указывает на их высокую клеточную проницаемость и высокую эффективность против опухолевых линий клеток.

Однако отсутствует прямая корреляционная связь между степенью клеточного поглощения кумаринов и цитостатическим эффектом. Максимальные показатели подавления клеточной пролиферации наблюдаются при относительно низких уровнях поглощения, что свидетельствует о высокой биологической активности кумариновых соединений даже при низких внутриклеточных концентрациях. Следовательно, цитотоксическое действие данных веществ определяется в большей степени особенностями клеточной линии-мишени.

ни и ее чувствительностью к кумаринам, чем степенью их накопления в клетках.

Выявлена тенденция к селективному поглощению кумаринов опухолевыми клетками по сравнению с нормальными фибробластами (Bj-hTERT), что указывает на потенциальное применение экстрактов борщевика Сосновского в качестве источника биологически активных соединений с избирательной активностью против опухолевых клеток.

Таким образом, полученные данные подтверждают перспективность дальнейших исследований соединений кумаринового ряда борщевика Сосновского как потенциальных цитостатических средств.

Список цитированных источников

1. WHO. The number of cancer patients in the world will continue to grow. World Health Organization. – 2024
2. Anticancer potential of furanocoumarins: Mechanistic and therapeutic aspects / S. Ahmed, H. Khan, M. Aschner [et al] // International J of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – № 5622.
3. Копылова, Н.А. Биологически активные соединения в экстрактах тканей борщевика Сосновского (Heracleum Sosnowskyi Manden.) / Н.А. Копылова, Н.А. Ламан, В.Н. Прохоров // Ботаника (исследования) : сб. науч. тр. – Минск : Ин-т эксперимент. ботаники НАН Беларуси, 2014. – Вып. 43. – С. 250–259.
4. Цитостатический эффект извлечений из борщевика Сосновского / Р.И. Лукашов, Н.С. Гурина, А.В. Лавровский [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14. – № 1. – С. 39–53.

CELLULAR BIOAVAILABILITY OF COUMARINS OF HERACLEUM SOSNOWSKYI

Lukashou R.I.¹, Laurouska A.V.¹, Bobrova N.M.², Severin I.N.², Doroshenko T.M.², Portyanko A.S.²

¹*Belarusian state medical university, Minsk, Republic of Belarus*

²*Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Aleksandrov*

Coumarins from *Heracleum Sosnowskyi* are potential natural antitumor agents. This study determined cellular bioavailability of coumarins from plant extracts and their relationship with tumor cell proliferation inhibition. Bioavailability was assessed in vitro on ZR-75 (breast carcinoma), HROG04 (glioblastoma), NIH:OVCAR-3 (ovarian adenocarcinoma) cell lines and normal Bj-hTERT fibroblasts. Residual coumarins in culture medium were analyzed by HPLC. Extracts showed selective cytostatic activity: normal fibroblasts were relatively resistant, while tumor cells demonstrated high sensitivity (growth inhibition up to 92.12 %). Coumarin compounds, especially xanthotoxin and bergapten, efficiently penetrated tumor cells, indicating high bioavailability. However, no direct correlation existed between uptake levels and cytostatic effects: activity persisted at low intracellular concentrations. Selective coumarin uptake by tumor cells confirms the promise of *Heracleum Sosnowskyi* as potential antitumor agent.

Keywords: coumarins; cellular bioavailability; *Heracleum Sosnowskyi*; tumor cell lines; HPLC.