

БИОТЕХНОЛОГИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ СУСПЕНЗИОННЫХ КЛЕТОК *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) – ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВЕЩЕСТВ*

А.Ю. Просеков, член-корреспондент РАН, О.В. Козлова, доктор технических наук, А.Д. Веснина, аспирант

Кемеровский государственный университет,
650000, Кемерово, ул. Красная, 6
E-mail: koledockop1@mail.ru

Для сохранения видового разнообразия лезвев сафлоровидной, которая может быть перспективным источником противоопухолевых метаболитов, актуально выращивание клеточных культур в условиях *in vitro*. Цель исследований – подобрать оптимальную питательную среду для выращивания суспензионных клеток лезвев сафлоровидной, варьируя ее минеральным составом и регуляторами роста. Для получения суспензионных клеток *in vitro* использовали питательные среды различного минерального состава (Мурасиге-Скуга, Гамборга и Шенка-Хильдебрандта) и регуляторы роста (ауксин – 3-индолилуксусная кислота (ИУК), цитокинин – кинетин). Параметры культивирования: температура – 26 °С, влажность – 60...70 %, период светового дня – 16 ч, цикл субкультивирования – 21 день. Для полученных клеточных культур оценивали жизнеспособность, индекс роста и удельную скорость роста. Наибольшие величины исследуемых параметров отмечали при выращивании суспензионных клеток на питательной среде с минеральным составом Шенка-Хильдебрандта (SH) (жизнеспособность суспензионных клеток 77...82 %, индекс роста 6,11...7,14, удельная скорость роста 0,17...0,21 сут⁻¹). Из выбранных и предварительно лиофильно высушенных образцов клеток готовили метанольные экстракты, подвергавшиеся анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Суспензионные культуры (наилучшие показатели у образца № 12, выращенном на среде SH с добавлением ИУК и кинетина), как и контрольный образец (метанольный экстракт измельченного корня растения) содержали ситостерин (контроль – 0,26±0,01 мг/г; № 12 – 1,54±0,02 мг/г), изофраксидин (соответственно 1,15±0,02 и 3,10±0,04 мг/г), хлорогеновую (44,54±0,14 и 66,87±0,02 мг/г) и кофейную (50,15±0,03 и 54,73±0,06 мг/г) кислоты. Экстракты суспензионных культур (100 мг/мл) проявляли противоопухолевые свойства – цитотоксическое действие по отношению к опухолевым клеткам (PANC-1, ЛБР2, MDAMB-231, NT-29). Клеточные культуры, выращенные на среде SH с добавлением ИУК и кинетина, проявляли наиболее выраженные противоопухолевые свойства, так как содержали большее количество биологически активных веществ в своем составе. При добавлении экстракта образца № 12 снижение жизнеспособности опухолевых клеток достигало 40,57...53,23 %.

BIOTECHNOLOGY OF CULTIVATION OF *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) SUSPENSION CELLS – A PROSPECTIVE SOURCE OF ANTITUMOR SUBSTANCES

Prosekov A.Yu., Kozlova O.V., Vesnina A.D.

Kemerovo State University,
650000, Kemerovo, ul. Krasnaya, 6
E-mail: koledockop1@mail.ru

To preserve the species diversity of *Rhaponticum carthamoides*, a Red Book plant that is a promising source of antitumor metabolites, it is important to grow cell cultures *in vitro*. The aim of the work is to select the optimal nutrient medium for growing suspension cells of *Rhaponticum carthamoides*, varying the mineral composition of the nutrient medium and growth regulators. To obtain suspension cells *in vitro*, nutrient media of various mineral compositions (Murashige-Skoog, Gamborg, and Schenk Hildebrandt) and growth regulators (auxin – 3-indoleacetic acid (IAA), cytokinin – kinetin) were used. Cultivation parameters: 26 °C, humidity 60–70 %, with a 16 hour daylight period and a 21 day subculture cycle. For the obtained cell cultures, the viability, growth index and specific growth rate were assessed. The results showed that the highest values of the studied parameters were observed when growing suspension cells on a nutrient medium with a Schenk-Hildebrandt mineral composition (SH) (viability of suspension cells 77–82 %, growth index 6,11–7,14, specific growth rate 0,17–0,21 day⁻¹). Methanol extracts were prepared from selected and pre-lyophilized cell samples and analyzed by high performance liquid chromatography. The results showed that suspension cultures (the best indicators were observed in sample no. № 12 grown on SH medium supplemented with IAA and kinetin), as well as the control sample (methanol extract of crushed plant root), contained: sitosterol (control – 0,26±0,01 mg/g; № 12 – 1,54±0,02 mg/g), isofraxidine (control – 1,15±0,02 mg/g; № 12 – 3,10±0,04 mg/g), chlorogenic (control – 44,54±0,14 mg/g; № 12 – 66,87±0,02 mg/g) and coffee (control – 50,15±0,03 mg/g; № 12 – 54,73±0,06 mg/g) acid. The extracts of suspension cultures (100 mg/ml) exhibited antitumor properties – a cytotoxic effect on tumor cells (PANC-1, LBR2, MDAMB-231, NT-29). Cell cultures grown on SH medium supplemented with IAA and kinetin exhibited the most pronounced antitumor properties, since they contained a greater amount of biologically active substances in their composition. When the extract of sample № 12 was added, the decrease in the viability of tumor cells was achieved by 40,57–53,23 %. In the course of the work, the composition of the nutrient medium was selected, which allows to grow the biomass of suspension cultures of *Rhaponticum carthamoides* cells, which exhibits antitumor properties.

Ключевые слова: лезвея сафлоровидная, *Rhaponticum carthamoides* (Willd.), эндемик, суспензионная культура, экстракция, противоопухолевые свойства.

Key words: *Rhaponticum carthamoides* (Willd.), endemic, suspension culture, extraction, antitumor properties.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 075-02-2018-223 от 26.11.2018, № 075-15-2019-1362 от 14.06.2019 (идентификатор проекта RFMEFI57718X0285).

Сегодня актуально использование растительных экстрактов, богатых вторичными метаболитами, проявляющими цитотоксическую и прочую активность, в качестве химиотерапевтических агентов против различных видов рака. К преимуществам растительных метаболитов относят: широкий спектр физиологического действия на организм человека, низкую или отсутствующую токсичность этих соединений и низкую стоимость растительного сырья [1]. Перспективный источник химических соединений, проявляющих противоопухолевую активность, – левзея сафлоровидная.

Левзея сафлоровидная или маралий корень (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.)) – многолетнее растение эндемик (для территории Сибирского федерального округа), относящееся к семейству сложноцветных. Растения этого вида встречаются в ассоциациях лугового, кустарникового и лесного типов растительности, на субальпийских, реже альпийских, лугах [2, 3]. В фармакологии корни и корневища растений используют в качестве адаптогенного, тонизирующего средства, стимулирующего работу центральной нервной системы, снижающего умственную усталость [4]. Известно, что препараты из этого растения также проявляют противоопухолевую активность, например, по отношению к клеткам рака молочной железы человека, глиомы, лейкемии, аденокарциномы легких и др. путем индукции апоптоза [1, 5]. Польза от применения средств на основе этого растения обусловлена содержанием вторичных метаболитов, а именно экдистероидов, фенольных кислот, флавоноидов, гликозидов и др. [6].

Сегодня большинство биологически активных веществ (БАВ) извлекают из дикорастущего сырья, то есть происходит изъятие растений из естественной среды обитания, которое приводит к уничтожению видового разнообразия и нарушению экологической обстановки [1]. К тому же этот вид внесен в Красную книгу Кузбасса [7], следовательно, для сохранения экологической стабильности и видового разнообразия актуально использование современных достижений биотехнологии, а именно выращивание клеточных культур (калусных, суспензионных и бородачатых корней) в условиях *in vitro* [8]. По результатам предварительного изучения доступной литературы за рубежом, в условиях *in vitro* чаще всего выращивают корневую культуру левзеи сафлоровидной – бородачатые корни [1, 9, 10]. Отечественные исследователи отдают предпочтение технологии выращивания калусных культур [11, 12],

Табл. 1. Состав питательных сред, используемых в данном исследовании, для накопления биомассы суспензионных культур клеток

№ образца	Минеральный состав*	Кинетин	ИУК
1	MS	–	–
2		+	–
3		–	+
4		+	+
5	B5	–	–
6		+	–
7		–	+
8		+	+
9	SH	–	–
10		+	–
11		–	+
12		+	+

*MS – среда Мурасиге-Скуга; B5 – Гамборга; SH – Шенка-Хильдебрандта

информации по получению суспензионных культур для этого растения не обнаружено.

Цель исследований заключается в подборе питательной среды для культивирования суспензионной культуры левзеи сафлоровидной, используемой в качестве источника БАВ противоопухолевой направленности.

Методика. Объект исследования – биомасса суспензионной культуры левзеи сафлоровидной (см. рисунок). Для ее выращивания использовали экспланты – четырехнедельные проростки семян, полученные по методике, описанной в работе Е. Скала и ее коллег [10]. Семена приобретены в коллекции Е.К. Сироткина (Россия). Перед стерилизацией проводили их стратификацию путем выдерживания при +4 °С в течение двух недель. Стерильные проростки подвергали каллусогенезу, согласно методике Н.А. Величко [12]. Для получения суспензионной культуры рыхлые каллусы (300...400 мг) переносили на жидкие среды (в колбы на 250 мл, содержащие 25 мл жидкой питательной среды, состав сред представлен в табл. 1) и культивировали на стационарной круговой качалке при 95...100 об/мин (шейкер-инкубатор ES-

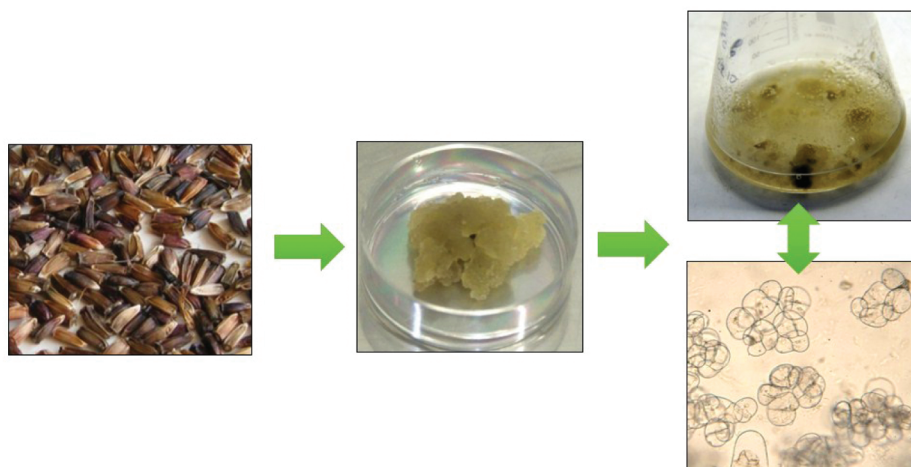


Схема получения суспензионной культуры in vitro из стерильных семян левзеи сафлоровидной.

20/60, Biosan, Латвия). Для экспериментов использовали среды с минеральным составом по прописям Мурасиге-Скуга, Гамборга и Шенка-Хильдебрандта [13, 14] с добавлением гидролизата казеина (0,5 г/л), мезоинозита (0,1 г/л), 3 % сахарозы, 0,5 % агары. Всего изучали 12 вариантов питательных сред, отличающихся по составу регуляторов роста, в качестве которых выступали 3-индолилуксусная кислота (ИУК) и кинетин. На 21 день культивирования осуществляли пересев надосадочной фракции клеток, постепенно увеличивая степень разбавления от 1/2 до 1/8 (соотношение объема инокулята к объему свежей питательной среды) и сокращая цикл субкультивирования. Суспензионные клетки культивировали в климатической камере KBF P (Binder GmbH, Германия) в стерильных условиях при 16 часовом световом дне, температуре 26 °С, влажности 60...70 %, цикл субкультивирования 21 день. Все работы осуществляли в стерильных условиях ламинар-боксов БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC (ЗАО «Ламинарные системы», Россия). Все реактивы для выращивания каллусных и суспензионных культур приобретены в ООО «Диаэм» (Россия).

В ходе исследования оценивали следующие ростовые параметры суспензионных культур на 21 сутки выращивания: жизнеспособность (v, %), индекс роста (I), удельная скорость роста в экспоненциальной фазе (μ , сут⁻¹). Методики оценки представлены в ранее опубликованных работах авторов [15].

В образцах, которые характеризовались наибольшими ростовыми параметрами, определяли содержание БАВ. Пробоподготовка к проведению анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) заключалась в высушивании биомассы в лиофильных условиях, приготовлении на ее основе метанольных экстрактов (параметры экстракции представлены в работе E. Skala [16]) в ультразвуковой бане FS14H (Fisher scientific, США) в течение 240 мин. После отбирали 1 мл экстракта, подвергавшийся центрифугированию в течение 15 мин при 8000 об/мин (центрифуга 5430 R, Eppendorf, Германия). Супернатант в количестве 0,5 мл анализировали на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (Shimadzu Corp., Япония) с использованием детектора, оснащенного диодной матрицей Shimadzu SPD-20-MA (Shimadzu Corp., Япония), рефрактометрическим детектором RID-10A (Shimadzu Corp., Япония) и колонкой Zorbax C-18 (150×4,6 мм, размер частиц фазы 5 мкм). В качестве компонентов подвижной фазы использовали смесь растворителей – ацетонитрил (растворитель А) и 0,1 %-ная трифторуксусная кислота (В). Разделение осуществляли в режиме с градиентной и изократической составляющими: 0 мин – 20 % А, 4 мин – 55 % А, 14 мин – 55 % А, 16 мин – 20 % А. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура колонки 24 °С; объем пробы – 20 мкл.

Детектирование проводили при длине волны – 276 нм. Содержание БАВ в полученных суспензионных клетках сравнивали с контролем – концентрацией БАВ в метанольном экстракте измельченных корней растения, собранного на территории Кемеровской области, в горах Кузнецкого Алатау. Количественное содержания идентифицированных веществ проводили методом внешнего стандарта. Содержание исследуемых растительных БАВ определяли с использованием соответствующих калибровочных кривых, построенных в диапазоне концентраций 0,05...200 мкг/мл.

Противоопухолевую активность экстрактов суспензионных культур к клеточным линиям PANC-1, ЛБР2, MDAMB-231, HT-29 (Cancer Center Karolinska, Швеция) оценивали по методике, представленной в работе И. Янга и его коллег [17]. Для оценки жизнеспособности опухолевых клеток (посевная концентрация 75...100 тыс. клеток в 1 мл) инкубировали в 96-луночном планшете в течение ночи (примерно 12 ч). Затем к ним добавляли экстракты суспензионных культур (100 мкг/мл) и инкубировали в течение 72 ч. Предварительно полученные экстракты суспензионных культур сушили с использованием роторного испарителя RV 8 V-C (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия). Культивирование опухолевых клеток и их инкубацию с экстрактом осуществляли в CO₂-инкубаторе C 150 (Binder GmbH, Германия) в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, при 37 °С [18]. После этого в каждую лунку добавляли реагент WST-1 (Abcam, Великобритания) и инкубировали в течение 2 ч. Поглощение измеряли при 450 нм с помощью многорежимного ридера GloMax Multi (Promega, США) [19].

Статистическую обработку данных выполняли с использованием компьютерной программы Microsoft Excel. В тексте работы приведены средние арифметические величины параметров ± стандартное отклонение. Значения в таблицах соответствуют максимальным величинам доверительных интервалов при 95 %-ном уровне вероятности по t-критерию Стьюдента. Все эксперименты проводили не менее чем в трехкратной повторности.

Результаты и обсуждение. Наибольшие величины исследуемых показателей отмечены на питательных средах, имеющих основу SH: жизнеспособность клеток – от 77 % до 82 %, индекс роста – от 6,11 до 7,14, удельная скорость роста – от 0,17 сут⁻¹ до 0,21 сут⁻¹ (табл. 2). Кроме того, для достижения наибольших показателей роста суспензионных клеток, не зависимо от минерального состава среды, целесообразно совместное использование всех исследуемых регуляторов роста (кинетина и ИУК).

И корень, и суспензионные культуры клеток левзеи сафлоровидной накапливают ситостерин, хлорогеновая кислоту, изофраксидин, кофейную кислоту. Сравнение

Табл. 2. Ростовые характеристики суспензионных культур клеток левзеи сафлоровидной (начальная плотность культур по сухой биомассе клеток ~2,0 г/л)

Показатель	Образец											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
v, %	76,07 ±1,77	76,03 ±0,90	80,00 ±0,17	81,07 ±0,15	68,13 ±0,75	69,10 ±0,87	72,07 ±0,38	72,07 ±0,29	77,00 ±0,26	79,00 ±0,36*	80,03 ±0,32	82,00 ±0,85
I	6,21± 0,08	6,62± 0,04	6,52± 0,05	6,81± 0,03*	5,62± 0,01*	5,74± 0,04	5,73± 0,03	5,74± 0,01	6,11± 0,02	6,91± 0,01*	7,05± 0,03*	7,14± 0,02*
μ , сут ⁻¹	0,18± 0,01	0,17± 0,00	0,20± 0,02	0,21± 0,01	0,18± 0,01	0,18± 0,01	0,19± 0,01	0,20± 0,03	0,17± 0,01	0,18± 0,01	0,20± 0,01	0,21± 0,04

*величины статистически значимо ($p < 0,05$) отличаются от остальных (по критерию Стьюдента).

Табл. 3. Результаты анализа содержания основных БАВ в экстрактах лиофильно высушенных образцов биомассы суспензионных культур клеток *in vitro* левзеи сафлоровидной

№ образца	Содержание БАВ, мг/г сухой массы			
	ситостерин	хлорогеновая кислота	изофраксидин	кофейная кислота
Контроль	0,26±0,01*	44,54±0,14*	1,15±0,02*	50,15±0,03*
9	1,42±0,02*	65,16±0,12*	3,04±0,02	53,35±0,15
10	1,48±0,01	66,02±0,02*	3,06±0,01	53,4±0,03
11	1,50±0,02	66,25±0,11*	3,09±0,03	54,23±0,06*
12	1,54±0,02	66,87±0,02*	3,10±0,04	54,73±0,06*

*статистически значимо ($p<0,05$) отличаются от остальных (по критерию Стьюдента).

количества БАВ между экстрактами суспензионных культур клеток, обладающих наилучшими ростовыми показателями, свидетельствует, что наибольшее их содержание наблюдается при выращивании культуры на питательной среде № 12 (табл. 3). Причем количество ситостерина в клеточной культуре примерно в 5,9 раз выше, чем в экстракте из корня растения, хлорогеновой кислоты – примерно в 1,5 раза, изофраксидина – в 2,6 раз, кофейной кислоты – в 1,1 раза. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности выращивания суспензионных культур клеток, используемых в качестве альтернативного источника БАВ.

Табл. 4. Результаты определения противоопухолевых свойств экстрактов из высушенной биомассы суспензионных культур клеток, выращенных на питательных средах с минеральной основой SH, %¹

Образец	Клеточная линия			
	PANC-1	ЛБР2	MDAMB-231	HT-29
9	51,90±1,51	55,53±0,66	51,47±0,92	42,47±0,55
10	50,73±0,61	54,93±0,75	51,17±0,15	41,90±1,00
11	50,40±1,17	54,53±0,35	44,93±0,87	41,33±1,70
12	49,20±0,95	53,23±0,70*	44,07±0,80	40,57±0,50

¹контроль не рассматривался, так как содержание БАВ в этом образце было заметно ниже, чем в образцах №9...12;

*статистически значимо ($p<0,05$) отличаются от остальных (по критерию Стьюдента).

Все экстракты из биомассы суспензионных культур растения обладали противоопухолевыми свойствами в отношении тестируемых клеточных линий, так как вызывал снижение жизнеспособности опухолевых клеток. Следует отметить, что наиболее выраженными цитотоксическими свойствами отличался экстракт из высушенной биомассы, полученной при культивировании *in vitro* на среде № 12 – снижение жизнеспособности опухолевых клеток достигало 40,57...53,23 %. Предположительно более эффективное противоопухолевое действие по отношению к линиям HT-29 и MDAMB-231 обусловлено преобладающим содержанием в экстрактах хлорогеновой кислоты. Она влияет на выживаемость клеток рака толстой кишки и молочной железы путем нарушения митохондриальной структуры и апоптоза клеток – расщепления белка PARP-1, активация каспазы 9, изменения в экспрессии Bcl-2, Вах, циклина D1/CDK4

и др. [16, 18, 20]. Для более полного понимания механизм действия экстрактов левзеи сафлоровидной на опухолевые клетки (PANC-1, ЛБР2) необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, в ходе проведенной работы был установлен оптимальный состав питательной среды для культивирования суспензионных культур клеток левзеи сафлоровидной – это среда Шенка-Хильдебрандта с внесением регуляторов роста – ИУК и кинетина. Культивирование на таком питательном субстрате в течение 21 суток позволило получить культуры клеток с жизнеспособностью от 77 % до 82 %, индексом роста от 6,11 до 7,14, удельной скоростью роста от 0,17 сут⁻¹ до 0,21 сут⁻¹. По качественному содержанию БАВ (ситостерин, хлорогеновая кислота, изофраксидин, кофейная кислота) экстракты из суспензионных культур не уступали экстрактам из корня растения. Среднее содержание БАВ в экстракте суспензионных культур выше, чем в экстракте из растения: ситостерина – в 5,70 раза; хлорогеновой кислоты – в 1,48 раза; изофраксидина – в 2,66 раза; кофейной кислоты – в 1,07 раза. Все исследуемые экстракты (концентрацией 100 мг/мл) проявляли противоопухолевые свойства по отношению к ряду клеточных линий.

Литература

1. *Rhaponticum carthamoides Transformed Root Extract Has Potent Anticancer Activity in Human Leukemia and Lung Adenocarcinoma Cell Lines* / E. Skala, E. Synowiec, T. Kowalczyk, et al. // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018. Vol. 2018. Article ID 8198652. URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/8198652/#copyright> (дата обращения: 16.10.21). doi:10.1155/2018/8198652.
2. Kokoska L., Janovska D. *Chemistry and pharmacology of Rhaponticum carthamoides: A review* // *Phytochemistry*. 2009. Vol. 70. No. 7. P. 842–855. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.04.008.
3. Соловьева М. А. Факторы, влияющие на содержание 20-гидроксизекдизона в левзее сафлоровидной (обзор) // *Вестник Пермского федерального исследовательского центра*. 2020. № 4. С. 62–75. doi: 10.7242/2658-705X/2020.4.6.
4. *Norsesquiterpene hydrocarbon, chemical composition and antimicrobial activity of Rhaponticum carthamoides root essential oil* / J. Havlik, M. Budesinsky, P. Kloucek, et al. // *Phytochemistry*. 2009. Vol. 70 (3). P. 414–418. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.12.018.
5. *Rhaponticum carthamoides transformed root extract inhibits human glioma cells viability, induces double strand DNA damage, H2A.X phosphorylation, and PARP1 cleavage* / E. Skala, M. Toma, T. Kowalczyk, et al. // *Cytotechnology*. 2018. 70 (6). P. 1585–1594. doi: 10.1007/s10616-018-0251-3.
6. *Caffeoylquinic Acids with Potential Biological Activity from Plant In vitro Cultures as Alternative Sources of Valuable Natural Products* / E. Skala, J. Makowczyńska, J. Wiczfinska, et al. // *Current pharmaceutical design*. 2020. Vol. 26 (24). P. 2817–2842. doi: 10.2174/1381612826666200212115826.
7. Андреев Б. Г., Волобаев П. А., Горбунова И. А. и т. д. *Красная книга Кузбасса / 3-е издание, переработанное и дополненное*. Кемерово: «ВЕКТОР-ПРИНТ». 2021. Т. 1. 240 с.
8. *Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциала* / В. Решетников, Е. Спиридович, Т. Фоменко и др. // *Наука и инновации*. 2014. № 5(135). С. 21–25.

9. *The Essential Oils of Rhaponticum carthamoides Hairy Roots and Roots of Soil-Grown Plants: Chemical Composition and Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities* / E. Skala, P. Rijo, C. Garcia, et al. // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016. vol. 2016. Article ID 8505384. URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/8505384/> (дата обращения: 16.10.21). doi:10.1155/2016/8505384.
10. *Establishment of hairy root cultures of Rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives* / E. Skala, A. Kicel, M.A. Olszewska, et al. // *BioMed research international*. 2015. Vol. 2015. Article ID 181098. URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/181098/> (дата обращения: 15.10.21). doi: 10.1155/2015/181098.
11. Величко Н. А., Смольникова Я. В. Влияние технологических параметров экстракции на выход экстрактивных веществ из левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) // *Вестник КрасГАУ*. 2017. № 10(133). С. 73–78.
12. Пат. № 2130709. Способ получения соматических эмбрионидов в культуре *in vitro* левзеи сафлоровидной / Н.А. Величко, Е.В. Никонорова, С.М. Репях и др.; патентообладатель: Сибирский государственный технологический университет. опубл. 27.05.1999.
13. Murashige T., Scoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture // *Physiology Plantarum*. 1962. № 15. P. 473–497.
14. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima O. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* 1968. № 50 (1). P. 151–158.
15. Подбор системы аппаратного выращивания суспензионных культур клеток и корневых культур *in vitro* в биореакторах различной конструкции и объема / Л. К. Асякина, Л. С. Дышлюк, А. В. Позднякова и др. // *Вестник Южно-Уральского государственного университета*. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2021. Т. 9. № 3. С. 41–52. doi: 10.14529/food210305.
16. *Inhibition of human glioma cell proliferation by altered Bax/Bcl-2-p53 expression and apoptosis induction by Rhaponticum carthamoides extracts from transformed and normal roots* / E. Skala, P. Sitarek, M. Toma, et al. // *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2016. Vol. 68 (11). P. 1454–1464. doi: 10.1111/jphp.12619.
17. Изучение физико-химических свойств и биологической активности экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro* / Ионг Янг, Л. К. Асякина, О. О. Бабич и др. // *Техника и технология пищевых производств*. 2020. Т. 50. № 3. С. 480–492. doi: 10.21603/2074-9414-2020-3-480-492.
18. *Effect of Angelica gigas Nakai Ethanol Extract and Decursin on Human Pancreatic Cancer Cells* / B. Kweon, Y.H. Han, J.Y. Kee, et al. // *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020. Vol. 25(9). 2028. URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/9/2028#cite> (дата обращения: 16.10.21). doi: 10.3390/molecules25092028.
19. *Quantitative and qualitative profile of biologically active substances extracted from purple echinacea (Echinacea Purpurea L.) growing in the Kemerovo region: functional foods application* / A.V. Zaushintsena, I.S. Milentyeva, O.O. Babich, et al. // *Foods and Raw Materials*. 2019. Vol. 7(1). P. 84–92. doi: 10.21603/2308-4057-2019-1-84-92.
20. *Chlorogenic Acid and Its Microbial Metabolites Exert Anti-Proliferative Effects, S-Phase Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Caco-2 Cells* / S. Sadeghi Ekbatan, X.Q. Li, M. Ghorbani, et al. // *International journal of molecular sciences*. 2018. Vol. 19(3). 723. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877584/#> (дата обращения: 16.10.21). doi: 10.3390/ijms19030723.

Поступила в редакцию 19.11.2021

После доработки 22.12.2021

Принята к публикации 02.02.2022