

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО**(12) Описание изобретения**
К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 2502118

(22) 23.06.2025

(46) Бюл. 226, 2025

(71) Шарофова Мижгона Умедджоновна (TJ);

Миршахи Массуд (FR)

(72) Шарофова Мижгона Умедджоновна (TJ);

Миршахи Массуд (FR)

(73) Шарофова Мижгона Умедджоновна (TJ);

Миршахи Массуд (FR)

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСТРАКТА INULA
RHIZOCERHALA SCHRENK ДЛЯ
ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА И МИГРАЦИИ
КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИОЗА IN VITRO**

(56) 1. «The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability», Ke N. et al., (2011)];

2. Боймуродов Д.С. и др. Вестник педагогического университета (Естественные науки), №3(15), 2022, с.182-188.

(57) Изобретение относится к области биотехнологии, клеточной биологии и медицины, в частности, к применению растительных экстрактов

2

для подавления жизнедеятельности патологических клеток, ассоциированных с эндометриозом, в условиях *in vitro*.

Целью изобретения является разработка способа ингибирования роста, миграции, пролиферации и жизнеспособности клеток эндометриоза *in vitro* с использованием как неинвазивного мониторинга в реальном времени, так и классических методов оценки клеточного состояния.

Поставленная цель достигается применением экстракта корня *Inula rhizoccephala Schrenk*, полученного мацерацией в 70% этаноле в соотношении сырья к экстрагенту 1:10 (масса/объем), при инкубации в течение 4 недель в темном месте с периодическим перемешиванием и последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 1 часа, в качестве средства для ингибирования роста и миграции клеток эндометриоза *in vitro*. Обработку клеток проводят супернатантом экстракта в разведениях от X500 до X2000. Экстракт вызывает снижение жизнеспособности, пролиферации, адгезии клеток эндометриоза, а также индукцию апоптоза и некроза, что находят свое подтверждение методами Alamar Blue, xCELLigence, wound healing, TUNEL и проточной цитометрии.

Изобретение относится к области биотехнологии, клеточной биологии и медицины, в частности, к применению растительных экстрактов для подавления жизнедеятельности патологических клеток, ассоциированных с эндометриозом, в условиях *in vitro*.

Известен способ оценки клеточной жизнеспособности с использованием системы xCELLigence, которая совместно с традиционными анализами жизнеспособности клеток для оценки цитотоксических эффектов, использует специализированные микротитровальные пластины с интегрированными золотыми микроэлектродами для неинвазивного измерения электрического импеданса клеточной культуры. Этот импеданс используется как индикатор жизнеспособности клеток в реальном времени и без меток. Система позволяет различать нарушения жизнеспособности, такие как старение, клеточную токсичность и снижение пролиферации. Однако у известного способа выявлены следующие недостатки: способ не применялся для клеток эндометриоза, что ограничивает ее использование в данной области медицины; отсутствует использование в способе фитопрепаратов и растительных экстрактов, обладающих потенциалом для терапии; не реализован комплексный подход с использованием нескольких методов оценки жизнеспособности, адгезии, миграции и апоптоза; не учитывается динамика клеточного ответа на препараты с разной кинетикой воздействия [1].

Из уровня техники известно ингибирующее действие некоторых видов растений рода *Inula* на злокачественные клетки.

Известно ингибирующее воздействие растительных экстрактов двух видов девясила (*Inula macrophylla* Kar. et Kir. и *Inula rhizocephala* Schrenk) на клетки опухолевого происхождения, а также цитотоксическое влияние экстрактов *Inula rhizocephala* на линии раковых клеток. Из известного источника не известно влияние при воздействии указанных экстрактов на эпителиальные клетки эндометриоза, а также не применяются методы комплексного клеточного анализа, такие как оценка адгезии, миграции, мониторинг в реальном времени и индукция программируемой клеточной гибели (апоптоза). Таким образом, указанный источник может рассматриваться как прототип, но он не раскрывает специфического применения экстракта *Inula rhizocephala* в отношении клеток эндометриоза [2]. Целью изобретения является разработка способа ингибирования роста, миграции, пролиферации и жизнеспособности клеток эндометриоза *in vitro* с использованием как неинвазивного мониторинга в реальном времени, так и классических методов оценки клеточного состояния.

Поставленная цель достигается применением экстракта корня девясила корнеголового (*Inula rhizocephala* Schrenk), полученного мацерацией в 70% этаноле в

соотношении сырья к экстрагенту 1:10 (масса/объем), при инкубации в течение 4 недель в темном месте с периодическим перемешиванием и последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 1 часа, в качестве средства для ингибирования роста и миграции клеток эндометриоза *in vitro*. Обработку клеток проводят супернатантом экстракта в разведениях от X500 до X2000. Экстракт вызывает снижение жизнеспособности, пролиферации, адгезии клеток эндометриоза, а также индукцию апоптоза и некроза, что находят свое подтверждение методами Alamar Blue, xCELLigence, wound healing, TUNEL и проточной цитометрии. Осуществимость заявленного изобретения подтверждается результатами серии лабораторных экспериментов *in vitro*. В качестве активного агента использовался экстракт корня девясила корнеголового (*Inula rhizocephala* Schrenk), приготовленный мацерацией в 70% этаноле в соотношении 1:10 (м/об) с инкубацией в течение 4 недель в темном месте с периодическим перемешиванием. После центрифугирования при 5000 об/мин в течение часа, полученный супернатант применяли в разведениях от X500 до X2000.

Целевым объектом исследования служила клеточная линия 12Z (человеческие эпителиальные клетки эндометриальной ткани), выращенная в стандартных условиях. Влияние экстракта оценивали по следующим параметрам.

1. Оценка жизнеспособности клеток:

Влияние растительных экстрактов на жизнеспособность клеток эндометриальной линии человека 12Z оценивали через 24 и 48 часов инкубации с использованием теста AlamarBlue.

Для эксперимента использовали экстракты девясила корнеголового (*Inula rhizocephala* Schrenk), обозначенные как pl-1, pl-5, pl-6 и pl-9, в разведении 1:1000 (X1000). Культуральную среду без добавления экстракта применяли в качестве отрицательного контроля, а препарат M2YN — в качестве положительного контроля.

Результаты представлены в виде относительных единиц флуоресценции (RFU). Как представлено на рис. 1, экстракты pl-5, pl-6 и pl-9 вызывают достоверное снижение жизнеспособности клеток по сравнению с контролем, особенно при 48-часовой инкубации. Это свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта, подтвержденного снижением метаболической активности клеток в тесте AlamarBlue.

2. Оценка пролиферации клеток.

Пролиферативную активность клеток эндометриальной линии 12Z оценивали в реальном времени с использованием

растительными экстрактами pl-1 – pl-10 в разведении X1000. В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду без добавления экстрактов, а в качестве положительного контроля — препарат M2YN. Как показано на рис.2, экстракты девясила корнеголового pl-5, pl-6 и pl-9 вызывали значительное снижение индекса клеточного импеданса по сравнению с контролем, что указывает на подавление пролиферации эндометриальных клеток. Данные получены в динамике и отражают непрерывный мониторинг клеточной активности.

3. Оценка клеточной адгезии:

Влияние растительных экстрактов на адгезию клеток линии 12Z исследовали в условиях клеточной культуры, выращенной на полистирольных ячеек, предварительно обработанных 0,05% раствором бычьего желатина. Для оценки использовали экстракты pl-1 – pl-10 в разведениях 1:500 и 1:1000 (X500 и X1000).

Подсчёт адгезированных клеток проводился методом оптической микроскопии с последующей визуализацией и анализом изображения с помощью программного обеспечения. В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду, а в качестве положительного контроля — препарат M2YN.

Результаты представлены на рис. 3 и рис 4, где: на рис. 3 показаны микроскопические изображения клеток, прикреплённых к подложке, а на рис. 4 приведены количественные данные по числу адгезированных клеток.

Как видно из результатов, экстракты девясила корнеголового вызывают выраженное подавление клеточной адгезии по сравнению с контролем. Причём эффект был более выраженным при разведении 1:500, что указывает на дозозависимое усиление ингибирующего действия.

4. Исследование миграции клеток.

Миграционная активность клеток линии 12Z исследовалась методом заживления ран (wound healing assay) в условиях *in vitro*. Клетки выращивали в полистирольных культуральных ячейках до формирования монослоя, после чего в центральной части создавали механический разрыв (scratch), имитирующий "рану".

После нанесения "раны" клетки инкубировали с экстрактами девясила корнеголового pl-1 – pl-10 в разведении 1:2000 (X2000). В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду без добавок, в качестве положительного контроля — препарат M2YN. Ход миграции оценивали с помощью оптической микроскопии в динамике. Расстояние между краями раны измеряли до и после инкубации, и рассчитывали процент закрытия раны. Результаты

представлены на рисунках, где: на рис. 5 представлены визуальные данные микроскопии, иллюстрирующие эффект экстрактов на миграцию клеток. На рис.6- представлена количественная оценка степени закрытия раны под действием различных экстрактов.

Согласно полученным данным, экстракты *Inula rhizocephala* Schrenk pl-5, pl-6 и pl-9 вызывают значительное ингибирование миграции клеток по сравнению с контролем, что выражается в замедленном закрытии "раны". Максимальный эффект наблюдался при разведении 1:2000, что подтверждает наличие выраженной антимиграционной активности у данных образцов.

5. Оценка апоптоза и некроза клеток.

Для оценки индукции апоптоза в клетках линии 12Z под действием экстрактов девясила корнеголового (*Inula rhizocephala* Schrenk) pl-5, pl-6 и pl-9 был проведён анализ методом TUNEL и проточной цитометрии.

В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду с добавлением 70% этанола в разведении 1:500, а в качестве положительного контроля — препарат M2YN.

TUNEL-анализ (определение апоптоза)

Проведён флуоресцентный TUNEL-анализ, результаты которого представлены на Рис. 7.

Положительные клетки TUNEL визуализируются в виде флуоресцентных зелёных точек (FITC), указывающих на фрагментацию ДНК — признак апоптоза.

DAPI использовался для контрастного окрашивания ядер всех клеток.

Совмещение сигналов FITC и DAPI интерпретируется как апоптотические клетки.

Количественная оценка числа апоптотических клеток представлена на рис. 8. Экстракты pl-5, pl-6 и pl-9 демонстрируют значительное увеличение числа TUNEL-положительных клеток по сравнению с контролем.

Подтверждение индукции клеточной гибели было получено методом проточной цитометрии с использованием красителей Annexin V-FITC (апоптоз) и йодида пропидия (PI) (некроз).

На рис. 9 представлены результаты анализа клеточной популяции после обработки экстрактами.

На рис.10 количественная оценка апоптоза. Экстракт pl-5 показал наибольшее апоптотическое действие.

На рис. 11 оценка некроза по PI-позитивным клеткам. Экстракты pl-5 и pl-9 вызывали значительное повышение уровня некроза по сравнению с контролем.

На рис. 12 обобщённый график распределения клеточной популяции по состояниям: живые, преапоптотические, апоптотические и некротические. Результаты демонстрируют, что pl-5

обладает выраженным некротическим и апоптотическим эффектом на клетки

7

1650

Полученные данные подтверждают, что экстракты *Inula rhizocephala* Schrenk pl-5, pl-6 и pl-9 индуцируют как апоптоз, так и некроз клеток эндометриоза *in vitro*, при этом наиболее выраженный эффект оказывает экстракт pl-5.

Экспериментальные исследования *in vitro* показали, что экстракт девясила корнеголового в указанных концентрациях вызывает снижение метаболической активности клеток (по данным AlamarBlue), замедление роста (по данным xCELLigence), нарушение миграционной способности (wound healing), а также повышенное

эндометриоидной линии 12Z.

8

количество апоптотических и некротических клеток (TUNEL, проточная цитометрия).

Заявленное изобретение может быть использовано для доклинической оценки эффективности фитопрепаратов против клеток эндометриоза, а также при разработке новых средств на основе растительного сырья для вспомогательной терапии эндометриоза.

Формула изобретения

1. Применение экстракта корня девясила корнеголового (*Inula rhizocephala* Schrenk), полученного мацерацией в 70% этаноле в соотношении сырья к экстрагенту 1:10 (масса/объем), при инкубации в течение 4 недель в темном месте с периодическим перемешиванием и последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 1 часа для ингибирования роста и миграции клеток эндометриоза *in vitro*.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что обработку клеток проводят супернатантом экстракта корня девясила корнеголового (*Inula*

rhizocephala Schrenk) в разведениях от X500 до X2000.

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что экстракт девясила корнеголового (*Inula rhizocephala* Schrenk) вызывает снижение жизнеспособности, пролиферации, адгезии клеток эндометриоза, а также индукцию апоптоза и некроза.

4. Применение по любому из пп.1–3, при котором указанные эффекты подтверждаются методами Alamar Blue, xCELLigence, wound healing, TUNEL и проточной цитометрии.

Применение экстракта *Inula rhizoccephalan* Schrenk для
ингибирования роста и миграции клеток
эндометриоза *in vitro*

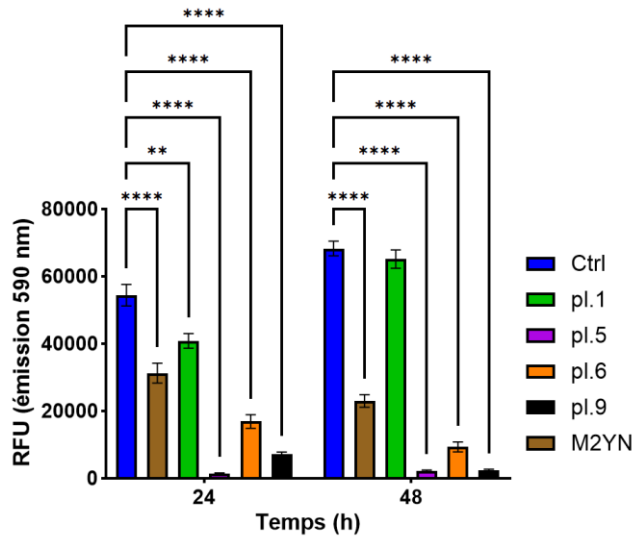


рис.1

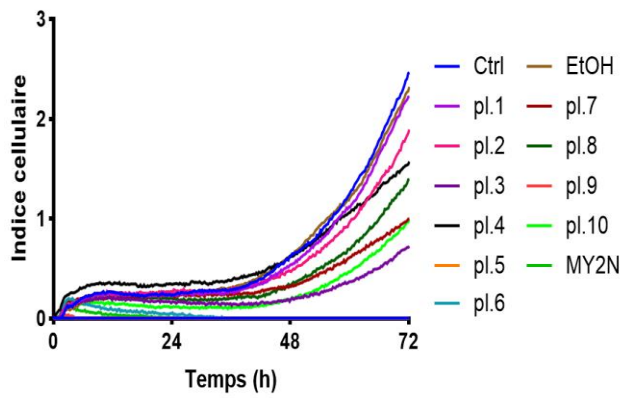


рис.2

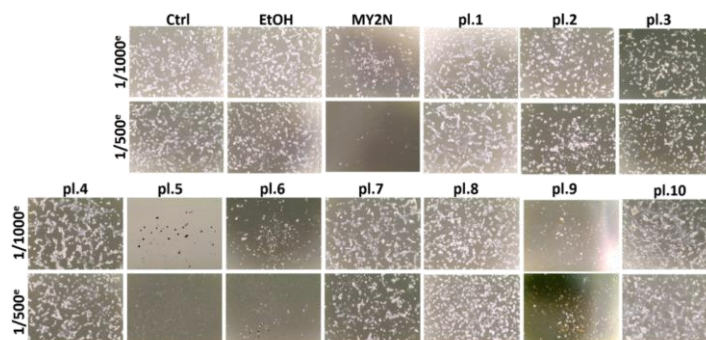


рис.3

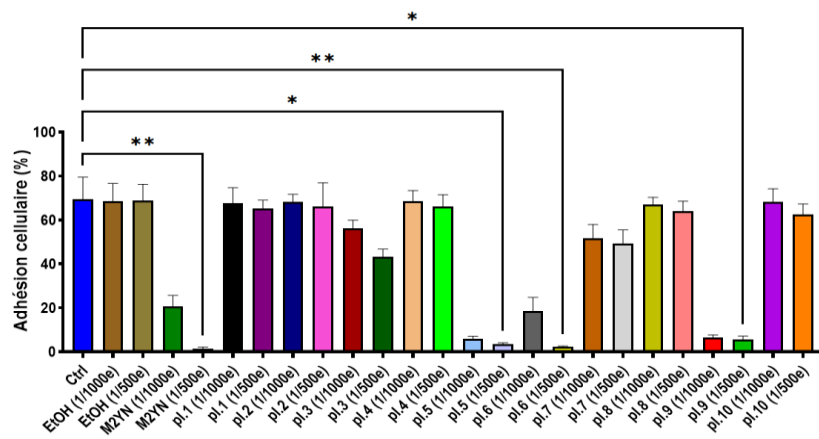


рис.4

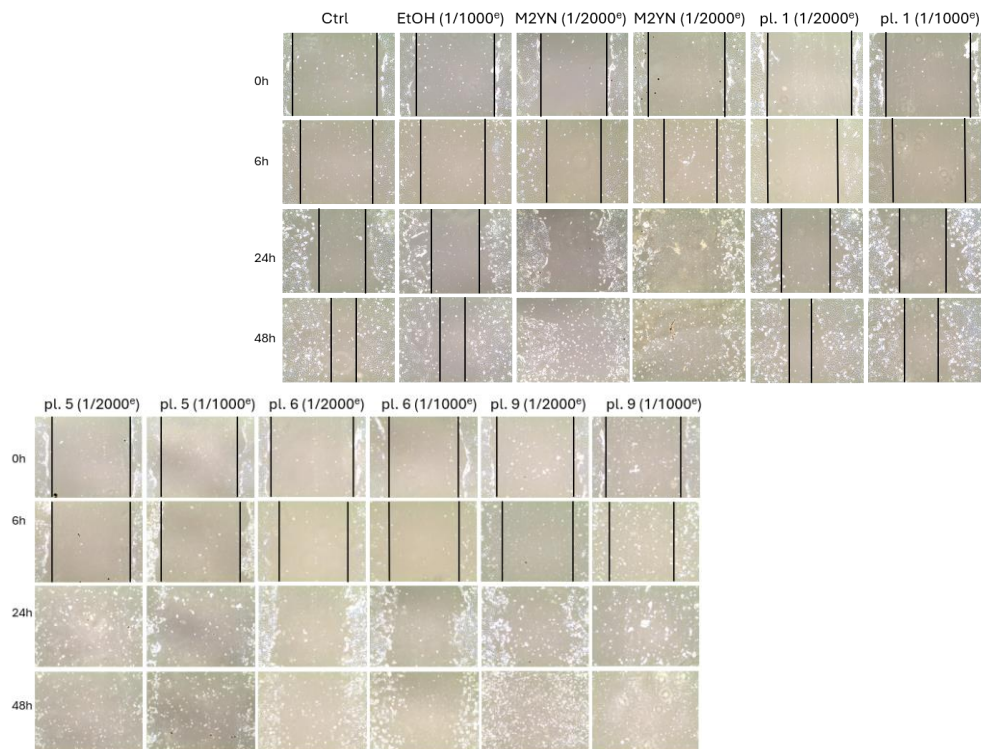


рис.5

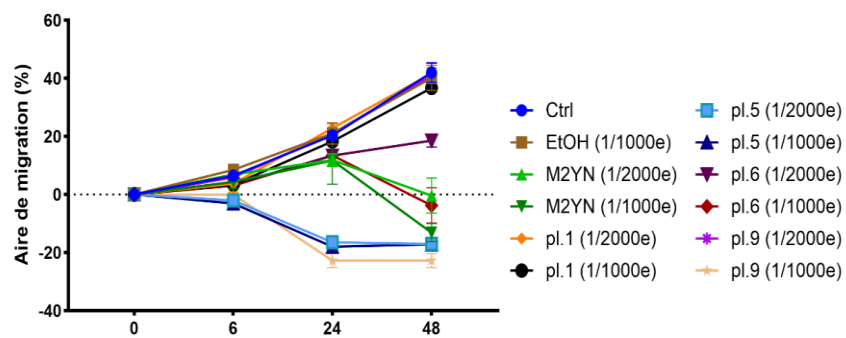


рис. 6

13

1650

14

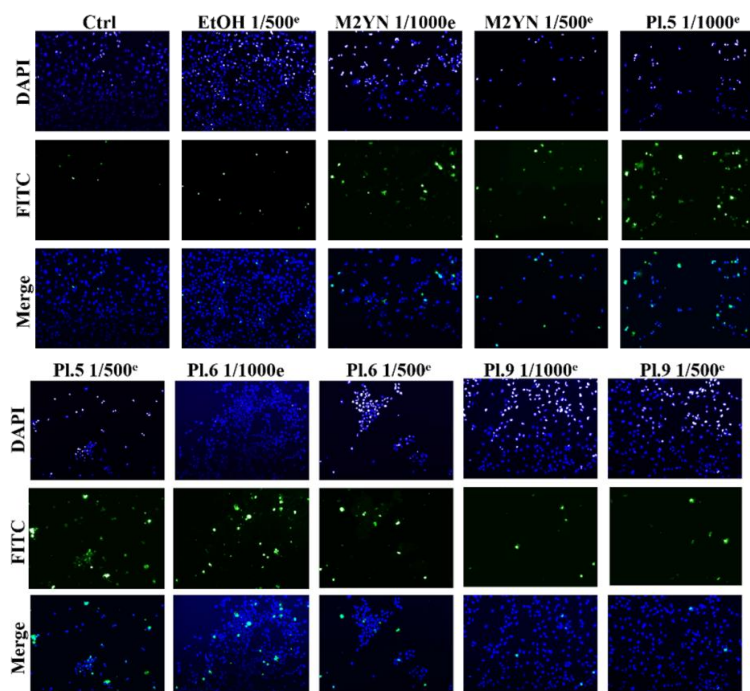


рис. 7

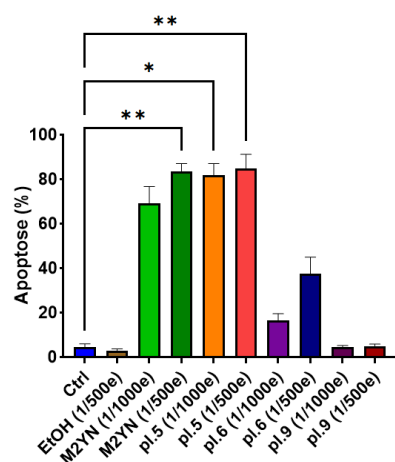


рис. 8

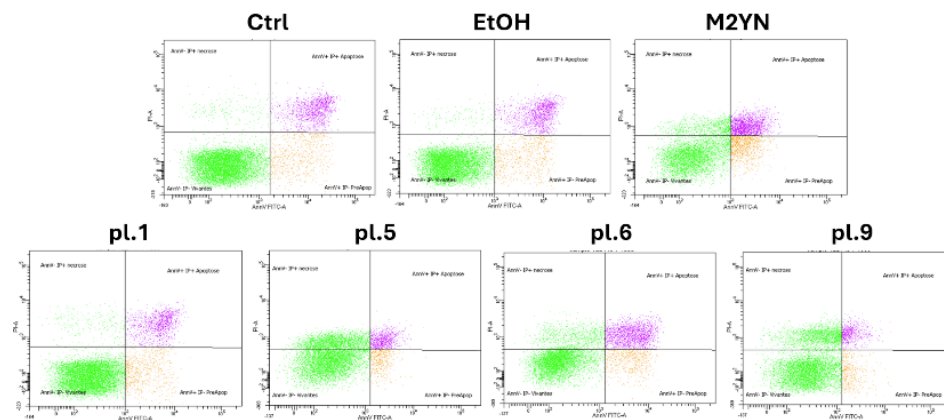


рис.9

15 1650 16

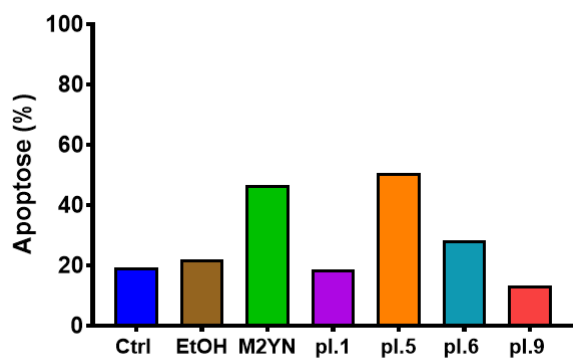


рис.10

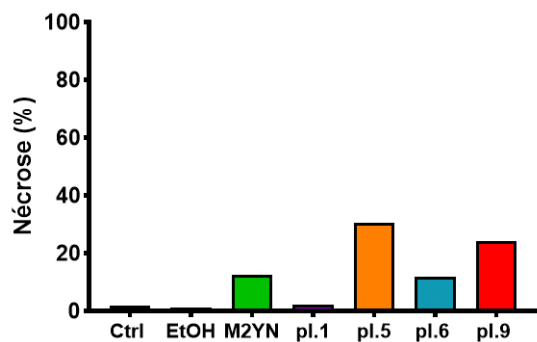


рис.11

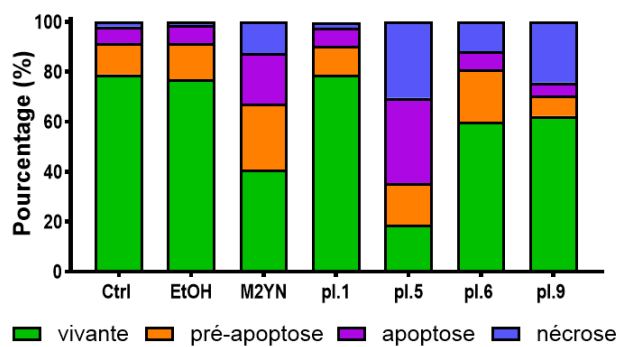


рис.12

Компьютерный набор: Газиев М.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а		