

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е. И. Шишацкая

« _____ » _____ 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ
ФЕНОЛОВ IN VITRO

Руководитель: _____ д.б.н, профессор Шишацкая Е.И.

Студент: ББ14-02Б Попкова А. В.

Красноярск

2018

Содержание

Содержание	3
1 Обзор литературы.....	5
1.1 Полифенолы	5
1.2 Источники фенольных соединений, их антиоксидантные и антикарциногенные свойства	9
1.2.1 Флавоноиды	9
2 Материалы и методы	13
3 Результаты и обсуждение.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Сорбционная емкость эритроцитов через 3 часа культивирования.....	Ошибка! За
3.2 Осмотическая резистентность эритроцитов через 3 часа культивирования на разных средах.	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Активность восстановления МТТ в формазан через 3 часа культивирования на разных средах.	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Морфология эритроцитов на средах с различными концентрациями растительных фенолов (РФ)	Ошибка! Закладка не определена.
3.4.1 Динамика нормоцитов на средах разного состава в течение 3 часов культивирования на разных средах.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.4.2 Аномальные фенотипы эритроцитов.....	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	Ошибка! Закладка не определена.
Список использованных источников	19
Приложение 1	23

Введение

Растительные фенолы – большой класс разнообразных по структуре вторичных метаболитов. У растений фенольные соединения могут выступать в качестве токсинов и пестицидов, обеспечивающих защиту растений от фитофагов и патогенных бактерий и грибов. Фенольные соединения выступают в качестве аттрактантов, привлекающих симбиотические виды, и участвуют в аллелопатических взаимодействиях

Растительные фенолы обладают антиоксидантной активностью. Растительные фенолы эффективно взаимодействуют с гидроперекисными радикалами с образованием фенольных радикалов. Но при этом достигается эффект ингибирования свободнорадикального окисления, поскольку фенольные радикалы характеризуются высокой стабильностью и практически не участвуют в реакциях продолжения цепей окисления.

Для человека и животных растительные фенолы – ксенобиотики, способные влиять на процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток.

Для многих фенолов в системах *in vitro* и на модельных животных показана антиканцерогенная активность. Фенолы рассматриваются и как агенты для лечения различных форм ожирения: показано, что фенолы способны ингибировать дифференцировку адипоцитов и депонирование липидов (Subash-Babu and Alshatwi, 2015), снижать уровень жирных кислот и триациглицеридов в крови (Niu et al., 2012). Растительные фенолы рассматриваются как перспективные агенты для лечения нейродегенеративных заболеваний и атеросклероза.

С другой стороны, для человека и животных растительные фенолы – ксенобиотики, которые могут быть токсичными. Скрининг цитотоксичности растительных фенолов позволяет оценить перспективы использования растительных фенолов в качестве терапевтических агентов. Тестирование цитотоксичности фенольных соединений в клеточных культурах - является

обязательным этапом в отборе кандидатов для создания лекарственных форм.

Цель

Изучить биологические эффекты растительных фенолов *Vaccinium myrtillus* в кратковременной культуре эритроцитов.

Задачи

1. Оценить влияние водорастворимых фенолов черники (*Vaccinium myrtillus*) на морфологию эритроцитов.
2. Определить влияние фенолов черники на жизнеспособность и сорбционную емкость эритроцитов.
3. Оценить защитные эффекты фенолов в условиях индуцированного окислительного стресса.

1 Обзор литературы

1.1 Полифенолы

В настоящее время питание приобретает все большее значение, поскольку основные продукты переработки обрабатываются таким образом, что органолептические свойства преобладают над их питательным составом. Исследования показали, что правильные диетические привычки, включая потребление большого количества различных фруктов, бобовых и зерновых могут предотвратить 10% -70% смертей от рака [1]. Однако вещества в перечисленных продуктах, которые в основном способствуют профилактике и лечению болезней, были обнаружены не так давно [2]. Эти очень важные вещества представляют собой полифенолы, которые проявляют ещё большее антиоксидантное действие, чем витамины [2,3]. Полифенолы представляют собой большую группу по меньшей мере 10000 различных соединений, которые содержат одно или несколько ароматических колец с одной или несколькими гидроксильными группами, присоединёнными к ним [4,5]. Как вторичный метаболиты растений присутствуют в изобилии в большинстве фруктов и овощей [5]. Наиболее часто встречающимися диетическими полифенолами являются флавоноиды и фенольные кислоты [6]. В растениях полифенолы обычно участвуют в защите от различных типов стресса [7]. Они обеспечивают защиту от реактивных форм кислорода и азота, ультрафиолетового света, патогенов, паразитов и хищных растений [8]. Древние цивилизации использовали эти многочисленные биологические эффекты для продвижения и улучшения здоровья на протяжении веков [9]. Напротив, наши знания об их свойствах до недавнего времени были очень ограниченными [8]. Не так давно полифенолы даже рассматривались как несущественные анти-питательные вещества [10]. В настоящее время достаточно свидетельств из обширных исследований их антиоксидантных, противовоспалительных и других биологических эффектов, которые оказывают на предотвращение различных патологий, включая сердечно-сосудистые заболевания и рак [11]. Экспериментально подтверждено что

полифенолы не только предотвращают различные заболевания, но также влияют на распространение болезни, подавляют прогрессию и даже способствуют процессу заживления [5, 12].

Преимуществами полифенолов в качестве противоопухолевых средств являются их высокая доступность, низкая токсичность, специфичность реакции и различные биологические эффекты. Комбинация цитопротективного воздействия на нормальные клетки и цитотоксические эффекты в отношении раковых клеток, являются основным преимуществом полифенолов как антиканцерогенных агентов [12]. Их роль в канцерогенезе заключается в регуляции рецептора фактора роста взаимодействий и клеточных сигнальных каскадов, которые могут вызвать остановку клеточного цикла и воздействие на выживаемость клеток и апоптоз раковых клеток [13]. Полифенолы в основном индуцируют апоптоз посредством проокислительного действия, которое действует вместо их антиокислительного действия в зависимости от их концентраций, клеток-мишеней и условий окружающей среды [2,14,15]. Кроме того, полифенолы помогают «установить» иммунную систему организма путем ингибирования ангиогенеза, необходимого для роста опухоли, и действуют как противовоспалительные средства [13].

На последних стадиях рака полифенолы ослабляют адгезию и инвазивность клеток, при этом уменьшая их метастатический потенциал. Однако биодоступность полифенолов представляет собой большее влияние только когда они достигают органов-мишеней в очень низких концентрациях[13].

С другой стороны, это может привести к проблеме токсичности конкретных агентов при введении высоких доз [2]. Было показано, например, что некоторые экстрагированные полифенолы в высоких концентрациях действуют даже в противоположном направлении: вместо предотвращения рака они могут способствовать его формированию и прогрессированию

[4,16,17]. Напротив, некоторые исследования показали, что когда в сочетании с другими полифенолами, индивидуальный полифенол может оказывать значительно улучшенные химиопротекторные и другие благоприятные свойства при значительно более низких концентрациях [18,19]. Синергическое действие полифенольной смеси дополнительно приводит к одновременному воздействию на различные пути заболевания, соответственно способствуя более быстрому и эффективному заживлению [19].

Диетические полифенолы преимущественно присутствуют в гликозилированных формах с одним или несколькими сахарными остатками, конъюгированных с гидроксильной группой или ароматическим кольцом [20,21]. Это является основной причиной их низкой абсорбции в желудке, только агликаны и некоторые глюкозиды могут абсорбироваться в тонком кишечнике [20]. По сравнению с кишечником толстая кишка не усваивает полифенолы, что приводит к более длительному времени поглощения, которое может составлять до 9 ч [20]. Глюкозиды в источнике пищи из полифенолов обеспечивают более быструю и эффективную абсорбцию полифенолов [20]. Однако агликаны некоторых изофлавонов показали превосходное поглощение их гликозилированных форм [20]. Изофлавоны представляют собой наилучшие поглощенные полифенолы вместе с галловой кислотой, за которыми следуют катехины, флаваноны и глюкозиды кверцетина [22].

Полифенолы после приема подвергаются трем основным типам конъюгации: метилирование, сульфатирование и глюкуронидирование [20]. Некоторые из этих метаболических реакций способствуют их химиопротекторной деятельности. Раковые защитные эффекты многих полифенолов при разных раковых заболеваниях были показаны независимо от их различных механизмов действия [4,23]. Однако, решающими

факторами, определяющими роль конкретного полифенола в органах-мишенях, остаются биодоступность и уровень ткани [24].

Взаимодействие полифенолов с липидами, такими как мембраны липидных клеток, ограничено полярной областью липидного бислоя [3]. Их проникновение через липидную мембрану зависит от их структуры, где предпочтительна плоскость [3].

Поскольку процессы, связанные с использованием органических растворителей, известны своим нежелательным экологическим и биологическим воздействием, интенсивные исследования сосредоточены на новых устойчивых методах для обработки веществ [26]. Экстракция сверхкритическими жидкостями (ЭСЖ) не вредна для пищевых компонентов и является экологически безопасным, поэтому применение сверхкритических жидкостей представляет собой хорошей альтернативой другим методам переработки с участием опасных органических растворителей и высоким спросом на энергию. [27].

К преимуществам охраны здоровья и безопасности относится тот факт, что наиболее важные ЭСЖ (СЖ CO_2 и СЖ H_2O) являются нераковые, нетоксичные, не мутагенные, невоспламеняющиеся и термодинамически стабильные. Плотный CO_2 может быть даже использован в качестве «зеленой» обрабатывающей среды, особенно когда есть органические растворители и следует избегать высоких температур обработки [28].

1.2 Источники фенольных соединений, их антиоксидантные и антикарциногенные свойства

1.2.1 Флавоноиды

Флавоноиды представляют собой большую часть диетических полифенолов (до 60%) [5]. Их вездесущность и впечатляющие биологические функции, которые мы продолжаем тщательно исследовать как потенциальные наркотики или пищевые добавки. Флавоноиды состоят из дифенилпропан-флавонового-скелета с трехуглеродным мостиком между фенильными группами, обычно циклизованного с кислородом [30,31]. Разнообразие среди флавоноидов требует дальнейшего деления на подклассы. Большинство

Важные подклассы включают антоцианы, халконы, флаванолы (катехины), флаваноны, флавоны, флавонолы и изофлавоны [5,6,11]. За исключением катехинов, флавоноиды в растениях связаны с сахарами в виде β -гликозидов [30].

Флавоноидные гликозиды в основном расположены во внешних частях растения; тогда как корни и клубни содержат очень низкие концентрации флавоноидов с некоторыми заметными исключениями, такими как лук и солодка [20].

Некоторые из наиболее распространенных флавоноидов - флавонол кверцетин, богатый луком, брокколи, чаем, и яблоки; флаваноловый катехин

содержится в чае и различных фруктах; флаванон и нарингенин, присутствует в цитрусовых; цианидин и антоцианин, придавая цвет многим красным фруктам / ягодам (черная смородина, малина, клубника, черника, виноград и т. д.); дайдзеин и генистеин - основные изофлавоны в сое [8,32].

Всесторонний обзор литературы показал, что существует множество методов и стратегий используемых для извлечения определенного класса флавоноидов [33,34]. Основной вопрос экстракция флавоноидов (особенно гликозидов) заключается в том, что их можно легко разлагать ферментативным действием, когда собранный растительный материал является свежим или не высушенным.

Изофлавоны, флаваноны, метилированные флавоны и флавонолы, поскольку менее полярные флавоноиды экстрагируют такими органическими соединениями, как хлороформ, дихлорметан, диэтиловый эфир или этилацетат. Флавоноидные гликозиды и более полярные агликоны извлекаются с использованием спиртов или смесей спирт-вода [35,36].

Катехины, проантоцианидины и конденсированные танины как наиболее видные представители из флаван-3-олов, часто могут быть извлечены непосредственно водой [37].

Флавоноиды проявляют свою антиоксидантную активность, эффективно удаляя различные свободные радикалы (например, супероксидный анион и пероксинитрит), регулируя активность фермента, опосредованного окислительным стрессом [12], и хелатированием переходных металлов, участвующих в процессах радикального формирования [38]. Другие антиканцерогенные свойства включают регулирование сигнальных путей, вовлечённых в канцерогенез, взаимодействие с белками, которые контролируют прогрессирование клеточного цикла и эффективную модуляцию сигнальных путей, связанных с бесключевыми связями (Wnt) [12]. Флавоноиды могут влиять на все три

стадии рака: инициирование, развитие и прогрессирование путем модуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, ангиогенеза, а также метастазов [29]. Более того, химиопреентивный эффект диетических флавоноидов весьма специфичен, поскольку раковые клетки показали, что они более чувствительны к действию полифенолов, чем нормальные клетки [30]. Кроме того, флавоноиды проявляют антибактериальные, противовоспалительные, антиаллергические и антитромботические действия [38].

1.2.1.1 Антоцианидины

Антоцианидины встречаются как гликозиды, названные антоцианами[7]. В качестве универсальных растительных красителей антоцианидины представляют наиболее заметные члены биофлавоноидной группы фитохимикатов [9, 39]. Более 600 антоцианидиновых молекулярных структур были идентифицированы до настоящего времени, прежде всего потому, что они обеспечивают красный, фиолетовый и синий оттенки различных фруктов, овощей, зерновых культур и цветов [9]. Основными источниками антоцианидинов являются чай, мед, вина, фрукты, такие как яблоки, ягоды; овощи, такие как свекла и лук; орехи, оливковое масло, какао и хлопья [8,39]. Антоцианы в основном встречаются в цветках и плодах различных растений и только в меньшей степени в листьях [8,9]. Основные представители антоцианидиновой группы составляют дельфинидин, пеларгонидин, малвидин, цианидин и петунидин [9,39].

Антоцианины очень плохо усваиваются, хотя все метаболиты, возможно, не были идентифицированы, что привело к недооценке их биодоступности [22]. Биодоступность антоцианидинов и антоцианины все еще остаются проблемой для дальнейшего исследования, которое объясняло

бы противоречие в доступных результатах [39]. Основной причиной этого является, по-видимому, неспособность ученых отслеживать метаболический прогресс антоцианов после проглатывания, из-за множества продуктов метаболического распада, которые быстро производятся *in situ* [39].

Антоцианидины давно используются в качестве лекарственных средств в различных народных медикаментах однако в мире фармакологические свойства выделенных антоцианиновых пигментов были окончательно проверены только в последние годы [9, 39]. Хотя новые научные исследования ясно предполагают, что антоцианидины используют несколько различных механизмов действия для достижения благоприятных для здоровья биологических эффектов, наиболее широко разрекламированные остаются свободнорадикальная очистка и антиоксидантная ёмкость [8,9,39]. Изоляты антоцианидинов и богатые антоцианидином смеси биофлавоноидов продемонстрировали защиту от расщепления ДНК, эстрогенную активность (изменение развития гормонально-зависимых симптомов болезни), ингибирование фермента, стимулирование продуцирования цитокинов (тем самым регулируя иммунные реакции), противовоспалительную активность, перекисное окисление липидов, снижение проницаемости и хрупкости капилляров, а также укрепление мембран [8,9,39]. Следовательно, они нужны для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний и противораковых и химиопротекторных свойств, индуцируют профилактику и лечение нескольких опухолей [8, 38]. Исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировала заметную способность антоцианидинов к снижению пролиферации раковых клеток и к ингибированию опухоли образование [8,9,39]. Предполагается, что основные механизмы профилактики канцерогенеза включают ингибирование ферментов циклооксигеназы, мощный антиоксидантный потенциал и блокирование активации пути MAPK [9, 38, 39].

Степень биоактивных свойств антоцианинов сильно зависит от их химической структуры (положение, число и типы заместителей) и их внутриклеточной локализации [39].

Антоцианидины обладают многочисленными дополнительными биологическими эффектами, такими как повышение (ночного) зрения, увеличение ингибирования массы тела и жировой ткани [39]. Кроме того, антоцианидины были зачислены с возможностью модуляции когнитивных и моторных функций, для улучшения памяти; вследствие этого, они играют важную роль в профилактике неврологических заболеваний, возможно, из-за их высокой биодоступности в эндотелиальных клетках [39]. Общая антимикробная активность антоцианинов хорошо зарекомендовала себя, включая значительное ингибирование биосинтеза афлатоксина [39].

2 Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали эритроциты капиллярной крови.

В работе использовали следующие реактивы и реагенты:

- 0,1М PBS с 5мМ глюкозой (рН = 7,4);
- ЭДТА (0,2 мг/мл);
- 2,5% глутаровый альдегид;
- МТТ; (полностью)
- DMSO; (диметилсульфоксид)
- 0,9% NaCl,
- 0,0025% раствор красителя метиленового синего (МС),
приготовленный на 0,9% NaCl.
- 0,005% раствор красителя альциановый синий, приготовленный
0,9% NaCl

Выделение и культивирование эритроцитов

Выборку доноров крови формировали на основе анкетирования (Приложение 1). Эритроциты выделяли из капиллярной крови. Эритроциты отмывали от компонентов плазмы 0,1М фосфатным буфером с 5мМ глюкозой и ЭДТА (0,2 мг/мл). Концентрацию клеток определяли в камере Горяева и доводили до 10^7 кл/мл. Культивирование эритроцитов проводили в нескольких вариантах.

1. Контроль, среда культивирования 0,1М фосфатный буфер с 5мМ глюкозой.

2. Экспериментальный вариант 1, среда культивирования: 0,1М фосфатный буфер с 5мМ глюкозой + экстракт растительных фенолов.

3. Экспериментальный вариант 2, среда культивирования: 0,1М фосфатный буфер с 5мМ глюкозой + CuSO_4 (конечная концентрация 100 мкМ).

4. Экспериментальный вариант 3, среда культивирования: 0,1М фосфатный буфер с 5мМ глюкозой + CuSO_4 (конечная концентрация 100 мкМ) + экстракт растительных фенолов.

Эритроциты культивировали на 0,1 фосфатном буфере с 5мМ глюкозой (рН=7,4) при $T=37^\circ\text{C}$, 1, 2 и 3 ч.

Получение флавоноидов

Навеску замороженных ягод растирали в фарфоровой ступке. К гомогенату добавляли равный объем 0,1М ФБС с 5 мМ глюкозой, тщательно перемешивали. Суспензию центрифугировали при 3000 об/мин, 20 мин. Супернатант, содержащий водорастворимые флавоноиды, использовали в экспериментах.

Морфологический анализ эритроцитов

После завершения инкубации клетки фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом. Морфологию клеток анализировали под световым микроскопом. В каждой пробе анализировали 200 клеток. Численность различных морфологических классов выражали в % от общего числа проанализированных клеток.

Определение жизнеспособности эритроцитов с помощью МТТ-теста

После завершения инкубации контрольные и экспериментальные пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант удаляли и к полученному клеточному осадку добавляли 200 мкл раствора МТТ (0,01 мг/мл). Пробы инкубировали 1 ч при 37° С.

После завершения инкубации пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант отбрасывали. В полученные клеточные осадки вносили 100 мкл диметилсульфоксида (DMSO). После полного растворения материала аликвоты (50 мкл) вносили в 96-луночный планшет и определяли оптическую плотность при длине волны 550 нм.

Оптическую плотность контрольных образцов принимали за 100%. Значения экспериментальных проб выражали в % от экстинкции контрольных проб.

Определение сорбционной емкости эритроцитов

После завершения инкубации контрольные и экспериментальные пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант отбрасывали. К клеточным осадкам добавляли 50 мкл 0,9% NaCl и 150 мкл 0,025% раствора метиленового синего. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Через 10 мин пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Из супернатанта отбирали аликвоты (50 мкл) и вносили в 96-луночный планшет. Оптическую плотность определяли при длине волны 630 нм.

В холостые пробы вносили 50 мкл 0,9% NaCl и 150 мкл 0,025% раствора метиленового синего. Из супернатанта отбирали аликвоты (50 мкл) и вносили в 96-луночный планшет. Оптическую плотность определяли при длине волны 630 нм.

Сорбционную емкость выражали в мкг красителя/10⁶ кл.

Определение осмотической резистентности эритроцитов

После завершения инкубации контрольные и экспериментальные пробы центрифугировали 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант отбрасывали. Клеточные суспендировали в 100 мкл 0,9% NaCl. Из каждой пробы в 2

пробирки отбирали аликвоты по 40 мкл. Клетки осаждали центрифугированием, 3000 об/мин, 10 мин. Супернатант удаляли.

В 1-й пробирке клеточный осадок суспендировали в 100 мкл 0,45% NaCl, во 2-й пробирке клеточный осадок суспендировали 100 мкл дистиллированной воды, инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Через 10 мин пробы центрифугировали, 3000 об/мин, 10 мин.

Из супернатанта отбирали аликвоты 50 мкл и вносили в 96-луночный планшет. Оптическую плотность определяли при длине волны 500 нм.

Экстинкцию проб, в которые вносили дист.воду принимали за 100%. Экстинкцию проб, в которые вносили 0,45% NaCl, выражали в % от варианта с дистиллированной водой. Это значение (%) определяли как степень гемолиза.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных результатов проводили по методу Критерия χ^2 Пирсона – это непараметрический метод, который позволяет оценить значимость различий между фактическим (выявленным в результате исследования) количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы.

Значение критерия χ^2 находили по формуле (1):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad (1)$$

Где:

i – номер строки (от 1 до r),

j – номер столбца (от 1 до c),

O_{ij} – фактическое количество наблюдений в ячейке ij ,

E_{ij} – ожидаемое число наблюдений в ячейке ij .

Определяли число степеней свободы по формуле (2):

$$f = (r - 1) * (c - 1) \quad (2)$$

Где:

f – число степеней свободы,

r – количество рядов в таблице,

c – количество столбцов в таблице.

Сравнивали значение критерия χ^2 с критическим значением при числе степеней свободы f (по таблице χ^2).

3 Результаты и обсуждение

Из текста бакалаврской работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Surh, Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals // *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 768–780. [CrossRef] [PubMed]
2. Fresco, P., The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis. / P. Fresco [и др.] // *Curr. Pharm. Des.* 2010, 16, 114–134. [CrossRef] [PubMed]
3. Hendric, A.B. Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds // *Acta Pharmacol. Sin.* 2006, 27, 27–40. [CrossRef] [PubMed]
4. Li, A.-N. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols /A.-N. Li [и др.] // *Nutrients* 2014, 6, 6020–6047. [CrossRef] [PubMed]
5. González-Vallinas, M. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy; a complementary approach with promising perspectives/ M. González-Vallinas [и др.] // *Nutr. Rev.* 2013, 71, 585–599. [CrossRef] [PubMed]
6. Araújo, J.R. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines / J.R. Araújo [и др.] // *Nutr. Res.* 2011, 31, 77–87. [CrossRef] [PubMed]
7. Asensi, M. Natural polyphenols in cancer therapy / M. Asensi [и др.] // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2011, 48, 197–216. [CrossRef] [PubMed]
8. Dai, J.; Mumper, J.R. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties / J. Dai, J.R. Mumper // *Molecules* 2010, 15, 7313–7352. [CrossRef] [PubMed]
9. Konczak, I.; Zhang, W. Anthocyanins—More Than Nature’s Colours / I. Konczak, W. Zhang // *J. Biomed. Biotechnol.* 2004, 5, 239–240. [CrossRef] [PubMed]

10. Lambert, J.D. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: Evidence from laboratory investigations / J.D. Lambert [и др.] // *Clin. Nutr.* 2005, 81 (Suppl. S1), 284S–291S. [PubMed]
11. Wu, J.-C. Anti-cancer efficacy of dietary polyphenols is mediated through epigenetic modifications / J.-C. Wu [и др.] // *Curr. Opin. Food Sci.* 2016, 8, 1–7. [CrossRef]
12. Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways // *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, 52, 507–526. [CrossRef] [PubMed]
13. Tabrez, S. Cancer Chemoprevention by Polyphenols and Their Potential Application as Nanomedicine / S. Tabrez [и др.] // *Sci. Health* 2013, 31, 67–98. [CrossRef] [PubMed]
14. Scalbert, A. Polyphenols: Antioxidants and beyond / A. Scalbert [и др.] // *Clin. Nutr.* 2005, 24 (Suppl. S1), 215S–217S. [PubMed]
15. Beltz, L.A. Mechanisms of Cancer Prevention by Green and Black Tea Polyphenols / L.A. Beltz [и др.] // *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2006, 6, 389–406. [CrossRef]
16. Lambert, J.D.; Elias, R.J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention / J.D. Lambert, R.J. Elias // *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 501, 65–72. [CrossRef] [PubMed]
17. Khan, N. Cancer Chemoprevention through Dietary Antioxidants: Progress and Promise / N. Khan [и др.] // *Antioxid. Redox Signal.* 2008, 10. [CrossRef] [PubMed]
18. Fantini, M. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment / M. Fantini [и др.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 9236–9282. [CrossRef] [PubMed]

19. De Kok, T.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds / T.M. De Kok [и др.] // *Nutr.* 2008, 47 (Suppl. S2), 51–59. [CrossRef] [PubMed]
20. Manach, C. Polyphenols: Food sources and bioavailability / C. Manach [и др.] // *Clin. Nutr.* 2004, 79, 727–747. [PubMed]
21. Mocanu, M.-M. Chemoprevention of breast cancer by dietary polyphenols / M.-M. Mocanu [и др.] // *Molecules* 2015, 20, 22578–22620. [CrossRef] [PubMed]
22. Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans / C. Manach [и др.] // I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81 (Suppl. S1), 230S–242S. [PubMed]
23. Yang, C.S. Inhibition of Carcinogenesis by Tea: Bioavailability of Tea Polyphenols and Mechanisms of Action / C.S. Yang [и др.] // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999, 220, 213–217. [CrossRef] [PubMed]
24. Yang, C.S. Inhibition of carcinogenesis by dietary Polyphenolic compounds / C.S. Yang [и др.] // *Annu. Rev. Nutr.* 2001, 21, 381–406. [CrossRef] [PubMed]
25. Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols // *Nutrients* 2010, 2, 1231–1246. [CrossRef] [PubMed]
26. Brunner, G. Gas Extraction. An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes // Steinkopff: Darmstadt, Germany; Springer: New York, NY, USA, 1994.
27. Brunner, G. Supercritical fluids: Technology and application to food processing // *J. Food Eng.* 2005, 67, 21–33. [CrossRef]

28. Lack, E. High Pressure technology: Fundamentals and application / E. Lack [и др.] // In Industrial Chemistry Library; Bertucco, A., Vetter, G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2000; Volume 9, p. 383.
29. Lewandowska, H. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development / H. Lewandowska [и др.] // J. Nutr. Biochem. 2015, 32, 1–19. [CrossRef] [PubMed]
30. Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention // J. Nutr. Biochem. 2007, 18, 427–442. [CrossRef] [PubMed]
31. Scalbert, A. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases / A. Scalbert [и др.] // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2005, 45, 287–306. [CrossRef] [PubMed]
32. Xiao, J.B. Advance on biotechnology for glycosylation of high-value flavonoids / J.B. Xiao [и др.] // Biotechnol. Adv. 2014, 32, 1145–1156. [CrossRef] [PubMed]
33. Calderon-Montaña, J.M. A review on the dietary flavonoid kaempferol / J.M. Calderon-Montaña [и др.] // Mini Rev. Med. Chem. 2011, 11, 298–344. [CrossRef] [PubMed]
34. Babova, O. Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent / O. Babova [и др.] // J. Supercrit. Fluids 2016, 107, 358–363. [CrossRef]
35. Wei, Y.D. The Total Flavanone of *Morus Alba* Extraction and the Identification by Ultrasonic Wave / Y.D. Wei [и др.] // Lishizhen Med. Mater. Med. Res. 2012, 23, 2811–2812.
36. Feng, R.-Z. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra* / R.-Z. Feng [и др.] // Int. J. Clin. Exp. Med. 2015, 8, 22328–22336. [PubMed]

37. Biesaga, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids // J. Chromatogr. A 2011, 1218, 2505–2512. [CrossRef] [PubMed]
38. Jiang, Y.-L. Natural Products as Anti-Invasive and Anti-Metastatic Agents /Y.-L. Jiang, Z.-P. Liu // Curr. Med. Chem. 2011, 18, 808–829. [CrossRef] [PubMed]
39. Lila, M.A. Anthocyanins and Human Health: An in Vitro Investigative Approach // J. Biomed. Biotechnol. 2004, 5, 306–313. [CrossRef] [PubMed]
40. Ghafoora, K. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology / K. Ghafoora [и др.] // Innov. Food Sci. Emerg. 2010, 11, 485–490. [CrossRef]

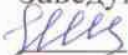
Приложение 1

Таблица - 1 Анкета донора

Вопрос	Ответ
Пол	
Возраст	
Наличие наследственных патологий (Сахарный диабет, аутоиммунные заболевания, болезни крови и т. д.)	
Перенесенные инфекционные заболевания (гепатит, полиомиелит и т.д.)	
Особенности питания: * В рационе преобладает пища растительного происхождения * В рационе преобладает животного происхождения	

<p>* Соотношение животной и растительной пищи составляет 1:1</p>	
<p>Употребление спиртных напитков:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Никогда не употреблял * Редкое употребление слабоалкогольных напитков * Редкое употребление крепких напитков 	
<p>Курение:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Никогда не курил * Курил, но бросил * 1 сигарета в неделю * 1 пачка сигарет в неделю * 5 пачек сигарет в неделю 	

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии


УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Е. И. Шишацкая

«21» июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЕНОЛОВ IN VITRO

Руководитель:  д.б.н, профессор Шишацкая Е.И.

Студент: ББ14-02Б  Попкова А. В.

Красноярск

2018