УДК: 665.336.3:616-006.441

ОЧИСТКА САПОГЕНІНУ ІЗ ОЛІЇ НАСІННЯ ВОВЧНИКА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЙОГО ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЛІМФОМІ NK/LY

М. М. Луцик[1], А. М. Ященко[1], І. В. Кичун[2], М. Д. Луцик[3], Р. С. Стойка[3]

[1]Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького,

[2] Інститут біології тварин НААН,

[3] Інститут біології клітини НАН України

Описано метод очистки сапогеніну із насінневої олії вовчника (Daphne mezereum L.). Отримано чотири фракції, з найбільшим виходом фракції F4. Речовина представляє собою в'язку олію, розчинну в етанолі, оцтовій кислоті, пропіленгліколі, дає позитивну реакцію Лібермана-Бурхарда на стероїди, володіє гемолітичною активністю. Вуглеводів і фосфору у складі препарату не виявлено. У мас-спектрі наявний один основний пік, молекулярна маса якого 483,1 Da. Речовина високо токсична, при внутрішньочеревному введенні мишам LD_{100} становить 6 мг/кг. При внутрішньочеревному введенні субтоксичних доз сапогеніну мишам з привитою асцитною лімфомою NK/LY виявлено цитотоксичний вплив препарату на пухлинні клітини і пригнічення їх проліферації. Терапевтичний ефект сапогеніну в умовах in vivo, однак, не спостерігався, що зумовлено його побічною токсичною дією з переважним ураженням органів шлунково-кишкового тракту.

Ключові слова: САПОГЕНІН, ВОВЧНИК (*Daphne mezereum* L.), ЛІМФОМА NK/LY.

Рослина вовче лико або вовчник, ботанічна назва *Daphne mezereum* L. (родина Thymelaeaceae) [1], застосовується у народній медицині при різних захворюваннях, у тому числі при онкологічних [2, 3]. У традиційній медицині Сходу (Китай, Корея, Японія) при онкологічних захворюваннях, зокрема при раку молочної залози, застосовують препарат генкванін (genkwanin), отримуваний із рослин виду Daphne genkwa (Sieb. et Zucci.) [4, 5], однак цей вид вовчника в Україні не зустрічається.

Фітохімічне дослідження вовчника описано в роботі [6], авторами було виявлено біля 15 речовин фенольної природи: оксикумаринів, флавоноїдів, катехінів. Отримано та ідентифіковано дафнін, дафнозид, дафнетин, дафноретин, умбелліферон, мезереїнова смола із вираженою подразнюючою дією. Всі частини рослини містять високо токсичні речовини, тому у народній медицині препарати з різних частин цієї рослини застосовуються переважно зовнішньо і місцево, а при внутрішньому вживанні настоїв приймають їх дуже обережно і під контролем лікаря [3].

Ґрунтовне дослідження протипухлинної активності речовин із насіння вовчника проведено Kupchan M. S., Baxter R. L. [7]. В якості активної речовини автори ідентифікували мезереїн, який пригнічував ріст експериментальних пухлин лейкозу L1210 і P 388 в експериментах *in vivo*.

За нашими неопублікованими даними в олії із насіння вовчника містяться речовини, які за властивостями відповідають сапонінам, біологічна активність яких практично невивчена. Останнім часом дослідженню протипухлинної активності сапонінів і сапогенінів приділяється значна увага [8–15]. Особливий інтерес представляють сапогеніни женьшеню, похідних даммарану, які володіють вираженою протипухлинною активністю і водночас малотоксичні щодо нормальних клітин [14, 16]. На сьогодні фірма Panagin Pharmaceuticals Inc виробляє ряд лікарських препаратів даммаранових сапогенінів, які застосовуються у хіміотерапії пухлин в клінічних умовах із позитивним результатом [16]. Таким чином, очистка, характеристика хімічної структури і біологічної активності сапонінів і сапогенінів із лікарських рослин є перспективним напрямком у науковому і практичному відношенні. Виходячи із вищеприведеного, ми вважали за доцільне дослідити властивості і протипухлинну активність речовини із властивостями сапоніну, очищену із олії вовчника.

Мета нашої роботи полягала в отриманні препарату очищеного сапогеніну шляхом фракціонування олії із насіння вовчника та дослідженні його впливу на ріст асцитної лімфоми NK/Ly і цитоморфологічні характеристики пухлинних клітин в умовах експерименту *in vivo*.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на мишах лінії C 57 Bl (n=43), самцях масою 22–26 г, згідно з етичними принципами проведення експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001). Тварин утримували на змішаному раціоні у стаціонарних умовах віварію.

Клітини лімфоми NK/Ly [18] отримали з колекції експериментальних пухлин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (м. Київ). Пасажування асцитної форми пухлини проводили інокулюванням внутрішньочеревно 10–12 млн пухлинних клітин із асциту, взятого на 7–8 день росту пухлини [19].

Для отримання олії із насіння вовчника 100 г насіння подрібнювали у кофемолці і екстрагували діетиловим ефіром шляхом перколяції у скляній колонці, пропускаючи чотирикратно об'єм розчинника,

рівний об’єму оброблюваного матеріалу. Після видалення ефіру з екстракту на роторному випаровувачі отримали 47,5 г олії.

Далі проводили фракціонування олії. Для цього 47 г олії змішували із 220 мл 0,2 н HCl, струшували і центрифугували при 2 тис об./хв. впродовж 30 хвилин. Нижній (водний) шар видаляли, олійний шар промивали водою, розшаровуючи емульсію центрифугуванням у тому ж режимі. Промиту олію змішували із 100 мл етанолу і залишали на 24 години при кімнатній температурі. Етанольний екстракт (верхній шар) відділяли і зберігали, нижній шар олії повторно екстрагували 50 мл етанолу і залишали на 48 годин. Етанольний екстракт збирали і об’єднували із первинним екстрактом. Після видалення етанолу на роторному випаровувачі отримали олійний залишок, який розмішували у 75 мл води, доводили pH до 9,0–9,5 з допомогою 10 % NaOH , в результаті чого утворювався колоїдний розчин. До нього при постійному перемішуванні додавали 1 н HCl до pH 7,5, після чого додавали 10% розчин хлориду кальцію до зниження pH до 5,6. При цьому спостерігалась коагуляція колоїду, суміш залишали при 4 ^{o}C на 12-24 години, осад відділяли фільтрацією. Осад на фільтрі промивали водою, збирали із фільтру шпателем у чашку Петрі і залишали у тонкому шарі при кімнатній температурі впродовж 1–2 діб (паперовий фільтр зберігали).

Отриманий таким чином осад розмішували в ацетоні, так само ацетоном екстрагували залишки речовини із фільтрувального паперу. Суміш центрифугували при 3 тис. об./хв протягом 20 хв, осад промивали невеликою кількістю ацетону, ацетонові екстракти об’єднували. Після видалення ацетону із об’єднаного екстракту на роторному випаровувачі отримали 1,4 г речовини олійної консистенції (фракція А+).

Отриманий олійний залишок розмішували у 10 мл етанолу, пропускаючи суміш кілька раз через шприц, залишали на 12 годин, після чого центрифугували 20 хвилин при 3 тис. об./хв. Верхній (етанольний) шар відділяли, додавали половинний об’єм води, перемішували і залишали на 2 год. На дні пробірки відділялась жовта олія, яку збирали, розчиняли у невеликому об’ємі метанолу і піддавали подальшому фракціонуванню шляхом поступового осадження при вільному випаровуванні метанолу. При нетривалому стоянні розчину утворювався кристалічний осад, який відділяли, промивали метанолом, висушували і зберігали (фракція F1). Осади, що утворювались в процесі дальшого випаровування метанолу, збирали пофракційно. Після повного випаровування метанолу залишалась жовта олія. Таким чином отримано 4 фракції речовин: F1, F2, F3 і F4 (F4 — кінцевий олійний залишок). Вихід фракції F4 — 70 мг, вона проявляла найвищу гемолітичну активність. Склад отримуваних фракцій в процесі очистки аналізували з допомогою ТШХ в силікагелі. Молекулярну масу отриманих фракцій визначали методом мас-спектрометрії. Визначення проведено доктором Стасиком Т.В. (Біоцентр Медичного Університету Іннсбруку, Австрія), за що виражаємо йому щиру подяку.

Досліджувана нами фракція F4 представляє собою в’язку олію жовтого кольору. Мол. маса основного компонента становить 483,1 Da (рис. 1). Препарат дає позитивну реакцію Лібермана-Бурхарда на стероїди, проявляє гемолітичну дію. Для визначення гемолітичної активності аліквоту 5 мг речовини розмішували у 0,5 мл 0,1 М розчину тріс, із отриманого розчину готували серію послідовних двократних розведень, до яких додавали рівний об’єм 1% суспензії еритроцитів і інкубували 2 год за 37 ^{o}C. Реєстрували мінімальну концентрацію речовини, яка викликала повний гемоліз. Мінімальна гемолітична концентрація отриманого препарату становила 125 мкг/мл. Вуглеводів, а також фосфату у складі препарату не виявлено. Таким чином, за властивостями отримана речовина відповідає сапогенінам [17].

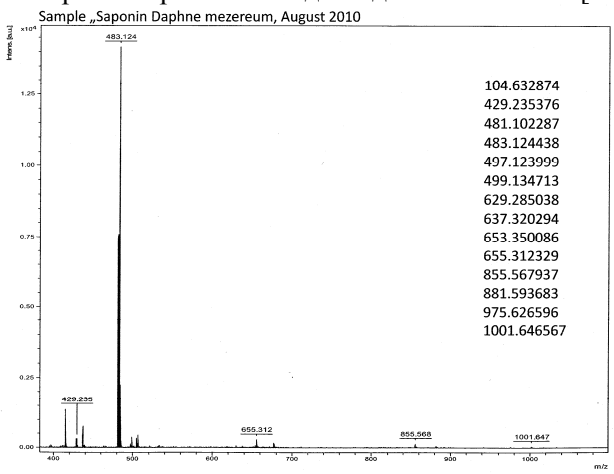


Рис. 1. Мас-спектр сапогеніну вовчника, фракція F-4.

Дослідження впливу препарату сапогеніну вовчника на лімфому NK/Ly проводили за стандартною схемою [19]: а) — раннє внутрішньочеревне введення розчину препарату для ін’єкцій, починаючи з 24

годин після інокуляції пухлинних клітин з інтервалом 48 годин, б) — раннє введення ліпосомної форми препарату за аналогічною схемою, в) — пізнє введення препарату на 6–7 день росту асциту після його видалення шляхом дренажу.

Клінічні показники впливу сапогеніну включали: 1) динаміку маси тварини впродовж експерименту, 2) середню тривалість життя після прививання пухлини, 3) об'єм асциту і кількість клітин у ньому. Цитологічні дослідження проводили за наступною схемою: розподіл клітин у популяції за розмірами з допомогою програми AxioVisionLE, Carl Zeiss; кількісна оцінка пошкодження клітин NK/Ly після забарвлення мазків асциту азур-еозином, гематоксиліном Делафільда, нейтральним червоним [20], бромфеноловим синім [21] із застосуванням комп'ютерного морфометричного аналізу.

Вуглеводні детермінанти поверхні пухлинних клітин характеризували по зв'язуванню лектинів сочевиці (LcL), арахісу (PNA), зародків пшениці (WGA) і конканаваліну А (Con A), яке визначали непрямим імунохімічним методом із застосуванням антилектинових антитіл, мічених колоїдним золотом, за методикою, описаною у роботі [22].

Результати й обговорення

Типові приклади динаміки маси тварин в процесі росту асцитної лімфоми NK/Ly в контролі і при ранньому введенні препарату сапогеніну вовчника приведені на рис. 2. Під впливом сапогеніну відмічалось початкове зниження маси миші із поверненням до вихідного рівня через 7–8 днів. Після припинення введення препарату мало місце зростання маси за рахунок утворення асциту, проте швидкість процесу була нижча, ніж у контролі.

Гальмування росту асциту проявлялось у достовірному зменшенні його об'єму, отримуваного при дренажі, і загального вмісту клітин в ньому. Кількісні показники асциту при різних схемах введення препарату сапогеніну, приведені в таблиці 1.

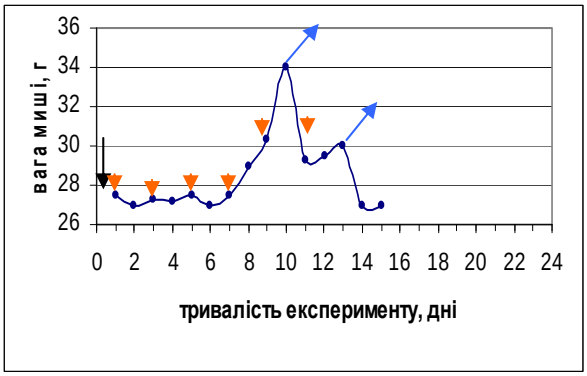
Таблиця 1

Показники асциту лімфоми NK/Ly при різних схемах внутрішньочеревного введення препарату сапогеніну вовчника (M±m).

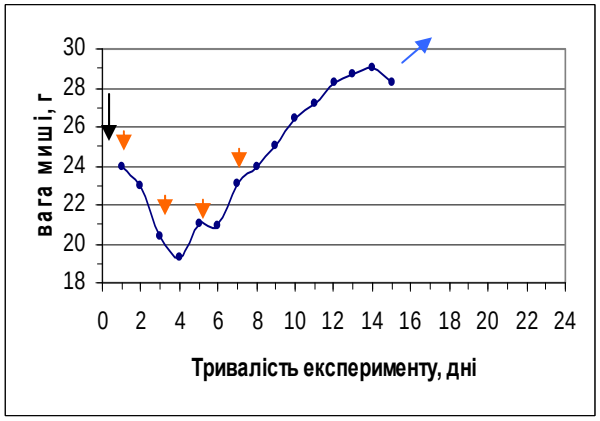
Схема введення препарату	n	Об'єм дренованого асциту (мл)	Загальний вміст пухлинних клітин (млн)
Контроль (без введення сапогеніну)	7	7,3±1,1	1011±125
Раннє введення ін'єкційної форми препарату (початок через 24 год після інокуляції)	4	6,1±0,9	410±49*
Раннє введення препарату у формі ліпосом	7	5,9±0,9	345±41*
Пізнє введення препарату (6–8 днів росту пухлини, одночасно з дренуванням асциту)	9	2,7±0,6*	254±62*

- Достовірна відмінність від контролю (P< 0,05).

к



а



б

Рис. 2. Вплив раннього введення сапогеніну вовчника на ріст асцитної форми лімфоми NK/Ly. к — контроль, а — введення розчинної форми сапогеніну у кількості 5, 3, 3, 3 мкг відповідно, б — введення ліпосомної форми сапогеніну у кількості 6 мкг через кожні 48 год.

↓ — інокуляція доочеревинно 10,5 млн пухлинних клітин, ▼ – введення препарату сапогеніну вовчника; ↗ — дренування асциту .

Токсична дія препарату проявлялась як на пухлинні клітини, так і на організм в цілому. У зв'язку з цим тривалість життя мишей-пухлиноносіїв була меншою, ніж у контролі (14–16 днів проти 23–26 у контролі). У термінальній стадії спостерігалась діаррея, асцитна рідина загиблих тварин була жовтушна. На розтині виявлено геморагії в стінці кишківника, достовірне зменшення маси печінки (на 38 % у порівнянні з інтактними мишами). Описані зміни можна вважати наслідком токсичної дії препарату з ураженням переважно травної системи (кишківник, печінка).

Зважаючи на виражену токсичну дію сапогеніну вовчника, були зроблені спроби застосувати його у формі ліпосом в режимі раннього введення. Динаміка змін ваги тварин в контролі і в процесі лікування приведені на рис. 2 б. Під впливом відносно низьких доз препарату (6 мкг/мишу, що відповідає 0,3 мг/кг) спостерігалось пригнічення проліферації пухлинних клітин і зменшення їх загальної кількості в асциті (табл. 1). Токсичність ліпосомної форми, однак, не була меншою, ніж розчинної форми, що теж зумовлювало скорочення тривалості життя тварин у порівнянні з контролем. Слід відмітити різну чутливість тварин до препарату сапогеніну. В окремих мишей спостерігалась резистентність до дії сапогеніну, постійне наростання асциту, незважаючи на введення препарату.

Приклад динаміки маси тварин при пізньому введенні препарату сапогеніну, починаючи із 7–8 дня після інокуляції пухлини одночасно із дренуванням асциту, приведено на рисунку 3.

Рис. 3. Вплив пізнього введення препарату сапогеніну вовчника на ріст лімфоми NK/Ly. Позначення: ↓ — інокуляція пухлинних клітин, ▼ — доочеревинне введення сапогеніну, 0,6 мг/кг, ↗ — дренаж асциту

Застосовані відносно високі дози сапогеніну (1–0,5 мг/кг) пригнічували ріст асциту, особливо після другого введення (рис. 3). Ефект, однак, виявився нетривалим, через 2–3 дні мав місце рецидив росту асциту, хоча об'єм асцитної рідини і кількість пухлинних клітин були суттєво меншими, ніж у контролі

(табл. 1). У деяких тварин спостерігалось продовження життя у порівнянні з контролем (максимально 39 діб, рис. 3). У цілому в експериментальній групі тварин (n=17) середня тривалість життя становила 19,8±1,6 діб (у контролі 24±3 доби). Припускаємо, що це зумовлено побічною токсичною дією препарату, особливо при повторних введеннях.

Стосовно впливу препарату сапогеніну вовчника на морфологічні характеристики пухлинних клітин відмічено збільшення розмірів клітин, яке виражалось зсувом кривих розподілу клітин за розмірами в сторону більших діаметрів (вправо). Крім цього, відмічено достовірне збільшення порівняно з контролем середнього значення діаметру клітин і особливо чітко виражене зростання частки клітин діаметром більше 17 мкм (макроцитів) до 13,9 % (рис.4). Даний ефект, однак, не був тривалим, при повторному заборі асциту через 3 доби кількість макроцитів зменшилась до 8,7 %.

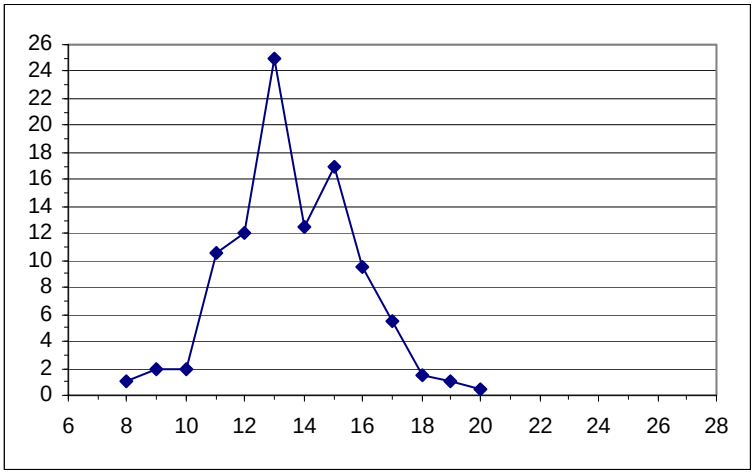
При цитоморфологічному аналізі мазків асциту при застосованих методах забарвлення виявлено достовірне збільшення відсотка пошкоджених пухлинних клітин під впливом сапогеніну (табл. 2).

Таблиця 2

Кількісна оцінка пошкоджуючої дії сапогеніну вовчника на клітини лімфоми NK/Ly за даними цитоморфологічного аналізу

Умови забору асциту	Відсоток пошкоджених клітин у популяції за даними забарвлення: (M±m)			
	n	азур-еозином	бромфеноловим синім на білок	гематоксиліном Делафільда
Контроль, 7-а доба	4	26,8±3,9	18,5±3,0	13,4±0,9
Через 24 години після введення сапогеніну	4	70,6±1,8*	54,4±2,2*	53,2±8,4*

* — різниця достовірна відносно контролю (P < 0,01)



А

Б

Рис. 4. Розподіл клітин NK/Ly за розміром при введенні ліпосомної форми препарату сапогеніну вовчника (24 години після інокуляції асцитних клітин, доза 300 мкг/кг, 6 ін'єкцій через кожні 48 годин). А — контроль, 10 доба після інокуляції пухлинних клітин. Діаметр клітин M±m = 13,7±0,2 мкм, клітин,

діаметром більше 17 мкм — 3,0 %. Б — асцит на 13 день росту пухлини після 6 кратного введення препарату. Діаметр клітин M±m = 14,5±0,2 мкм, клітин, діаметром більше 17 мкм — 13,9 %.

Найвищий відсоток пошкодження відмічено при забарвленні азур-еозином, яке відображає загальну морфологію клітини. Пошкодження клітин сапогеніном призводило до порушення проникності мембрани і втрати білка, що проявлялось зменшенням інтенсивності забарвлення клітин бромфеноловим синім (рис. 5 Б). Під впливом сапогеніну спостерігались виражені зміни структури ядра і хроматину: фрагментація ядер з утворенням багатоядерних клітин, лізис ядра і хроматину, виражена гетерогенність ядер за розмірами (рис. 5 Г).

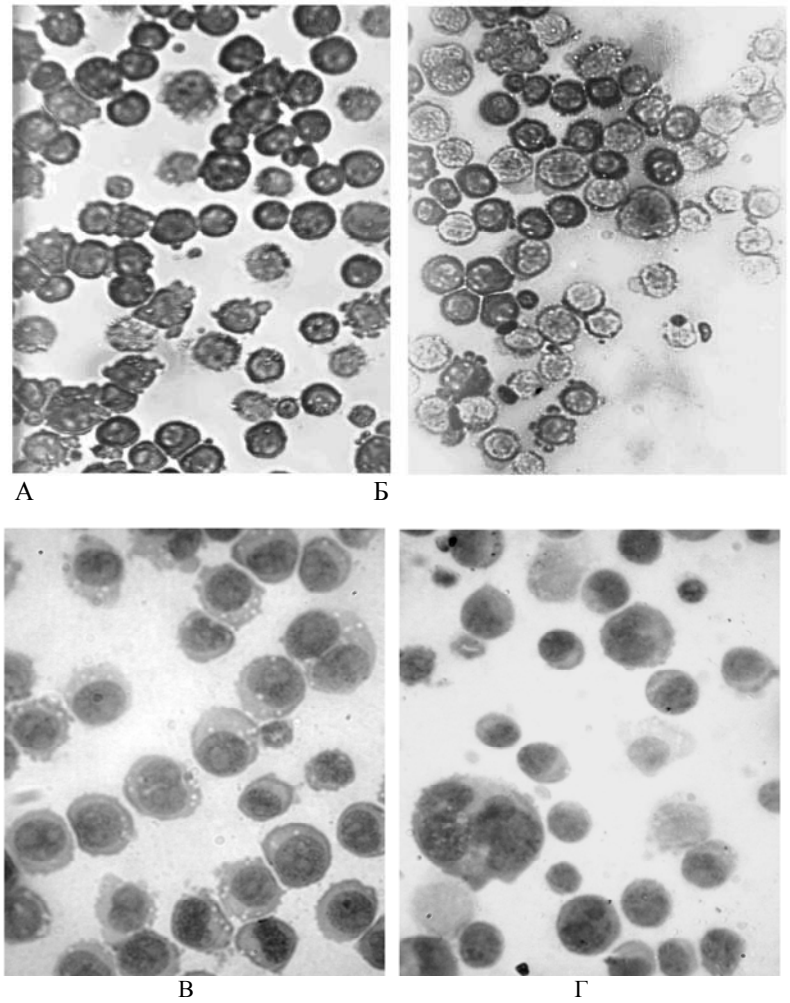


Рис. 5. Вплив сапогеніну вовчника на вміст білка і структуру ядер клітин лімфоми NK/Ly.
А, В — контроль, Б, Г — внутрішньочеревне трикратне введення препарату сапогеніну. Забарвлення бромфеноловим синім (А, Б), збільш. 20х15, забарвлення гематоксиліном Делафільда (В, Г) збільш. 40х15).

Результати визначень зв'язування лектинів з інтактними клітинами NK/Ly за введення сапогеніну вовчника приведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив сапогеніну вовчника на взаємодію клітин лімфоми NK/Ly з лектинами

№ п/п	Відсоток лектин-позитивних клітин у популяції	n	Контроль	n	Раннє введення сапогеніну вовчника
1	Конканавалін А	3	67,0±6,1	4	68,5±4,8
2	Лектин сочевиці	3	13,6±1,1	4	18,7±3,0
3	Лектин арахісу	3	29,8±2,8	4	32,1±2,5
4	Аглютинін зародків пшениці	3	81,8±3,6	4	78,5±3,9

Відмічено високе споріднення клітин NK/Ly до аглютиніну зародків пшениці, що може бути обумовлено високим ступенем сіалювання поверхневих глікокон'югатів. Конкалавалін А також зв'язувався

із значною кількістю клітин, що свідчить про інтенсивне експонування комплексних двохантенних N-гліканів на клітинній поверхні. Звертає на себе увагу різниця у зв'язуванні конкалаваліну А і лектину сочевиці, які за вуглеводною специфічністю є близькими, однак зв'язування лектину сочевиці було значно менше. Це може бути зумовлене вищою селективністю лектину сочевиці до складніших фрагментів N-гліканів, ніж у конканаваліну А. Статистично достовірних відмінностей у зв'язуванні досліджуваних лектинів клітинами NK/Ly при введенні сапогеніну вовчника не виявлено, відмічено лише тенденцію до збільшення зв'язування лектину сочевиці (P=0,1).

Висновки

1. Розроблено метод очистки речовини із олії насіння вовчника (*Daphne mesereum* L.), яка за властивостями відповідає сапогеніну. Речовина володіє високою гемолітичною активністю і токсичністю при парентаральному введенні (LD_{100} для мишей становить 6 мг/кг).
2. При дослідженні впливу внутрішньочеревного введення речовини на ріст лімфоми NK/Ly і цитоморфологію клітин виявлено пригнічення проліферації пухлинних клітин, збільшення їх розмірів і токсичне пошкодження за даними кількісної оцінки мазків асциту, забарвлених застосованими методами. Статистично достовірних змін вуглеводних детермінант поверхні пухлинних клітин під впливом препарату сапогеніну не виявлено.
3. Терапевтичний ефект при парентеральному введенні препарату сапогеніну в умовах in vivo не спостерігався, що зумовлено його побічною токсичною дією з переважним ураженням органів шлунково-кишкового тракту.

Перспективи подальших досліджень. У зв'язку з тим, що препарат сапогеніну вовчника при парентеральному введенні проявляв цитотоксичну дію щодо клітин лімфоми NK/Ly, однак терапевтичний ефект клінічно не спостерігався внаслідок високої токсичності речовини, доцільно провести дослідження місцевого застосування препарату при поверхневих формах пухлин.

M. M. Lutsyk,[1] A. M. Yashchenko,[1] I. V. Kychun,[2] M. D. Lootsik,[3] R. S. Stoika[3]

PURIFICATION OF SAPOGENIN FROM OIL OF SPURGE OLIVE (*Daphne mezereum* L.) SEEDS AND INVESTIGATION OF ITS ANTITUMOR ACTIVITY TOWARD EXPERIMENTAL LYMPHOMA NK/Ly

S u m m a r y

A method of purification of sapogenin from seeds oil of Spurge olive (*Daphne mezereum* L.) is described. Four fractions were obtained, the last F4 with the highest yield. This substance is a viscous oil, soluble in ethanol, acetic acid, propylene glycole, it gives positive Lieberman-Burchardt reaction for steroids, exhibits hemolytic activity, carbohydrates and phosphate were not detected. One principal peak was revealed by mass-spectrometry with mol.weight 483,1 Da. The substance is highly toxic, LD_{100} is 6 mg/kg for mice by intraperitoneal injection. Intraperitoneal application of subtoxic doses of sapogenin to mice with transplanted lymphoma NK/Ly exhibited suppression of tumor cells proliferation and alteration of cell morphology, characteristic to a cytotoxic effect, as revealed by used staining methods. Never the less therapeutic effect in *in vivo* experiments was not observed due to the toxic side effect of substance with predominant alteration of organs of gastro-intestinal tract.

Луцик М.М.,[1] Ященко А.М.,[1] Кичун І.В.,[2] Луцик М.Д.[3], Стойка Р.С.[3]

ОЧИСТКА САПОГЕНИНА ИЗ МАСЛА СЕМЯН ВОЛЧНИКА (*Daphne mezereum* L.) И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛИМФОМЕ NK/Ly

А н н о т а ц и я

Описан метод очистки сапогенина из масла семян волчника (Daphne mezereum L.). Получено четыре фракции, с наибольшим выходом фракции F4. Вещество представляет собой вязкое масло, растворимое в этаноле, уксусной кислоте, пропиленгликоле, дает положительную реакцию Либермана-Бурхарда на стероиды, обладает гемолитической активностью. Углеводов и фосфора в составе препарата не выявлено. В мас-спектре выявляется один основной пик, молекулярная масса которого 483,1 Da. Вещество высоко токсично, LD_{100} при внутрибрюшном введении мышам составляет 6 мг/кг. При внутрибрюшинном введении субтоксических доз препарата сапогенина мышам с привитой лимфомой NK/Ly выявлено цитотоксическое действие на опухолевые клетки и угнетение их пролиферации. Терапевтическй эффект сапогенина в эксперименте *in vivo* не наблюдался, что обусловлено токсическим побочным действием вещества с преимущественным поражением органов желудочно-кишечного тракта.

1. *Комендар В. І.* Лікарські рослини Карпат / В. І. Комендар. — Ужгород : Карпати, 1971. — С. 47.

2. Волчник обыкновенный (Daphne mezereum L.). В кн.: Растительные ресурсы СССР. Цветковые растерия, их химический состав, использование / Отв. ред. П. Д. Соколов. — Л. : «Наука», 1986. — С. 222–223.
3. *Мазнев Н. И.* Лечение ядовитими растениями: чистотел, морозник и другие природные целители семи / Н. И. Мазнев. — М. : ИКТЦ ЛАДА, ООО ИД «Рипол классик», 2005. — С. 61–63.
4. *Балицкий К. П.* Лекарственные растения и рак / К. П. Балицкий, А. Л. Воронцова. — Киев : Наукова думка, 1982. — 376 С.
5. *Zhang J.* Quality of processed samples of Daphne genkwa Sieb. et Zucc. [Aticle in Chinese, abstr. Engl.] / J. Zhang, Y. Wang, C. Sun // Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih. — 1997. —V. 22, N 2. — P.85–7, 127.
6. *Кошелева Л. И.* Фитохимическое изучение волчника обыкновенного (Daphne mezereum L.) / Л. И. Кошелева, Г. К. Никонов/ — Фармация, 1968. — Т. 17, № 6. — С. 40–47.
7. *Kupchan S. M.* Mezerein: antileukemic principle isolated from Daphne mezereum L. / S. M. Kupchan, R. L. Baxter. — Science, 1975. — V.187, N 4177. — P. 652–653.
8. *Bang S.-Ch*. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship / S.-Ch. Bang, J.-H. Lee, G.-Y. Song et all // Chem. Pharm. Bull. — 2005. — V. 53, N 11. — P. 1451–1454.
9. *Bruneton J.* Saponins / J. Bruneton // In: Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal plants. 2nd Ed. — Paris, 1999. — P. 672–717.
10. *Kerwin S. M.* Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods / S. M. Kerwin // Current Medicinal Chemistry. — Anti-Cancer Agents, 2004. — V. 4, N 3. — P. 263–272.
11. *Li M.* Echinoside A, a new marine-derived abticancer saponin, targets topoisomerase 2α by unique interference with its DNA binding and catalytic cycle / M. Li, Z.-H. Miao, Z. Chen et all // Annals of Oncology. — 2010. — V. 21, N 3. — P. 597–607.
12. *Liu M. J.* Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K 562 cells with the disruption of Ca2+ homeostasis / M. J. Liu, Z. Wang, R. N. Wong, Q. Y. Wu // Cancer Chemother. Pharmacol. — 2005. — V. 55, N 1. — P. 79–90.
13. *Raju J.* Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin / J. Raju, R. Mehta // Nutr. Cancer. — 2009. — V. 61, N 1. — P. 27–35.
14. *Shoji Shibata.* Chemistry and cancer preventing activities of Ginseng saponins and some related triterpenoid compounds / Shibata Shoji // J. Korean Med. Sci. — 2001. — 16(Suppl.). —P. S28–S37.
15. *Yan L. L.* In vitro and in vivo anticancer activity of steroid saponins of *Paris polyphylla var.Yunnanensis /* L. L. Yan, Y. I. Zhang, W. Y. Gao et all // Exp. Oncol. — 2009. — V. 31, N 1. — P. 27–32.
16. Dammarane sapogenins. Novel nontoxic anti-cancer agents, 2007. http://j. b5z.net/i/u/2100778/i/Bi Eng May. 2007. pdf.
17. *Гринкевич Н. И.* Химический анализ лекарственных растений. / Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич/ — М. : Высшая школа, 1983. — С. 41–56.
18. *Nemeth L.* A new mouse ascites tumour to be used as screening tool / L. Nemeth, B. Kellner // Neoplasma. — 1961. — V. 8, N 4. — P. 337–343.
19. *Софьина З. П.* Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / З. П. Софьина, А. Б. Сыркин, А. Гольдин, А. Кляйн. — М. : Медицина. 1980. — 295 с.
20. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лили. — М. : Мир, 1969. — С. 154−169.
21. *Луцик М. М.* Кількісний метод оцінки пошкодження пухлинних клітин при дії протипухлинних препаратів in vivo фарбуванням цитологічних препаратів на білок / М. М. Луцик, А. М.,Ященко // Вісник морфології. — 2009. — Т. 15, № 1. — С. 188–192.
22. *Луцик М. М.* Характеристика вуглеводних детермінант поверхні клітин мишиної лімфоми NK/Ly по зв'язуванню нативних лектинів із наступним їх виявленням непрямим імуноцитохімічним методом / М. М. Луцик, В. І. Ковалишин, А. М. Ященко // Біологія тварин. —2010. — Т. 12, № 1. — С. 94–99.

Рецензент: завідувач лабораторії обміну речовин, кандидат біологічних наук Салига Ю. Т.