

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТНОЙ И
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭТАНОЛЬНОГО И
ЭТИЛАЦЕТАТНОГО ЭКСТРАКТОВ *SELAGINELLA TAMARISCINA***

**Н.А. Оreshko, Н.И. Павлюченко, П.А. Киселев, Le Minh Ha*, Pham Quoc Long*,
Т.С. Хлебникова, Ф.А. Лахвич**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: oreshko_nat@mail.ru*

**Институт химии природных соединений, Вьетнамская академия наук и технологий,
Ханой, Вьетнам*

Введение

В последние годы одним из ключевых направлений развития фармацевтической отрасли и здравоохранения в целом становится персонализированная медицина. Ее задача состоит в том, чтобы адаптировать методы лечения к особенностям конкретных пациентов. Это значительно повышает эффективность терапии и снижает побочные эффекты от лечения, а также сокращает расходы на здравоохранение. Очевидно, что, наряду с терапией, основополагающим принципом персонализированной медицины является профилактика заболеваний. В этом плане все большее внимание привлекают настои и экстракты лекарственных растений, поскольку они служат не только источником сырья для получения фармакологически эффективных индивидуальных веществ, но и имеют серьезное самостоятельное значение. Последнее обусловлено их часто хорошо выраженными положительными фармакологическими свойствами, возможностью длительного приема без возникновения побочного действия, наконец, экономической доступностью для широких слоев населения [1-3]. Одним из существенных факторов, сдерживающих использование таких комплексных препаратов, является сложность их стандартизации и выявления необходимого профиля активности даже путем установления основных действующих компонентов. Одним из примеров такой ситуации являются экстракты растений семейства *Selaginellaceae*. Семейство *Selaginellaceae* насчитывает около 750 видов высших споровых растений, что обеспечивает их произрастание в различных климатических зонах. Более того, представители этого семейства могут быть легко интродуцированы, в т.ч. в условиях Беларуси. Получаемые на их базе продукты обладают выраженным фармакологическим действием и находят широкое применение в восточной медицине, что обусловлено наличием в их составе ряда физиологически активных веществ, в частности, флавоноидов, фенилпропаноидов, антрахинонов, стероидов, алкалоидов и органических кислот [4-8]. Одним из наиболее изученных видов этого семейства считается *Selaginella tamariscina* [3]. Для препаратов на базе этого вида, в частности, показана антиканцерогенная, противовоспалительная, противовирусная и анальгетическая активности [3]. Они способствуют снижению кровяного давления и сахара в крови, обладают иммуностимулирующим действием [3-8]. Обнаруженные эффекты в основном относят на счет бифлавоноида-аментофлавона [3, 9-14]. В свою очередь, терапевтическую эффективность флавоноидов связывают с их антирадикальными и антиоксидантными свойствами [15]. Вместе с тем, в соответствии с последними сведениями, аментофлавоны не обладают выраженными антирадикальными либо антиоксидантными свойствами [9]. Все это подтверждает многоплановый характер воздействия на организм экстрактов и указывает на необходимость их дальнейшего изучения. Целью настоящей работы стало получение этанольного и этилацетатного экстрактов и сравнительная характеристика их антирадикальных свойств и антипролиферативного действия в отношении клеточной линии аденокарциномы молочной железы – MCF 7.

Методы исследования

Реактивы. В работе использовали этиловый эфир уксусной кислоты, этиловый спирт, ДМСО, хлорид алюминия, персульфат аммония производства «Белреахим», диаммониевую соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS) производства «Sigma», 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновую кислоту (Тролокс) фирмы «Calbiochem», 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (MTT) производства «Sigma».

В работе использовали цельные растения *Selaginella tamariscina*, собранные в Национальном ботаническом саду, Тамдао, Вьетнам, и идентифицированные биологом NgoVanTrai, Национальный институт медицинских материалов. Образец растения находится в гербарии Института химии природных продуктов. Сушку растительного сырья проводили воздушно-теневым способом в хорошо вентилируемых помещениях без доступа прямых солнечных лучей. Растительный материал раскладывали тонким слоем и регулярно переворачивали. Сушка считалась законченной при содержании в сырье 10–15% свободной (гигроскопической) влаги.

Сухой материал (10 г) измельчали и экстрагировали 100 мл водно-спиртового раствора (вода: этиловый спирт 1:1 по объёму) либо этилацетата в течение 5 суток при 60°C. Экстракцию повторяли 3 раза, после чего проводили фильтрацию. Полученный экстракт (300 мл) выпаривали до 1 мл и высушивали в вакууме при 40°C. Для проведения исследований навеску (20 мг) сухого остатка растворяли в ДМСО.

Синтез катион-радикала ABTS. Катион-радикал 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) ($ABTS^{\bullet+}$) получали путем окисления ABTS персульфатом аммония в водной среде [16]. Для получения рабочего раствора исходный $ABTS^{\bullet+}$ разводили этиловым спиртом либо 50 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7,4 до получения оптической плотности $0,65 \pm 0,02$ при $\lambda = 760$ нм (для этанола), $\lambda = 735$ нм (для КФБ) в кювете с длиной оптического пути в 1 см.

Определение антиоксидантной активности экстрактов. Для определения антиоксидантной активности использован деколоризационный метод, основанный на восстановлении метастабильного катион-радикала диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты), что приводит к пропорциональному уменьшению характерного для него пика [17]. Для определения антиоксидантной активности к 5,94 мл рабочего раствора $ABTS^{\bullet+}$ добавляли 60 мкл экстракта в соответствующем разведении. Инкубирование проводилось при постоянном перемешивании при температуре 30°C. Оптическая плотность раствора измерялась через 1, 3, 5 мин и далее с периодом 5 мин в течение 60 мин.

Определение содержания полифенолов в экстрактах *Selaginella tamariscina* [18]. К 0,1 мл экстракта в соответствующем разведении вносили 0,9 мл бидистиллированной воды, после перемешивания добавляли 0,1 мл реактива Folin-Ciocalteu. Через 5 мин вносили 1 мл 7% карбоната натрия и доводили объем пробы бидистиллированной водой до 2,5 мл, тщательно перемешивали. После инкубации при температуре 23°C в течение 90 мин регистрировали оптическую плотность при длине волны 750 нм. Как стандарт для построения калибровочной кривой использовали галловую кислоту. Содержание фенолов выражали в массе галловой кислоты (г) на массу (г) сухого остатка.

Определение содержания флавоноидов в экстрактах *Selaginella tamariscina*. Для количественного определения содержания флавоноидов использована реакция комплексообразования с хлоридом алюминия [19]. К 4,16 мл 60% этанола вносили 0,8 мл 5% раствора хлорида алюминия и 40 мкл экстракта в соответствующем разведении. В кювету сравнения вносили 4,96 мл 60% этанола и 40 мкл экстракта. Обе пробы инкубировали в течение 60 мин. При регистрации спектра поглощения продуктов реакции флавоноидов с раствором хлорида алюминия максимум светопоглощения наблюдался при 393 ± 2 нм. Содержание флавоноидов выражали в массе аментофлавона (г) на массу (г) сухого остатка.

Определение антипролиферативной активности экстрактов [20]. Оценка антипролиферативной активности проводилась методом МТТ на клеточной линии MCF 7 (аденокарцинома молочной железы). Для МТТ-теста в каждую лунку 96-луночного планшета вносили 10^4 клеток и инкубировали 24 ч при 37°C в темноте во влажной атмосфере с 5% CO_2 для адгезии клеток на дне лунки. Далее вносились экстракты в разведениях для достижения семи конечных концентраций от 0,2 мкг/мл до 65 мкг/мл, при этом максимальное содержание ДМСО составляло 0,3%. После 48-ч инкубации при 37°C в темноте во влажной атмосфере с 5% CO_2 в каждую лунку платы с клеточной культурой вносили 20 мкл раствора МТТ (5 г/л) и инкубировали на протяжении 4 ч при 37°C в темноте во влажной атмосфере с 5% CO_2 . По окончании инкубации супернатант осторожно удаляли, а в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО. Осадок ресуспендировали и 15 мин инкубировали в темноте при комнатной температуре. Показания оптической плотности считывали при длине волны 570 нм на планшетном ридере АИФ М/340 производства РУП «Витязь».

Статистическая обработка данных. Анализ полученных данных проводили с помощью пакета программ MicrosoftOfficeExcel.

Результаты и обсуждение

Определение антиоксидантной активности. Существует большой набор методов оценки общей антиоксидантной активности (АОА), различающихся по типу источника окисления, окисляемого соединения и способам детекции образующихся либо расходуемых соединений. Среди них особо перспективным представляется подход, основанный на применении катион – радикала диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) [16]. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ обладает характерным спектром поглощения и высокой оптической плотностью при длинах волн 660–820 нм, что делает возможным его применение для характеристики сложных систем, содержащих окрашенные компоненты. Наиболее известны два варианта проведения измерений с применением катион – радикала $\text{ABTS}^{\bullet+}$ – кинетический и деколоризационный. В настоящей работе использован деколоризационный метод. Он основан на предварительном синтезе метастабильного катион – радикала с последующим измерением степени влияния добавляемого антиоксиданта на процесс расходования $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (восстановления исследуемым образцом до исходной бесцветной диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) [16, 17, 21]. В отличие от кинетического варианта, для реализации которого несколькими фирмами выпускаются коммерческие наборы реагентов, в нашем случае антиоксидант не присутствует при образовании радикала, т.е. можно с большей уверенностью говорить о прямом взаимодействии антиоксиданта с катион-радикалом. На первом этапе нами определено оптимальное время, необходимое для надежной характеристики АОА. Для этого получена зависимость степени восстановления $\text{ABTS}^{\bullet+}$ от времени в отсутствие и в присутствии этанольного экстракта *S. tamariscina* (рисунок 1). Как видно из рисунка 1 (кривая а), на кинетической зависимости можно выделить три основных временных интервала – 0÷1, 1÷10 и свыше 10 минут.

Такой вид графика, скорее всего, отражает присутствие в экстракте определенного количества высокоактивных антиоксидантов, которые расходуются в быстрой стадии реакции в течение первой минуты, что хорошо согласуется с данными по кинетике восстановления $\text{ABTS}^{\bullet+}$ тролоксом. Более медленные изменения в течение следующих 2–10 мин, возможно, обусловлены наличием менее активных компонентов в исходной пробе и/или реакцией $\text{ABTS}^{\bullet+}$ с первичными продуктами окисления антиоксидантов, образовавшимися на предыдущей стадии [21, 22]. В случае третьей фазы процесса наиболее вероятно, что речь идет о диспропорционировании самого катион-радикала [23]. Для проверки последнего предположения были проведены эксперименты в отсутствие каких-либо добавок, учет результатов которых действительно свидетельствует о возможности аппроксимации кинетической кривой только двумя прямыми.

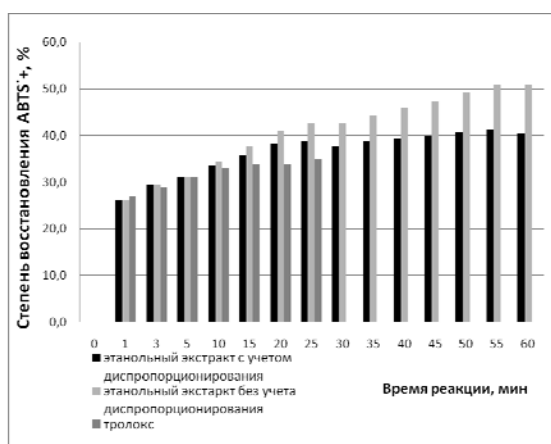


Рисунок 1 – Кинетика взаимодействия антиоксидантов с катион-радикалом ABTS этанольный экстракт *S. tamariscina* (конечная концентрация– 5 мкг/л), тролокс (конечная концентрация– 2,5 мМ), этанольный экстракт *S. tamariscina* (конечная концентрация– 5 мкг/л) с учетом диспропорционирования катион-радикала ABTS

Качественно близкий вид кинетической кривой был зафиксирован и в случае этилацетатного экстракта *S. tamariscina*.

С учетом полученных кинетических данных в последующих опытах по характеристике АОА этанольного и этилацетатного экстрактов *S. tamariscina* время реакции составляло 1 минуту.

Объективным критерием АОА индивидуальных соединений и их смесей считается параметр IC50, т.е. концентрация антиоксиданта, которая вызывает восстановление 50% катион-радикала ABTS.

Полученные из уравнений линейной регрессии значения IC50, отражающие в условиях наших экспериментов суммарное содержание высокоактивных компонентов, составили 12,4 мкг/мл для этанольного и 7,3 мкг/мл для этилацетатного экстрактов. Надо сказать, что к сегодняшнему дню накоплен огромный массив данных, относящихся к антиоксидантной активности лекарственных растений, которые используются в народной медицине. Однако их межлабораторный количественный анализ во многом невозможен, поскольку данные получены разными методами, в отличающихся условиях, а самое главное, выражены в различных единицах измерения, пересчет которых затруднен из-за отсутствия в публикациях сведений, позволяющих количественно характеризовать процедуру получения образцов. Поэтому, не вдаваясь в детали, отметим лишь, что исследованные нами экстракты *S. tamariscina* характеризуются терапевтически значимой антиоксидантной активностью, поскольку в соответствии величинами IC50 такие концентрации действующих веществ легко достижимы в организме при употреблении препарата в разумных дозах [24].

В последние годы все более значительное внимание уделяется разработке подходов, позволяющих проводить достоверный количественный межлабораторный анализ АОА лекарственных растений. Одним из них является использование общего для всех калибратора– тролокса, относящегося к водорастворимым производным витамина Е. Получаемый на этой базе показатель получил название ТЕАС (Trolox equivalent antioxidant capacity) и равен концентрации тролокса, которая по своему антиоксидантному эффекту эквивалентна таковому исследуемому образцу.

В наших условиях ТЕАС составил 0,71 и 1,17 ммоль/г для этанольного и 1,21 ммоль/г и 3,7 ммоль/г для этилацетатного экстракта при проведении реакции в этаноле и КФБ, соответственно. Полученные величины находятся в диапазоне средних значений АОА, зарегистрированных для 40 видов лекарственных растений, перспективных для профилактики и лечения кардио- и cerebrovasкулярных патологий [2]. Отметим, что использование деколоризационного метода определения АОА позволяет проводить

исследования как водной, так и органической среде, что снимает проблему растворимости и дает возможность определения АОА для гидрофильных и мембранотропных соединений. Обращает на себя внимание, что полученные нами значения ТЕАС для обоих экстрактов несколько ниже при проведении реакции в этаноле, чем в случае КФБ. Согласно литературным данным это занижение связывают с присутствием в экстрактах органических кислот [25].

Для ряда препаратов на базе лекарственных растений убедительно доказано наличие положительных корреляций между антиоксидантной активностью и содержанием полифенольных соединений в целом, либо их отдельной флавоноидной фракции [26].

Содержание полифенольных соединений в исследуемых нами растительных образцах было определено методом Folin-Ciocalteu и выражено в граммах галловой кислоты на грамм сухой навески экстракта. Оно составило $0,33 \pm 0,05$ г/г в этанольном и $0,62 \pm 0,11$ г/г в этилацетатном экстрактах, то есть соединения фенольной природы составляют значительную либо даже основную часть сухой навески образцов. С использованием в качестве шифт-реагента хлорида алюминия, а в качестве калибратора – аментофлавона найдено, что в пересчете на аментофлавон содержание флавоноидной фракции составляет в этанольном и этилацетатном экстрактах – $0,31 \pm 0,02$ г/г и $0,75 \pm 0,04$ г/г, соответственно. Это означает, что полифенольная фракция обоих препаратов практически полностью представлена соединениями флавоноидной природы.

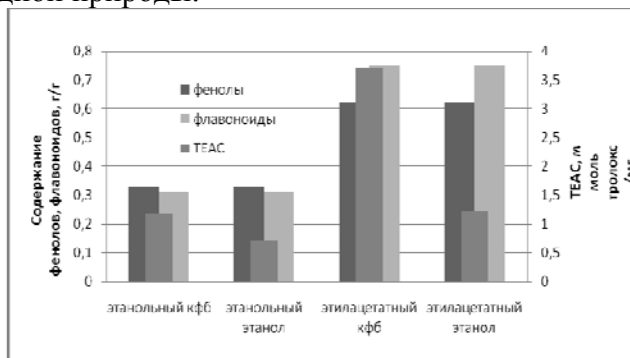


Рисунок 2 – Содержание фенолов, флавоноидов, а также ТЕАС этанольного и этилацетатного экстрактов *S. tamariscina* при проведении реакции в этанольной или в водной среде. Содержание фенолов выражено в г галловой кислоты на г сухой навески экстракта, флавоноидов – в г аментофлавона на г сухой навески экстракта, ТЕАС – в ммоль тролокса на мг сухой навески экстракта

Сопоставление данных по содержанию полифенолов с величинами ТЕАС несомненно указывает на наличие положительной корреляции между этими параметрами: чем больше содержание фенольной фракции в образце, тем больше его антиоксидантная активность (рисунок 2). Вместе с тем, на эту взаимосвязь существенное влияние оказывает среда, в которой протекает реакция восстановления катион-радикала. Так, при реакции в органической среде (этаноле) двукратное превышение содержания полифенолов в этилацетатном экстракте по сравнению с этанольным приводит лишь полуторакратному увеличению ТЕАС. В тоже время в водной среде эти параметры отличаются более чем в три раза. Логично полагать, что это может быть связано с присутствием в этилацетатном экстракте некоторого количества соединений не фенольной природы, обладающих выраженной антиоксидантной активностью в водной среде.

Определение антипролиферативной активности. Следующим этапом работы стала оценка влияния полученных нами экстрактов *Selaginella tamariscina* на пролиферацию раковых клеток. Для этого использовали МТТ-тест на клеточной линии MCF 7 (гормончувствительная аденокарцинома молочной железы). Клеточная линия MCF 7 является одной из стандартных моделей для первичного тестирования потенциальных противоопухолевых препаратов *in vitro*.

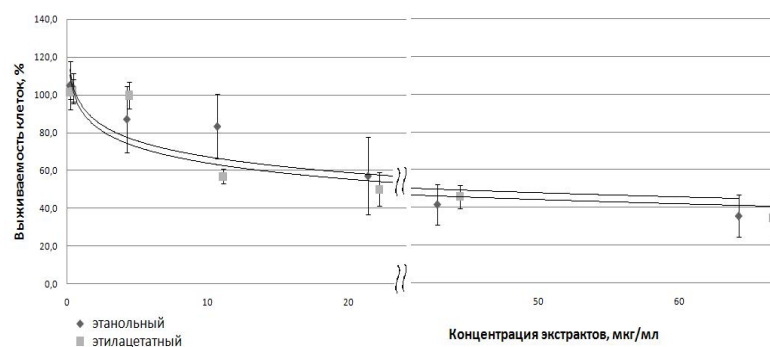


Рисунок 3 – Ингибирующее действие различных концентраций этанольного и этилацетатного экстрактов *Selaginella tamariscina* на рост клеточной линии аденокарциномы молочной железы MCF7

Из рисунка 3 видно, что начиная с концентрации в 5–10 мкг/мл оба экстракта оказывают достоверное антипролиферативное действие на клетки MCF 7. А сами зависимости степени выживаемости клеток от концентрации экстрактов хорошо аппроксимируются логарифмическими кривыми, о чем свидетельствуют высокие коэффициенты детерминации (R^2). Так, для этанольного экстракта эта зависимость описывается уравнением

$y = -12,1 \times \ln(x) + 94,9$ с коэффициентом детерминации, равным 0,88, где y – выживаемость клеток (в %), x – концентрация экстракта (в мкг/мл).

В случае этилацетатного образца $R^2 = 0,84$, а уравнение имеет вид:

$$y = -12,3 \times \ln(x) + 92,2.$$

Рассчитанные по приведенным выше уравнениям показатели EC50, отражающие концентрацию, приводящую к 50%-му уменьшению количества клеток, составили $40,9 \pm 13,9$ мкг/мл для этанольного и $30,9 \pm 6,5$ мкг/мл в случае этилацетатного экстрактов, что указывает на более высокую антипролиферативную активность последнего и коррелирует с антиоксидантной активностью образцов. Отметим, что из 44 экстрактов 16 растений, традиционно используемых в народной медицине как противоопухолевое средство, только два показывают большую антипролиферативную активность в отношении MCF 7, чем экстракты *S. tamariscina* [27].

Выводы

В целом, полученные данные позволяют предположить, что экстракты *S. tamariscina* содержат компоненты с высокой антиоксидантной и антипролиферативной активностью и могут быть использованы для получения на их основе лекарственных средств. Действительно, согласно рекомендации Национального института рака критерием терапевтической перспективности полных экстрактов лекарственных растений являются величины EC50, равные либо меньшие, чем 30 мкг/мл [24]. В соответствии с нашими данными антирадикальная и антипролиферативная активность хорошо коррелирует с общим содержанием полифенолов в этанольном и этилацетатном экстрактах *S. tamariscina*. Однако, достоверная разница в эффективности исследованных экстрактов, а также более выраженная зависимость антирадикальной активности этилацетатного образца от свойств реакционной среды позволяют полагать, что действие основных компонентов может быть потенцировано одним или несколькими минорными составляющими. В пользу подобного утверждения свидетельствуют данные недавно опубликованных работ, согласно которым индивидуальный аментофлавоны, вопреки ожиданиям, не обладает существенным антирадикальным или антипролиферативным действием [11, 28, 29]. Поэтому неудивительно, что экстракты *S. tamariscina* фармакопеей Китая 2010 г. рекомендованы лишь в качестве средства для улучшения циркуляции крови [30].

Работа выполнялась в рамках БРФФИ по совместному проекту Института биоорганической химии НАН Беларуси и Института химии природных соединений Академии наук и технологий Вьетнама.

Авторы считают своим долгом поблагодарить академика Владимира Николаевича Решетникова за плодотворные дискуссии и искренне рады поздравить его с Юбилеем.

Список литературы

- 1.Liu, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals / R.H. Liu // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 2003. – № 78 – P. 517–520.
- 2.Antioxidant activity and total phenolic content of medicinal plants associated with prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases / R.Y. Gan [et al.] // *J. Med. Plants Res.* – 2010. – Vol. 4. – P. 2438–2444.
- 3.Setyawan, A.D. Review: Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae) / A.D. Setyawan // *Bioscience.* – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 44–58.
- 4.Inhibitory effects of *Selaginella tamariscina* on immediate allergic reactions / Y Dai. [et al.] // *Am. J. Chin. Med.* – 2005. – Vol. 33, № 6. – P. 957–966.
- 5.Indian herb ‘Sanjeevani’ (*Selaginella bryopteris*) can promote growth and protect against heat shock and apoptotic activities of ultra violet and oxidative stress / K. S. Nand. [et al.] // *J. Biosci.* – 2005. – Vol. 3, № 4. – P. 499–505.
- 6.Chai, T.T. Antioxidant properties of aqueous extracts of *Selaginella wilddenowii* / T.T. Chai, F.C. Wong // *J. Med. Plants Res.* – 2012. – Vol. 6, №7. – P. 1289–1296.
- 7.S-Phase accumulation of *Candida albicans* by anticandidal effect of amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina* / H.J. Jung [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2007. – Vol. 30, № 10. – P.1969–1971.
- 8.Effects of *Selaginella tamariscina* on in vitro tumor cell growth, p53 expression, G1 arrest and in vivo gastric cell proliferation / I.S. Lee [et al.] // *Cancer Lett.* – 1999. – Vol. 20, № 144. – P. 93–99.
9. Gayathri, V. Preliminary studies on the immunomodulatory and antioxidant properties of *Selaginella* species / V.Gayathri, V.V.Asha, A. Subramoniam // *Indian J. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 37, № 6. – P. 381–385.
- 10.Antimetastatic activities of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) on lung cancer cells in vitro and in vivo / S.F. Yang [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2007. – Vol. 110, № 3. – P. 483–489.
- 11.Yue, S.M. Lowering blood lipid and hepatoprotective activity of amentoflavone from *Selaginella tamariscina* in vivo / S.M. Yue, W. Kang // *J. Med. Plants Res.* – 2011. – Vol. 5, № 14. – P. 3007–3014.
- 12.Cholbi, M.R. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation / M.R.Cholbi, M. Paya, M.J. Alcaraz // *Experientia.* – 1991. – Vol. 47, № 2. – P. 195–199.
- 13.Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum* / K.H. Baureithel [et al.] // *Pharm. Acta Helv.* – 1997. – Vol. 72, № 3. – P. 153–157.
- 14.Amentoflavone, a plant biflavone: a new potential anti-inflammatory agent / H.K. Kim [et al.] // *Arch. Pharm. Res.* – 1998. – Vol. 21, № 4. – P. 406–410.
15. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves/ da Silva, K.L. [et al.] // *Therapie.* – 2001. – Vol. 56, № 4. – P. 431–434.
- 16.Andersen, O.M. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications / O.M. Andersen, K.R. Markham. – CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2006. – 1197 p.
- 17.Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re [et al.] // *Free Radical Biol. Med.* – 1999. – Vol. 26, № 9. – P. 1231–1237.
- 18.Применение радикал-катионов ABTS^{•+} в оценке антирадикальной активности флавоноидов / И.Р. Ильясов [и др.] // *Фармация.* – 2008. – Т. 6 – С. 15–18.
- 19.Ragazzi, E. Quantitative analysis of phenolics compounds after thin-layer chromatographic separation / E. Ragazzi, G. Veronese // *J. Chromatog.* – 1973. – Vol. 77, № 2. – P. 369–375.
- 20.Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // *J. Immunol. Method.* – 1983. – Vol. 65, № 1–2. – P. 55–63.
- 21.Определение суммарной концентрации и активности антиоксидантов в пищевых продуктах / Ю.В. Гелетий [и др.] // *Биоорган. химия.* – 2002. – Т. 28, вып. 6 – С. 551–566.
- 22.Fotti, M.C. Antioxidant properties of phenols / M.C. Fotti // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 59, № 12. – P. 1673–1685.
- 23.Childs, R.E. The Steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen / R.E. Childs, W.G. Bardsley // *Biochem.* – 1975. – Vol. 145, № 1. – P. 93–103.
- 24.In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer / A. Itharat [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2004. – Vol. 90, № 1. – P. 33–38.
- 25.Litwinienko, G. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction, novel kinetics in sequential proton loss electron transfer chemistry / G. Litwinienko, K.U. Ingold // *J. Org. Chem.* – 2005. – Vol. 70, № 22. – P. 8982–8990.
- 26.Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents / B. Shan [et al.] // *J. Agric. Food. Chem.* – 2005. – Vol. 53, № 20. – P. 7749–7759.
- 27.Talib, W.H. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine / W.H. Talib, A.M. Mahasneh // *Sci. Pharm.* – 2010. – Vol. 78, № 1. – P. 33–45.
- 28.Amentoflavone and the extracts from *Selaginella tamariscina* and their anticancer activity / J .Ying [et al.] // *Asian Journal of Traditional Medicines.* – 2010. – Vol. 5, № 6. – P. 226–229.
- 29.Effects of *Selaginella tamariscina* on in vitro tumor cell growth, p53 expression, G1 arrest and in vivo gastric cell proliferation / I.S. Lee [et al.] // *Cancer Lett.* – 1999. – Vol. 20, № 144. – P. 93–99.
- 30.Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China / People's Medical Publishing House: Beijing, China –2010. – №1 – P. 210–211.