

9. Хаитов Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.Л.Игнатьева, И.Г.Сидорович. - М.: Медицина, 2000. - 432 с.

10. Briggs C. Alfalfa / C. Briggs // Canadian Pharm J. - 1994. - V.84, № 5. - P.115-120.

11. Cooper M.A. The biology of human natural killer-cell subsets / M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri // Trends Immunol. - 2001. - Vol.22. - P.633-640.

#### Резюме

**Ермоменко Р.Ф.** Вплив коректора білкового обміну екстракту з трави люцерни посівної на гістоструктуру та функції органів імунної системи щурів в умовах експериментального імунodefіциту.

Результати дослідження свідчать про те, що в умовах експериментального циклофосфанового імунodefіциту ЕТЛП в дозі 25 мг/кг при превентивно-лікувальному введенні за рахунок корекції білкового обміну, стабілізації мембран, цитопротекторної та органопротекторної дії, які обумовлюють БАР, що входять до його складу, чинить імуностимулюючу дію та відновлює гістоструктуру та функціональний стан основних органів імунної системи тимусу, селезінки та печінки.

**Ключові слова:** імунітет, імунodeпресія, тимус, селезінка, печінка, гістоструктура, коректор білкового обміну екстракт люцерни.

#### Резюме

**Еременко Р.Ф.** Влияние корректора белкового обмена экстракта травы люцерны посевной на гистоструктуру и функции органов иммунной системы крыс в условиях экспериментального иммунодефицита.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что в условиях экспериментального циклофосфанового иммунодефицита ЭТЛП в дозе 25 мг/кг при превентивно-лечебном введении за счет коррекции белкового обмена, стабилизации мембран, цитопротекторной и органопротекторной активности, обусловленными БАВ, входящие в его состав, оказывает иммуностимулирующее действие и восстанавливает гистоструктуру и функциональное состояние основных органов иммунной системы тимуса, селезенки и печени.

**Ключевые слова:** иммунитет, иммунодепрессия, тимус, селезенка, печень, гистоструктура, корректор белкового обмена, экстракт люцерны.

#### Summary

**Yeromenko R.F.** Influence of protein metabolism corrector of extract *Medicago sativa* sowing grass on histostructure and functions of the immune system of rats in experimental immunodeficiency.

The results of the study indicate that in experimental cyclophosphamide immunodeficiency EMSG in dose of 25 mg per kg in preventive and therapeutic administration due to the correction of protein metabolism, membrane stabilization, cytoprotective and organoprotective activity, caused by BAS, included in it (within its composition), has immunostimulatory effects and restores histostructure and functional state of the principal organs of the immune system of the thymus, spleen and liver.

**Key words:** immunity, immunosuppression, thymus, spleen, liver, histostructure, corrector of protein metabolism, the extract *Medicago sativa* sowing grass.

**Рецензент:** д.біол.н., проф. Б.П.Романюк

## ДИФЕРЕНЦІЙНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ОТРИМАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ СИСТЕМИ ТРАНСПОЗОНІВ ІНДУКОВАНИХ ПЛЮРІПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН МИШІ

**С.В.Малишева, Н.М.Білько, Д.І.Білько, Т.Сарич**

Центр молекулярних і клітинних досліджень Національного університету "Киево-Могилянська академія"  
Інститут нейрофізіології Кельнського університету  
(Кельн, Німеччина)

#### Вступ

Ембріональні стовбурові клітини є плюріпотентними - здатні формувати усі клітинні типи організму. Їх терапевтичний ефект вивчений і доведений [6]. Однак широкого клінічного застосування вони так і не набули через імунологічні та етичні аспекти їх отримання. У 2007 році вдалося отримати клітини, що нагадували за ключовими характеристиками ЕСК [13]. Такі отримати завдяки репрограмуванню диференційованих соматичних клітин шляхом індукції плюріпотентності ключовими факторами. Отримані у такий спосіб клітини названо індукованими плюріпотентними стовбуровими клітинами (іПСК). І з того часу іПСК стали генерувати у різний спосіб - із використанням як вірусних [1, 5, 14] і невірусних векторів [9, 11, 15] для доставки факторів плюріпотентності. Генерування іПСК за допомогою системи транспозонів - принципово новий підхід, що має ряд переваг [12]. Щоб отримати статус нової лінії іПСК, клітинна лінія має відповідати ряду характеристик. Експресія факторів плюріпотентності у недиференційованому стані характеризує проліферативний потенціал клітинної, "стовбуровість" її клітин. Проте оцінку функціональних характеристик отриманої лінії можна лише при диференціюванні. За відсутності фактора, що підтримують плюріпотентному стані (LIF для культури плюріпотентних клітин миші, bFGF для культури плюріпотентних стовбурових клітин людини), у культурі in

*in vitro* цей тип клітин починає спонтанно диференціюватися. У суспензійній культурі на обертальному шейкері плюріпотентні стовбурові клітини формують ЕТ, що мають деяку аналогію із розвитком ембріона [3]. Експресія генів - раних диференційних маркерів ентодермального, мезодермального та ектодермального зародкових шарів у динаміці диференціювання свідчить про появу попередників різних клітинних типів. Показано, що можуть існувати суттєві розбіжності саме у диференційному потенціалі різних ліній іПСК. Деякі клітинні лінії більш схильні до формування конкретного типу клітин [2], чи навпаки, не здатні формувати бажаний тип клітин [10]. Тому оцінка диференційного потенціалу є ключовою характеристикою нової лінії іПСК, що має неабияке значення для подальшого вивчення і застосування як самої лінії, так і методу її отримання.

У даній роботі досліджуються клони репрограмованих за допомогою системи транспозонів Sleeping Beauty ембріональних фібробластів миші. У попередніх дослідженнях показано, що отримані клони експресують маркери плюріпотентності (лужна фосфатаза, Oct3/4, Sox2, SSEA-1, Nanog) на рівні вивчених ліній плюріпотентних стовбурових клітин (результати у даній публікації не наводяться). Для отримання функціональних характеристик досліджуваної клітинної лінії вивчено здатність клонів формувати у культурі ембріодні тільця та проведено аналіз експресії ключових плюріпотентних та диференційних маркерів при спонтанному їх диференціюванні в культурі *in vitro*.

#### Матеріали і методи дослідження

**Умови культивування ЕСК/іПСК.** Усі вказані лінії культивували на фідерному шарі з інактивованих фібробластів миші у середовищі DMEM (15% фетальної телячої виворотки, 0,1 мМ ненасичених амінокислот (NEAA, non-essential amino acids, 50 мМ β-меркаптоетанолу) в присутності фактору LIF 1000 од./мл, що підтримує їх у недиференційованому стані. Пасажували за допомогою трипсину (Trypsin-EDTA).

**Дослідження диференційного потенціалу *in vitro*.** Спонтанне диференціювання здійснювали як описано у Okada et al. [8]. Трипсинізовані клітини поміщали по  $1 \times 10^6$  одиниць у 100 мм чашку Петрі із неадгезивного пластику на 72 год. Кількість отриманих ЕТ підраховували на 3-тю добу диференціювання. ЕТ роз-

саджували на вкритий желатином адгезивний пластик по 60 шт на лунку 6-лункової культуральної планшети та культивували до 12-ої доби. Диференціювання проводили у середовищі DMEM (15% фетальної телячої виворотки, 0,1 мМ ненасичених амінокислот (NEAA, non-essential amino acids, 50 мМ β-меркаптоетанолу) без LIF. Середовище змінювали на кожну 3-тю добу.

Тотальну РНК виділяли за допомогою тризолу (Invitrogen) перед початком диференціювання, на третю добу (перед посадкою ЕТ на культуральний пластик), на 7-му та 12-ту добу диференціювання. Якість та кількість ізольованого матеріалу оцінювали на Nanodrop (Thermo Scientific). Для отримання кДНК використовували 1 мкг РНК, реакцію здійснювали за допомогою SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen), Random Primers (Sigma). ПЦР ампліфікацію здійснювали за допомогою GreenTaq MM, dNTP Mix (Invitrogen) та специфічних праймерів до генів інтересу.

**Дослідження диференційного потенціалу *in vivo*.** Використовували імунодифіцитних тварин мишей лінії Rag-2. Досліджувані клони та клітинні лінії трипсинізували на 48-му добу культивування, та вводили експериментальним тваринам підшкірно у міжлопаточну ділянку по  $2 \times 10^6$  клітин. За формуванням тератоми спостерігали протягом 2-ох місяців. При досягненні відповідних розмірів, тератоми вилучали. Отримані пухлини парафінізували.

#### Отримані результати та їх обговорення

Із репрограмованих за допомогою системи транспозонів Sleeping Beauty ембріональних фібробластів миші, різноманітних за попередніми характеристиками, клон 6, 7 та 9 було обрано для дослідження диференційного потенціалу. В якості позитивного контролю взято зареєстровані лінії іПСК та ЕСК - AT25 та αPIG44, відповідно. Перераховані досліджувані клони та клітинні лінії культивували як типові лінії плюріпотентних стовбурових клітин. У недиференційованому стані досліджувані лінії мали однакову морфологію у та проліферативний потенціал (рис.1).

При культивуванні плюріпотентних стовбурових клітин у суспензійній культурі без фактору, що підтримують їх у недиференційованому стані (LIF), усі досліджувані клітинні лінії формували в ембріодні тільця (ЕТ) (рис. 2). Як правило, сформовані у суспензійній культурі на орбітальному шейкері ЕТ є

досить неоднорідними за розміром, проте в основному зберігають кулясту форму та цілісну поверхню. ЕТ, сформовані експериментальними клонами, дещо поступалися за розміром ЕТ, сформованим контрольними клітинними лініями.

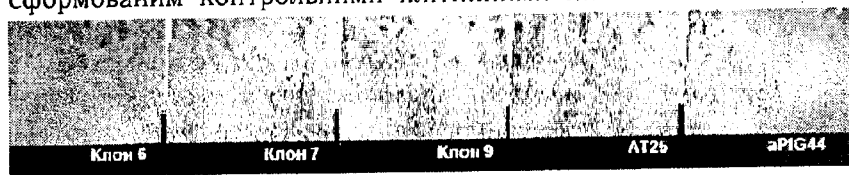


Рис. 1. Морфологія досліджуваних експериментальних клонів та зареєстрованих ліній ЕСК та іПСК у недиференційованому стані; збільшення об'єктиву  $\times 2,5$ .

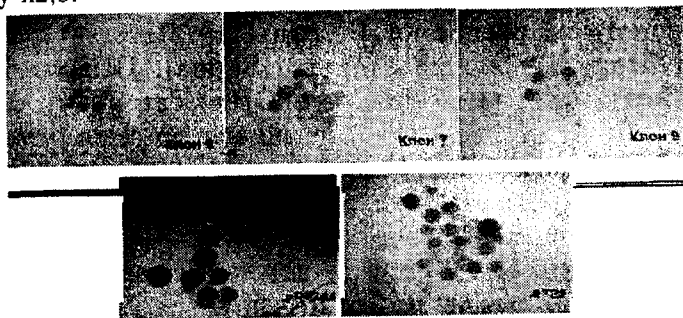


Рис. 2. Ембріюїдні тіลця, сформовані досліджуваними лініями та клонами на 3-тю добу спонтанного диференціювання, збільшення об'єктиву  $\times 2,5$ .

Також було підраховано кількість ЕТ, сформованих експериментальними клонами та зареєстрованими лініями із на третю добу культивування. Підраховували кількість приблизно однакових за розміром ЕТ правильної форми. Із  $1 \times 10^6$  клітин досліджуваними клонами 6, 7, 9 та контрольними лініями AT25 і  $\alpha$ PIG44 було сформовано 2333, 1966, 1000, 2500 та 2200 ЕТ на 1 мл суспензії, відповідно. Таким чином було показано, що експериментальні клони здатні формувати ЕТ, співставні за розміром і кількістю із ЕТ, сформованим зареєстрованими лініями плюріпотентних стовбурових клітин.

Після підрахунку ЕТ розсаджували на вкритий желатином культуральний пластик для подальшого культивування. ЕТ розміщували по 60 одиниць на лунку 6-луночної культуральної планшети. Надалі спонтанне диференціювання здійснювалось у прикріплених ЕТ. За цим процесом спостерігали до 12-го дня культивування. Прикріплені структури розросталися,

клітини, що їх складають, візуально розрізнялися за морфологією та проліферативним потенціалом (рис. 3).

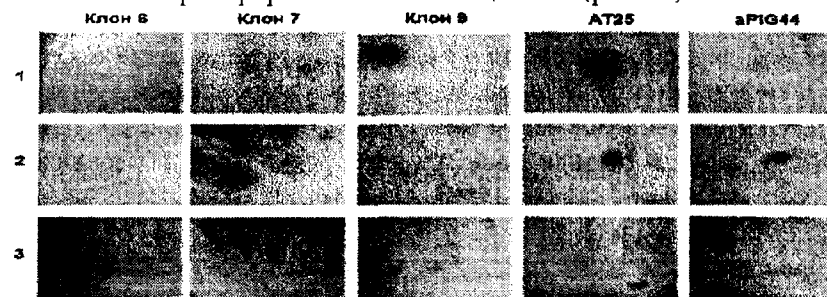


Рис. 3. Спонтанне диференціювання прикріплених ембріюїдних тілць в культурі *in vitro*. 1 - 7-ма доба; 2 - 10-та доба; 3 - 12-та доба.

Проте виявити попередників за морфологічними показниками практично неможливо. Тому для виявлення проявів диференціювання визначали експресію ранніх диференційних маркерів впродовж спонтанного диференціювання.

Із досліджуваних спонтанно диференційованих структур ізолювали загальну РНК на 3-тю, 7-му та 12-ту добу культивування. Із виділеної РНК отримано кДНК, яку використано для реакції RT-PCR зі специфічними до перерахованих вище ранніх диференційних генів праймерами. Результати виявленої динаміки експресії генів зображено на рис. 4.

У недиференційованих плюріпотентних стовбурових клітинах еспресуються гени плюріпотентності Oct3/4 та Nanog. Транскрипційний фактор Oct3/4 є одним із класичних "факторів Яманака". Уникнути цього фактора при репрограмуванні соматичних клітин практично неможливо [4, 7]. Оскільки Oct3/4 входить до репрограмуючої касети (за допомогою якої отримано як експериментальні клони, так і контрольна лінія іПСК), його експресія є екзогенною та ендогенною, вірогідно тому і досить сильною. Фактор плюріпотентності Nanog не входить до репрограмуючої касети, яку було використано. Його експресія є достатньо сильною як в лінії ЕСК, так і у досліджуваних лініях іПСК. У вихідній лінії соматичних клітин МЕФ експресію цього фактора не виявлено. Тому можна стверджувати про викликану репрограмуванням реактивацію ендогенної експресії Nanog в лініях іПСК, зокрема в експерименталь-

них клонів. На 7-му та 12-ту добу диференціювання експресія Nanog була дещо слабшою, ніж у недиференційованих клонів та на початку диференціювання (День 3). Зниження експресії Oct3/4 не помічено аж до 12-ої доби диференціювання. Отже сайленсинг експресії цього маркера не відбувається. Виявлений факт можна пов'язати з ектопічною експресією досліджуваного маркера. Однак дане припущення потребує перевірки.

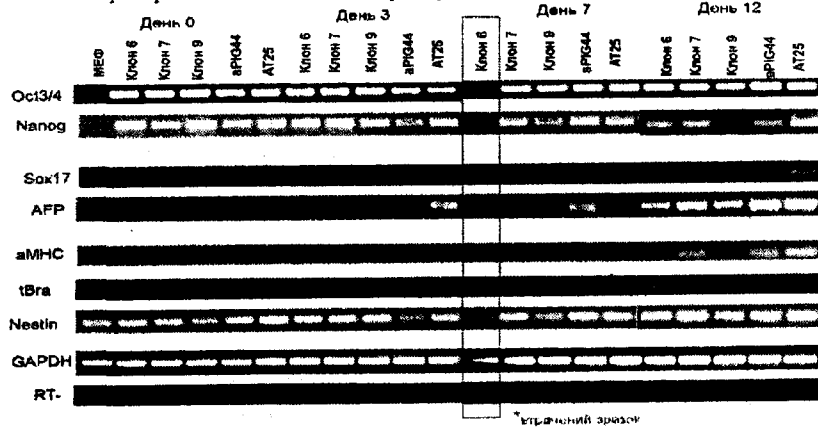


Рис. 4. Експресія ранніх диференційних маркерів при спонтанному диференціюванні досліджуваних клонів та клітинних ліній в системі in vitro.

Згідно отриманих результатів, експресію жодних диференційних генів не виявлено у мишиних ембріональних фібробластах (МЕФ), із яких отримано експериментальні лінії індукованих плюріпотентних стовбурових клітин. Також експресію жодних ранніх диференційних генів не спостерігали в жодній досліджуваній лінії плюріпотентних стовбурових клітин у недиференційованому стані.

На третю добу культивування на стадії інтактних ембріонних тілець виявлено експресію раннього ентодермального гену AFP, однак лише в одній із контрольних ліній - AT25. У іншій контрольній лінії ЕСК експресію AFP виявлено на 7-му добу. На 12-ту добу AFP експресувався і у експериментальних клонів, проте менш інтенсивно, ніж у досліджуваних. Експресія іншого раннього диференційного маркера Sox17 була менш інтенсивною. Її виявлено на 7-му добу у контрольних лініях, та на 12-ту в усіх досліджуваних.

Експресію ранніх мезодермальних маркерів виявлено із 7-ої доби спонтанного диференціювання. Маркер tBra (Brachyury) виявлено на 7-му та 12-ту добу в усіх досліджуваних клонів. Кардіоспецифічний маркер αMHC (myosin heavy chain) виявлено лише на 12-ту добу диференціювання у контрольних лініях та експериментальному клоні 7.

Аналіз експресії раннього ектодермального гену Nestin виявляє експресію цього маркера на усіх досліджуваних стадіях та навіть у вихідній лінії соматичних клітин МЕФ. Це вказує на необхідність вибору іншого гена в якості раннього ектодермального маркера та подальшого вивчення диференційного потенціалу досліджуваних ліній.

Для виявлення диференційного потенціалу досліджуваних ліній в системі in vivo проводили випробовування на формування у імунodefіцитних тварин тератом експериментальними та контрольною клітинною лінією.

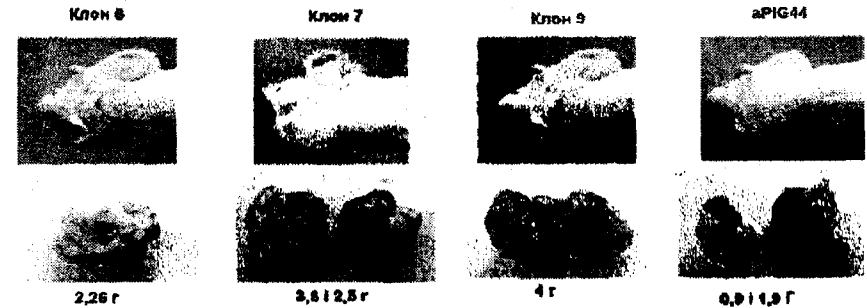


Рис. 5. Тератоми, сформовані різними клонами отриманої за допомогою мобільних генетичних елементів лінії іПСК та контрольною лінією ЕСК.

Як видно з рис. 5, усі клони експериментальної клітинної лінії здатні формувати в імунodefіцитних тварин васкуляризовані солідні пухлини, що за тактильними та морфологічними показниками відповідають характеристикам тератом.

*Особлива подяка: розробникам системи транспозонів Sleeping Beauty, співробітникам Макс-Дельбрук Центру молекулярної медицини (Берлін, Німеччина) Zoltan Ivics та Zsuzsanna Izsvak за люб'язно надану систему для репрограмування фібробластів; Інституту нейрофізіології Кельнського університету (Кельн, Німеччина), групі Tomo Saric та її керівнику особисто за надану можливість реалізації даного наукового проекту.*

## Висновки

1. У роботі досліджено диференційний потенціал репрограмованих за допомогою системи транспозонів ембріональних фібробластів миші. При спонтанному диференціюванні *in vitro* спостерігається експресія ранніх диференційних маркерів, що свідчить про появу ентодермальних та мезодермальних клітин-попередників.

2. У зв'язку із виявленням конститутивної експресії обраного ектодермального маркера, диференційний потенціал у цьому напрямку потребує подальшого вивчення. Показано, що досліджувані клони здатні формувати тератоми у імунodefіцитних тварин.

3. За досліджуваними параметрами експериментальні клони не поступаються зареєстрованим лініям плюріпотентних стовбурових клітин. Тому експериментальні клони можна вважати новою потенційною лінією індукованих плюріпотентних стовбурових клітин миші.

## Література

1. EOS lentiviral vector selection system for human induced pluripotent stem cells / A. Hotta, A. Y L Cheung, N. Farra [et al.] // *Nature Protocols*. - 2009. - Vol. 4 (12). - P. 1828-1844.
2. Iwamuro M. Comparative analysis of endoderm formation efficiency between mouse ES cells and iPS cells / M. Iwamuro, T. Komaki, Y. Kubota [et al.] // *Cell. Transplant.* - 2010. - Vol. 19(6). - P. 831-9.
3. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine / G. Keller // *Genes Dev.* - 2005. - Vol. 19(10). - P. 1129-55.
4. Krohne T.U. Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4-reprogrammed human induced pluripotent stem cells / T. U. Krohne, P. D. Westenskow, T. Kurihara [et al.] // *PaediatrInt Child Health.* - 2012. - Vol. 1(2). - P. 96-109.
5. MacArthur C. C. Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions / C. C. MacArthur, A. Fontes, N. Ravinder [et al.] // *Stem Cells Int.* - 2012. - Vol. 2012 (2012). - Article ID 564612. - Doi:10.1155/2012/564612.
6. Mochiduki Y. Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications / Y. Mochiduki, K. Okita // *Biotechnol. J.* - 2012. - DOI: 10.1002/biot.201100356.

7. Nemaierova A. Two-factor reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells reveals partial functional redundancy of Sox2 and Klf4 / A. Nemaierova, S. Y. Kim, O. Petrenko, U. M. Moll // *Cell Death Differ.* - 2012. - Doi: 10.1038/cdd.2012.45.

8. Okada M. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells / M. Okada, M. Oka, Y. Yoneda // *BiochimBiophysActa.* - 2010. - Vol. 1800(9). - P. 956-63.

9. Plews J. R. Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach / J. R. Plews, J. Li, M. Jones [et al.] // *PLoS One.* - 2010. - Vol. 5 (12). - P. 14397.

10. Seiler K. Induced Pluripotent Stem Cells Expressing Elevated Levels of Sox-2, Oct-4, and Klf-4 Are Severely Reduced in Their Differentiation from Mesodermal to Hematopoietic Progenitor Cells / K. Seiler, M. S. Noghabi, K. Karjalainen [et al.] // *Stem Cells Dev.* - 2011. - Vol. 20(7). - P. 1131-1142.

11. Si-Tayeb K. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors / K. Si-Tayeb, F. K Noto, A. Sepac [et al.] // *BMC Developmental Biology.* - 2010. - Vol. 10. - P. 81.

12. Swierczek M. The Sleeping Beauty transposon system for clinical applications / M. Swierczek, Z. Izsvak, Z. Ivics // *Expert OpinBiolTher.* - 2012. - Vol. 12 (2). - P. 139-153.

13. Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* - 2006. - Vol. 126 (4). - P. 663-676.

14. Tashiro K. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction / K. Tashiro, M. Inamura, K. Kawabata [et al.] // *Stem Cells.* - 2009. - Vol. 27. - P. 1802-1811.

15. Zhang H. Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors / H. Zhang, Y. Ma, J. Gu [et al.] // *Biomaterials.* - 2012. - Vol. 33 (20). - P. 5047-5055.

## Резюме

Малишева С.В., Білько Н.М., Білько Д.І., Сарич Т. Диференційний потенціал отриманих за допомогою системи транспозонів індукованих плюріпотентних стовбурових клітин миші.

У роботі досліджено диференційний потенціал клонів, отриманих за допомогою системи транспозонів лінії індукованих плюріпотентних стовбурових клітин миші. Показано, що отримані експериментальні клони здатні формувати у есенціальній культурі ембріодні тільця (ЕТ), що за кількістю і

розміром співставні із ЕТ, сформованими контрольними лініями плюрипотентних клітин. Появу попередників різних зародкових шарів оцінювали за експресією ранніх диференційних маркерів при спонтанному диференціюванні досліджуваних клонів у системі *in vitro*. Також досліджено диференційний потенціал отриманих клонів *in vivo*. Показано, що досліджувані клони можуть формувати тератоми у імунодифіцитних тварин. Отримані дані свідчать про плюрипотентність досліджуваних клітинних ліній.

**Ключові слова:** індуковані плюрипотентні стовбурні клітини, спонтанне диференціювання, маркери плюрипотентності, диференційні маркери.

#### Резюме

**Малишева С.В., Билько Н.М., Билько Д.И., Сарич Т.** *Differential potential of induced pluripotent stem cells of mouse, obtained with mobile elements as gene delivery system.*

В данной работе исследован дифференциальный потенциал клонов индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши, полученных с помощью системы транспозонов. Показано, что полученные экспериментальные клоны способны формировать в суспензионной культуре эмбрионные тельца (ЭТ), сопоставимые по размеру и количеству с ЭТ, сформированными контрольными линиями плюрипотентных клеток. Появление предшественников разных зародышевых листков оценивали по экспрессии ранних дифференциальных маркеров при спонтанном дифференцировании исследуемых клонов в системе *in vitro*. Так же исследован дифференциальный потенциал полученных клонов в системе *in vivo*. Показано, что исследуемые клоны могут формировать тератомы у иммунодефицитных животных. Полученные данные свидетельствуют о плюрипотентности исследуемых клеточных линий.

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, спонтанная дифференцировка, маркеры плюрипотентности, дифференционные маркеры.

#### Summary

**Malisheva S.V., Bilko N.M., Bilko D.I., Sarich T.** *Differential potential of induced pluripotent stem cells of mouse, obtained with mobile elements as gene delivery system.*

Differentiation potential of various clones of murine iPSCs, obtained with a principally new tool - mobile elements as gene delivery system, is studied in the current paper. The experimental clones were shown to form embryoid bodies (EBs), comparable by the size and quantity with EBs, formed by established cell lines. The appearance of different germ layers' progenitor cells was estimated by the expression of early differentiation markers during spontaneous differentiation *in vitro*. *In vivo* differentiation potential was studied also. It is demonstrated that the experimental clones were able to form vascularized teratomas in immunodeficient animals. The data obtained proves the pluripotency of the clones tested.

**Key words:** induced pluripotent stem cells, spontaneous differentiation, pluripotency markers, differentiation markers.

*Рецензент: д.біол.н., проф. С.М.Смірнов*

УДК 615.322:582:577.114

## ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ І СИРОВИНА, ЯКІ МІСТЯТЬ КУМАРИНИ ТА ХРОМОНИ

**Б. П. Романюк, В. М. Фролов, Я. А. Соцька**  
ГЗ "Луганський державний медичний університет"

**Кумарини** (франц. coumarine) природна сполука рослинного походження, в основі якої лежить 9,10-бензо-а-пірон.

Це безбарвні кристали із запахом свіжого сіна, розчиняється у спирті, менше у воді.

По класифікації Е.Шпета розділяють на наступні основні групи:

- кумарин, дігідрокумарин та їх глікозиди;
- оксі, метооксі (алоксі) метилendioксі-кумарини та їх глікозиди;
- фурукумарини (кумарон-а-пірони);
- піранокумарини або хромено-а-пірони;
- 3,4-бензокумарини (діфенілметилolіпіди);
- кумарини, які містять систему бензофурану.

Вони містяться в рослинах роду: складноцвітні (Asteracea), пасльонові (Solanaceae), зонтичні (Umbelliferae), бобові (Fabaceae) здебільшого в плодах, коренях, корі, квітках. В менших кількостях - в траві та листках. Для виявлення кумарину використовують реакції азосполук, при цьому відмічають різну окраску (червоно-памаранчеву, малинову). Використовують також лактонну пробу, основу на здатності лактонного кільця розмикатися при підлучуванні та замикатися в кислому середовищі. Хромони також природні сполуки, які одержують в результаті конденсації  $\gamma$ -піронового та бензольного кілець. Вони по своїй структурі близькі як до кумаринів, так і до флавоноїдів, але в природі зустрічаються рідко. Медичне застосування знайшли кумарини та хромони в рослинах амї зубній, пастернаку посівному, псоралей кістянкової.

#### Амі зубна - *Ammi visnaga* L.

Дворічна трав'яниста рослина з родини селерових (зонтичних) Apiacea (Umbelliferae) з борозенчастим розгалуженим стеблом висотою до 1 м і веретеноподібним коренем. Стебло прямостояче, галузисте, трохи борозенчасте. Сіро-зелені лис-