

## МОДИФИКАЦИЯ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ЭКСТРАКТОВ ЧАЯ



*На культуре клеток лимфоцитов периферической крови человека установлена антимуtagenная активность экстрактов чая различных стадий технологической обработки при модификации мутационного процесса, индуцированного ионизирующим облучением, нитрозогуанидином и бенз[а]пиреном. Эффективность антимуtagenного действия экстрактов при модификации индуцированной мутабельности факторами различной физико-химической природы последовательно снижается по мере углубления процесса технологической переработки. Сравнительная оценка их антимуtagenной эффективности показала высокую антимуtagenную активность экстракта из зеленых листьев чая.*

© М.Б. ГУСЕЙНОВ, Р.А. АГАБЕЙЛИ, У.К. АЛЕКПЕРОВ, 2005

**Введение.** Результаты эпидемиологических исследований в области оценки результатов практических разработок по снижению последствий воздействия средовых генотоксикантов, в том числе в результате применения антимутагенов, свидетельствуют о снижении уровня ряда заболеваний, связанных с повреждением генетических структур, а также смертности от онкологических заболеваний [1]. Накоплена также значительная информация о перспективности использования антимутагенов как пищевых добавок и фармакологических средств в геронтологии, профилактике и терапии осложнений, связанных с производственной и бытовой интоксикацией и имеющих манифестацию на генетическом уровне [1, 2]. Данные о роли соединений — модификаторов мутагенеза в антиканцерогенезе свидетельствуют о перспективах практического применения многих антимутагенов, имеющих природное происхождение и действующих с помощью множества различных не исключающих друг друга механизмов на внеклеточном и внутриклеточном уровнях.

В последние годы внимание исследователей направлено на изучение генозащитных свойств композиций антимутагенов. Результаты этих работ показали, что смесь антимутагенов проявляет более высокую эффективность, чем ее отдельные компоненты [1, 3]. Целый ряд экспериментальных исследований посвящен антимутагенным и антиканцерогенным свойствам экстрактов зеленого чая. Экспериментально показано, зеленый чай ингибирует канцерогенез, способен подавлять рост опухолевых клеток в различных органах человека, и в связи с этим он активно используется в профилактических целях [4]. Чай один из известных протекторных агентов, проявляющих защитные эффекты на различных стадиях канцерогенеза [5]. Компоненты чая могут остановить этот процесс, модулируя пути трансдукции сигнала, ведущие к предотвращению быстрого роста и преобразования клетки.

В настоящей работе представлены результаты изучения генозащитных свойств экстрактов чая различных стадий технологической обработки при модификации мутагенного действия ионизирующего облучения и химических мутагенов с различным механизмом действия и проведена сравнительная оценка антимутагенной эффективности экстрактов чая.

**Материал и методы.** В качестве объекта исследования использовали культуру лимфоцитов пе-

Таблица 1

Влияние экстрактов чая (0,01 мкг/мл) различных стадий технологической обработки на частоту аббераций хромосом, индуцированных гамма-лучами в дозе 2,92 Гр в культуре лимфоцитов периферической крови человека

Вариант опыта	Абберации хромосом, % (M ± m)	td	P	ФЭА
Контроль	1,85 ± 0,82	—	—	—
Гамма-лучи	11,11 ± 2,01	4,2	<0,001	—
Листья зеленого чая	3,61 ± 1,18	3,2	<0,001	0,66
Увядание	4,02 ± 1,24	3,0	<0,01	0,63
Скручивание	4,82 ± 1,35	2,5	<0,01	0,56
Ферментация	4,92 ± 1,33	2,5	<0,01	0,56
Сушка	5,30 ± 1,38	2,5	<0,05	0,43
Черный чай	6,07 ± 1,51	2,1	<0,05	0,45

Таблица 2

Влияние экстрактов чая (0,01 мкг/мл) различных стадий технологической обработки на частоту аббераций хромосом, индуцированных МННГ (5,5 мМ) в культуре лимфоцитов периферической крови человека

Вариант опыта	Абберации хромосом, % (M ± m)	td	P	ФЭА
Контроль	1,85 ± 0,82	—	—	—
МННГ	10,82 ± 1,45	4,0	<0,001	—
Листья зеленого чая	3,87 ± 1,20	4,2	<0,001	0,64
Увядание	4,38 ± 1,29	2,6	<0,01	0,59
Скручивание	4,82 ± 1,35	2,4	<0,05	0,55
Ферментация	4,76 ± 1,34	2,3	<0,05	0,56
Сушка	5,51 ± 1,43	2,1	<0,05	0,49
Черный чай	6,42 ± 1,55	2,1	<0,05	0,40

риферической крови здоровых доноров. Использовали физические мутагены: ионизирующее облучение, гамма-лучи (ГЛ) в дозе 2,92 Гр (телегамматерапевтическая установка РОКУС-М, <sup>60</sup>Со, мощность дозы 48,6 р/мин); химические мутагены — алкилирующий мутаген прямого типа действия N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) в концентрации 5,5 мМ; промутаген — полициклический ароматический углеводород бенз-[a]-пирен (БП) — в концентрации 0,11 мМ. В качестве модификаторов мутационного процесса изучены водно-спиртовые экстракты из листьев чая (0,01 мкг/мл) различных стадий их технологической обработки (ТО): зеленые листья

→ увядание → скручивание → ферментация → сушка → черный чай.

В связи с отсутствием в лимфоцитах системы микросомальных монооксигеназ смешанной функции промутаген БП применяли после его метаболической активации фракцией S9 mix в системе *in vitro*. В качестве стимулятора реакции гемагглютинации лимфоцитов использовали фитогемагглютинин (ФГМ). После 5-часового культивирования при 37 °С в среду на 17 ч добавляли экстракты чая (0,01 мкг/мл), затем в среду вводили мутаген. Через 69 ч на 3 ч в среду добавляли колхицин (0,5 мкг/мл). Через 72 ч проводили фиксацию материала. Частоты аббераций хромосом анализировали в культуре первичных лимфоцитов периферической крови в метафазах [5]. Метаболическую активацию БП проводили *in vitro* в условиях S9 mix фракции. В качестве доноров были использованы белые крысы, в качестве индикатора микросомальных монооксидаз со смешанной функцией — 3-метилхолантрен [6]. Полученные данные обработаны общепринятыми методами математической статистики [7]. Фактор антимуtagenной эффективности (ФЭА) исследуемых экстрактов чая рассчитывали по известной формуле [8].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Цитогенетические эффекты экстрактов чая различных стадий ТО изучены при индукции аббераций хромосом гамма-лучами в культуре клеток лимфоцитов человека. Из результатов табл. 1 видно, что экстракты чая, полученные со всех стадий ТО, способствуют снижению индуцированной ГЛ частоты аббераций хромосом. Однако если на первых четырех стадиях обработки антимуtagenная активность их высока (66—56 %), то со стадий сушки и получения черного чая антимуtagenная эффективность экстрактов чая характеризуется некоторым снижением (45—43 %). Так, если индуцированная ГЛ частота аббераций хромосом модифицируется экстрактом из зеленых листьев с эффективностью 66 %, то в случае экстракта из листьев черного чая эффективность снижается до 45 %. В то же время изученные экстракты чая не оказывают мутагенного действия на спонтанный мутагенез (ранее проведенные исследования) и не проявляют синергизм с генотоксическим действием радиации.

Изучена также антимуtagenная активность экстрактов чая на примере модификации ими

частоты aberrаций хромосом, индуцированной химическим мутагеном прямого типа действия — МННГ (табл. 2). Установлена способность экстрактов чая ингибировать индуцированную МННГ частоту АХ в культуре лимфоцитов человека. Результаты проведенной серии экспериментов подтвердили снижение антимутагенной эффективности экстрактов чая в зависимости от стадий его ТО. Вместе с тем установлено, что экстракты чая с различных стадий ТО предотвращают мутационный процесс, связанный с повреждением структуры ДНК. МННГ — мутаген прямого действия, действующий без метаболической активации, относится к классу веществ, которые реагируют с ДНК и присоединяют к основаниям углеводородные радикалы [9]. Полученные данные позволяют предположить, что одним из механизмов генозащитного действия изученных в работе экстрактов чая может быть предотвращение мутационного процесса, связанного с заменой пар оснований.

С целью выявления физиологичности, универсальности и механизма действия антимутагенного действия экстрактов чая в эксперимент был вовлечен широко распространенный в окружающей среде промутаген бенз-[а]-пирен. В этой серии экспериментов (табл. 3), проведенных согласно вышеприведенным схемам, была установлена антимутагенная активность экстрактов чая и по отношению к мутационному процессу, индуцированному БП. В этих опытах антимутагенная эффективность также снижалась по мере углубления технологической переработки листьев чая.

В целом результаты сравнительной оценки антимутагенной эффективности экстрактов чая различных стадий ТО в отношении индуцированного физико-химическими факторами мутационного процесса показали высокую эффективность экстрактов первых четырех стадий ТО (65—56 %). Антимутагенная эффективность экстрактов после стадий сушки и получения черного чая значительно снижается. Тем не менее из результатов табл. 1—3 видно, что снижение индуцированной частоты aberrаций хромосом и в этих вариантах эксперимента достаточно высоко и статистически достоверно. Полученные данные свидетельствуют, что черный чай так же, как и зеленый, проявляет антимутагенные свойства, однако процесс ТО способствует снижению антимутагенной эффективности экстрактов чайного листа.

Таблица 3

Влияние экстрактов чая (0,01 мкг/мл) различных стадий технологической обработки на частоту aberrаций хромосом, индуцированных БП (0,11 мМ) в культуре лимфоцитов периферической крови человека

Вариант опыта	Аберрации хромосом, % (M ± m)	td	P	ФЭА
Контроль	1,85 ± 0,82	—	—	—
БП	10,93 ± 1,98	3,9	<0,001	—
Листья зеленого чая	3,87 ± 1,20	3,0	<0,01	0,65
Увядание	4,15 ± 1,28	2,8	<0,01	0,62
Скручивание	4,4 ± 1,30	2,7	<0,01	0,59
Ферментация	4,82 ± 1,36	2,5	<0,05	0,56
Сушка	5,12 ± 1,38	2,3	<0,05	0,53
Черный чай	5,70 ± 1,43	2,1	<0,05	0,48

Изучению антимутагенной и антиканцерогенной активности зеленого чая посвящено значительное число экспериментальных работ. Так, антимутагенная активность водного экстракта из зеленого чая показана на культуре клеток китайского хомячка [10], в системе *Drosophila melanogaster* [11], в клетках печени крыс [1]. Полифенолы зеленого чая ингибируют индуцированный N-нитрозобис-(2-оксипропил)-амином карциногенез поджелудочной железы у золотистых сирийских хомячков [10]. Результаты исследования механизма генозащитного действия отдельных метаболитов фенольной или полифенольной природы позволили выдвинуть предположение, что в основе функционирования этих механизмов лежит адсорбция или инактивация мутагенов прямого и косвенного типа действия [10, 12, 13], подавление процессов метаболической активации промутагенов [14], а также направленная регуляция активности ферментов пострепликативной [15] и эксцизионной [16] репарации. Также установлено, что в основе механизма генозащитного действия отдельных метаболитов и ферментов чая лежат механические поглощающие свойства, к которым относят катехины, танины. Сравнение экстрактов и полифенолов зеленого и черного чая показало, что они имеют практически одинаково полезный эффект для здоровья [11]. Чайный лист содержит сильные антиоксидантные полифенолы, такие как эпигаллокатехин галлат (ЭГКГ) и фермент полифенолоксидазу. Чайные напитки снижают риск за-

болевания сердца, так как антиоксиданты, содержащиеся в чае, понижают формирование оксидантных метаболитов ДНК реактивными видами кислорода и, в частности, ингибируют канцерогенез, понижают рост неопластических клеток [1, 16, 17].

В настоящей работе впервые изучено влияние состава экстрактов чая различных стадий ТО на сохранение его генозащитных свойств и эффективность антимутагенного действия. Эффективность их генозащитного действия изучена на культуре клеток человека с применением в качестве модельных мутагенов с известным механизмом действия. Процесс ТО способствует снижению его антимутагенной эффективности при модификации мутационного процесса, индуцированного мутагенами. Антимутагенная эффективность зеленого чая на этапах ТО в культуре лимфоцитов человека превысила эффективность черного чая при действии ГЛ на 21 %, МННГ — на 24 % и БП — на 17 %.

**Выводы.** Изучено влияние экстрактов чая, различающихся по составу в результате технологической обработки, на индуцированный различными агентами мутационный процесс в лимфоцитах человека. Антимутагенное действие водно-спиртовых экстрактов чая различных стадий его технологической обработки установлено в отношении группы мутагенных факторов, индуцирующих различные типы повреждений ДНК, в том числе гамма-лучей, нитрозогуанидина и бенз-[а]-пирена. Антимутагенная активность экстрактов чая носит неспецифический характер, проявляясь вне зависимости от механизмов действия химических мутагенов, и свидетельствует о проявлении их генозащитных свойств на разных этапах формирования и становления мутационных событий.

**SUMMARY.** Antimutagenic activity of the extracts of tea leaves from different stages of technological processing has been investigated. Culture of human lymphocyte cells was used as a test-object. Mutations have been induced with gamma-rays, N-methyl-N<sup>1</sup>-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and benz-[a]-pyren. All the extracts showed ability to decrease the frequency of chromosome aberrations with high effectiveness. The effectiveness of green tea leaf extracts was higher in comparison with the effectiveness of the extracts from the late stages of processing.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weisburger J.H. Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms // *Eur. J. Cancer Prev.* — 2002. — **11**, Suppl 2. — S1—S7.
2. Alekperov U.K. Plant antimutagens and their mixtures in inhibition of genotoxic effects of xenobiotics and aging processes // *Eur. J. Cancer Prev.* — 2002. — **11**, suppl 2. — S8—S11.
3. Агабейли Р.А., Касимова Т.Э., Алекперов У.К. Антимутагенная активность растительных экстрактов из *Armoracia rusticana*, *Ficus carica*, *Zea mays* и пероксидазы в клетках эукариот // *Цитология и генетика.* — 2004. — **38**, № 2. — С. 40—45.
4. Fujiki H., Suganuma M., Okabe S., Sueoka N. et al. Cancer inhibition by green tea // 5<sup>th</sup> ICMAA. — Okayama, 1996. — P. 71.
5. Chung S. Yang, Saileta Prabhu, Janelle Landau. Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols // *Drug Metab. Rev.* — 2001. — **33**, № 3/4. — P. 237—253.
6. Moorched P.S., Novell P.C., Meliman W. J. et al. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // *Exp. Cell Res.* — 1960. — **20**, № 3. — P. 613—616.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 350 с.
8. Алекперов У.К. Антимутагенез. Теоретические и практические аспекты. — М.: Наука, 1984. — 102 с.
9. Тарасов В.А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. — М.: Наука, 1982. — 228 с.
10. Mamiko Miyajima, Yukiaki Kuroda Antimutagenic action of hot-water extracts of green tea (*Camellia sinensis*) in cultured Chinese Hamster V79 cells // 5<sup>th</sup> ICMAA. — Okayama, 1996. — P. 32.
11. Fujie Sh., Fujikawa K. Detection of delayed antigenotoxicity of green tea extract using a somatic mutation system of *Drosophila melanogaster* // *Ibid.* — P. 101.
12. Conney A.H., Yao-Ping Lu, You-Rong Lou, Mou-Tuan Huang Inhibitory effects of tea and caffeine on UV-induced carcinogenesis: relationship to enhanced apoptosis and decreased tissue fat // *Eur. J. Cancer Prev.* — 2002. — **11**, Suppl. 2. — S28—S36.
13. Nagabhushan M. Catechin as an mutagen and anticarcinogen // *Environ. and Mol. Mutagen.* — 1989. — **14**. — Suppl. — P. 138.
14. Osawa T., Kumon H., Ruce C.A. Inhibitory effect of lichen constituent on mutagenicity induced by heterocyclic amines // *Environ. and Mol. Mutagen.* — 1991. — **18**, № 1. — P. 35—40.
15. Sasaki Y.F. Imanishi H., Ohna T. Effect of antimutagenic flavourings on SCEs induced by chemical mutagens // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Test.* — 1987. — **189**, № 3. — P. 313—318.
16. Hara Y. Green tea. — New York, 2001. — 252 p.
17. Kuroda Y., Hara Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols // *Mutat. Res.* — 1999. — **436**. — P. 69—97.

Поступила 13.07.04