

Р.А. АГАБЕЙЛИ, Т.Э. КАСИМОВА

Институт ботаники Национальной
Академии наук Азербайджанской Республики,
Патамдартское шоссе 40, AZ1073, Баку

АНТИМУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ *ARMORACIA RUSTICANA*, *ZEА MAYS*, *FICUS CARICA* И ИХ СМЕСИ



Установлена антимутагенная активность растительных экстрактов из *Armoracia rusticana*, *Ficus carica*, *Zea mays* и их смеси при воздействии на генетические структуры эукариот средовых ксенобиотиков. Выявлена их способность предотвращать мутагенный эффект *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидина, индуцирующего аберрации хромосом в клетках *Vicia faba*, ядерные хлорофильные мутации у *Arabidopsis thaliana*, а также фтористого натрия в клетках костного мозга крыс. Полученные экспериментальные данные показывают, что растительные экстракты и их смеси могут быть использованы для контролирования уровня мутаций, индуцированных мутагенами среды.

© Р.А. АГАБЕЙЛИ, Т.Э. КАСИМОВА, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 3

Введение. Выявление новых антимутагенов и антиканцерогенов, изучение механизма их действия, практических путей применения для уменьшения профессионального, общего и возрастного риска для людей и сохранения биоразнообразия является одной из актуальных задач. Сегодня на основе контролирования действия средовых генотоксикантов и применения антимутагенов и антиканцерогенов отмечается снижение уровня ряда заболеваний, обусловленных повреждением генетических структур, в том числе смертность от онкологических заболеваний, наблюдается увеличение средней продолжительности жизни в ряде стран [1, 2]. Исследования, направленные на повышение эффективности действия антимутагенов, связаны в основном с выдвиганием и экспериментальной проверкой двух новых концепций. Одна из них связана с повышением эффективности антимутагенов за счет создания смесей и синергизации эффекта их защитных компонентов, вторая — с применением ингибиторов мутагенеза для коррекции нарушений регуляторных функций генетического аппарата, которые хотя не наследуются, тем не менее играют важную роль в онтогенезе [3–5].

Выявление эффективных антимутагенов и создание на их основе новых генозащитных смесей является актуальной проблемой. В настоящей работе приведены результаты экспериментальных исследований влияния растительных экстрактов, их смеси и пероксидазы на мутационный процесс, индуцированный средовыми ксенобиотиками. Сравнительная оценка их антимутагенной эффективности в отношении индуцированного мутационного процесса проведена в клетках растений и лабораторных животных.

Материал и методы. Анализ антимутагенного действия растительных экстрактов (РЭ), полученных из корней *Armoracia rusticana* (ЭКХ), однолетних побегов *Ficus carica* (ЭВИ), проростков семян *Zea mays* (ЭПК) и их смеси (СЭ) [6] проводили с использованием клеток меристемы проростков конских бобов (*Vicia faba*) и костного мозга лабораторных крыс в возрасте 10–12 нед со средней массой 120–130 г. Анализ ядерных хлорофильных мутаций проводили по эмбрион-тесту Мюллера в недозревших стручках верхушечного соцветия резушки Таля (*Arabidopsis thaliana*) [7]. Для

сравнительной оценки эффективности анти-мутагенного действия РЭ во всех экспериментах ставили вариант с антиоксидантным ферментом — пероксидазой (Peroxidasa CE 1.11.1.7 фирмы «Reanal»), антимуагенная активность которой известна [4, 8]. РЭ получены методом вакуумной перегонки [9]. Анализ частоты aberrаций хромосом проводили в анафазных клетках проростков конских бобов и миеокариоцитах крыс. Семена *Vicia faba* проращивали в термостате при $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, в растворах экстрактов при pH 5,4. Проростки длиной 12–15 мм фиксировали смесью абсолютного этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) через 45 ч от начала замачивания семян. Готовили давленные временные ацетокарминовые препараты, на которых проводили анализ АХ по стандартной методике. Фактор эффективности антимуагена (ФЭА) рассчитывали по формуле [10]. В качестве мутагенных факторов применяли N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) фирмы «Serva» и фтористый натрий — NaF (20 мг ионов F⁻/100 г массы животного), широко используемый в различных отраслях цветной металлургии, медицине и быту. Исследованы перспективы практического применения растительных экстрактов и их смеси в условиях воздействия фтористого натрия. Смесью (60 мкг/100 г массы) вводили подопытным животным per os ежедневно за две недели до воздействия мутагена. Через 24 ч после воздействия мутагена животные подвергались декапитации с соблюдением всех норм эвтаназии. Костный мозг бедренных костей крыс фиксировали в растворах Карнуа (6 : 3 : 1) и хранили в 70⁰ этило-

вом спирте. Готовили давленные временные препараты путем окрашивания костного мозга в 2%-ном растворе ацетоорсеина. На каждый вариант анализировали по 1000 клеток и более. Полученные данные статистически обработаны [11].

Результаты исследований и их обсуждение. Проведена серия экспериментов по изучению влияния новых растительных экстрактов на индуцированные химическим мутагеном прямого типа действия МННГ частоту aberrаций хромосом в клетках меристемы корешков *Vicia faba* (табл. 1) и частоту хлорофильных мутаций у *Arabidopsis thaliana* (табл. 2). Семена бобов, подвергнутые 6-часовой обработке МННГ в концентрации 3 мМ после отмывания от мутагена в течение 30 мин под проточной водой, переводили в растворы растительных экстрактов и пероксидазы для последующего инкубирования в термостате. Как видно из результатов экспериментов, представленных в табл. 1, проращивание семян конских бобов в растворах растительных экстрактов в концентрации 0,01 мкг/мл с высокой эффективностью приводит к снижению уровня индуцированных МННГ aberrаций хромосом. Сравнительная оценка эффективности изученных экстрактов, их смеси и пероксидазы выявила высокую эффективность действия всех изученных в работе препаратов. В то же время антимуагенная эффективность смеси была значительно выше, чем ее компонентов в отдельности. Антимуагенная активность растительных экстрактов и их смеси была установлена и в экспериментах на резуске, при индукции мутационного процесса МННГ (табл. 2). Согласно литературным

Таблица 1

Влияние экстрактов (ЭКХ, ЭВИ, ЭПК, СЭ) и пероксидазы (П) на индуцированные МННГ (3 мМ) aberrации хромосом в клетках меристемы корешков *Vicia faba*

Вариант опыта	Изучено клеток	Аберрации хромосом, %		t ₀	ФЭА
		n	M ± m		
0 (контроль)	963	70	7,26 ± 0,83	—	—
МННГ	907	145	15,98 ± 1,21	—	—
МННГ → ЭКХ	950	59	6,21 ± 0,78	6,7	0,61
МННГ → ЭВИ	1211	82	6,77 ± 0,72	6,6	0,57
МННГ → ЭПК	927	69	7,44 ± 0,86	5,7	0,53
МННГ → СЭ	1138	54	4,74 ± 0,62	8,2	0,70
МННГ → П	994	50	5,03 ± 0,69	6,8	0,68

данным [12], частота спонтанного мутационного процесса у этого объекта характеризуется чрезвычайно низким уровнем. Растительные экстракты, их смесь и пероксидаза с высокой эффективностью снижают частоту хлорофильных индуцированных МННГ мутаций в недозревших стручках арабидопсиса. Результаты сравнительной оценки эффективности изученных растительных экстрактов, их смеси и пероксидазы показали, что и в этих экспериментах эффективность смеси превышает эффективность антимутагенного действия составляющих ее компонентов и пероксидазы (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о способности изученных препаратов предотвращать мутационный процесс, связанный с повреждением структуры ДНК. Известно, что

в результате действия МННГ 85 % всех индуцированных повреждений ДНК составляют метилированные основания [13]. Исходя из полученных данных, можно предположить, что одним из механизмов генозащитного действия изученных в работе растительных экстрактов, их смеси и пероксидазы может быть предотвращение мутационного процесса, связанного с заменой пар оснований.

В числе средовых мутагенов определенное место занимают фтористые соединения. С одной стороны, они широко используются в качестве добавок к зубным пастам, с другой — являются одними из загрязнителей среды на предприятиях цветной металлургии. При интоксикации фтором нарушаются различные звенья противooksидлительной защиты, в част-

Таблица 2

Анализ частоты хлорофильных мутаций, индуцированных МННГ(1 мМ) у *Arabidopsis thaliana* и их модификация ЭКХ, ЭВИ, ЭПК, СЭ и П (0,01 мкг/мл)

Вариант опыта	Анализировано стручков	Из них измененных		t _d к мутагену	P к мутагену	ФЭА
		n	M ± m			
0 (контроль)	—	—	0,02	—	—	—
МННГ	315	39	12,38 ± 1,86	—	—	—
МННГ+ П	214	9	4,20 ± 1,37	3,7	<0,001	0,66
МННГ + ЭКХ	480	17	3,54 ± 0,84	4,3	<0,001	0,71
МННГ + ЭВИ	348	13	3,73 ± 1,01	4,0	<0,001	0,69
МННГ + ЭПК	320	13	4,06 ± 1,10	3,8	<0,001	0,67
МННГ + СЭ	297	9	3,03 ± 0,99	4,4	<0,001	0,75

Таблица 3

Влияние растительных экстрактов (ЭКХ, ЭПК, ЭВИ, СЭ) и пероксидазы (П) на частоту спонтанных и индуцированных NaF аббераций хромосом в клетках костного мозга крыс

Вариант опыта	Изучено клеток	Абберации хромосом, %		t _d	P	ФЭА
		n	M ± m			
0 (контроль)	2952	57	2,96 ± 0,22	—	—	—
ЭКХ	2010	5	2,93 ± 0,37	—	—	—
ЭПК	1949	56	2,87 ± 0,37	—	—	—
ЭВИ	2119	61	2,87 ± 0,34	—	—	—
СЭ	2010	52	2,58 ± 0,35	—	—	—
П	2000	48	2,40 ± 0,34	1,3	—	0,18
NaF(20 мг F ⁻ /100 г)	2016	164	8,13 ± 0,60	8,0	—	—
ЭКХ + NaF	1844	48	2,60 ± 0,37	7,8	<0,001	0,68
ЭПК + NaF	1350	41	3,03 ± 0,46	7,5	<0,001	0,62
ЭВИ + NaF	1949	56	2,87 ± 0,37	7,4	<0,001	0,64
СЭ + NaF	2164	58	2,15 ± 0,27	9,0	<0,001	0,73
П + NaF	2064	51	2,13 ± 0,29	9,0	<0,001	0,73

ности уменьшается активность каталазы и супероксиддисмутазы в крови и пероксидазы в печени, увеличивается продуцирование супероксид-аниона нейтрофилами, повышается уровень окисленной формы глутатиона и снижается количество аскорбиновой кислоты в крови и печени [14]. Показано, что фтористый натрий нарушает процесс редупликации хромосом и функционирование веретена деления в клетках [4], оказывает ингибирующий эффект на энлазу — ключевой фермент гликолиза. Фтор обладает также мутагенными свойствами. Исходя из этого, были проведены эксперименты, в которых исследовали влияние указанных растительных экстрактов и их смеси на мутационный процесс, индуцированный фтористым натрием в клетках костного мозга крыс. Результаты экспериментов (табл. 3) свидетельствуют о том, что предварительное двухнедельное введение в стандартный рацион питания крыс растительных экстрактов не приводит к проявлению мутагенного и других побочных эффектов. Напротив, в этих вариантах эксперимента наблюдалось снижение уровня частоты спонтанных aberrаций хромосом в клетках интактных животных. Так, двухнедельное введение в стандартный рацион питания животных растительных экстрактов, их смеси и пероксидазы приводит также к снижению индуцированных фтористым натрием aberrаций хромосом. При этом уровень индуцированных aberrаций хромосом снижается более чем на 70 %. Таким образом, сравнительная оценка антимутагенной эффективности изученных экстрактов и их смеси показала, что смесь в предотвращении индуцированной мутабельности проявляет более высокую эффективность. Ранее нами были выявлены протекторные свойства растительных экстрактов из однолетних побегов *Ficus carica* и корней *Armoracia rusticana*, их способность ингибировать спонтанную, а также индуцированную старением и гамма-лучами частоту aberrаций хромосом в различных тест-системах: на луке, пшенице и лабораторных животных — мышах [15, 16]. В настоящем исследовании установлена антимутагенная активность этих растительных экстрактов и их смеси на конских бобах, арабидопсисе и лабораторных животных — крысах. Антимутагенная активность раститель-

ных экстрактов и их смеси, установленная при индукции мутаций химическими мутагенами разного типа действия, носит неспецифический характер, проявляясь независимо от типа действия химических мутагенов.

Таким образом, в результате комплексной оценки генетической активности исследуемых в работе экстрактов и их смеси установлена их высокая антимутагенная эффективность, универсальность действия, подтвержденная в экспериментах с использованием различных объектов (растения, животные) и методов исследования (цитогенетические, генетические).

Выводы. Впервые установлена антимутагенная активность растительных экстрактов, полученных из корней *Armoracia rusticana*, однолетних побегов *Ficus carica*, проростков *Zea mays* и смешанного препарата на различных тест-системах — конских бобах, арабидопсисе, лабораторных крысах. Сравнительная оценка антимутагенной эффективности растительных антимутагенов и смешанного препарата выявила более высокую эффективность генозащитного действия последнего. Введение в рацион питания лабораторных животных растительных экстрактов и их смеси приводит к снижению на 70—75 % индуцированных промышленным генотоксикантом (фтористый натрий) aberrаций хромосом в клетках костного мозга крыс.

SUMMARY. Antimutagenic action of plant extracts of *Armoracia rusticana*, *Ficus carica*, *Zea mays* and their mixture on environmental xenobiotics has been investigated. The plant extracts and their mixture decreased the level of mutations induced by N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) in *Vicia faba* cells, chlorophyll mutations in *Arabidopsis thaliana* and NaF induced mutability in rat marrow cells. The studied plant extracts and their mixture demonstrate the ability to decrease the genotoxicity of environmental mutagens.

РЕЗЮМЕ. Встановлено антимутагенну активність рослинних екстрактів з *Armoracia rusticana*, *Ficus carica*, *Zea mays* і їх суміші при впливі на генетичні структури еукаріот середовищних ксенобіотиків. Виявлено їх здатність запобігати мутагенному ефекту N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину, що індукує aberrації хромосом в клітинах *Vicia faba*, ядерні хлорофільні мутації в *Arabidopsis thaliana*, а також фтористого натрію в клітинах кісткового мозку шурів. Отримані експериментальні дані показують, що рослинні екстракти та їх суміші можуть бути використані для контролю рівня модуляцій, індукованих мутагенами оточуючого середовища.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Levi F., Lucchini F., Negri E.M. et al.* The decline in cancer mortality in the European Union, 1988–1996 // *Eur. J. Cancer.* — 2000. — **36**. — P. 1965–1968.
2. *Weisburger J.H.* Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms // *Eur. J. Cancer Prevent.* — 2002. — 11, Suppl 2. — S1–S7.
3. *Alekperov U.K.* Compositional antimutagens as inhibitors of generational and regulational damages induced by multiple genotoxicants // *Bull. Genet. Soc. Canada.* — 1994. — **25**. — P. 54–55.
4. *Агабейли Р.А.* Антиоксиданты и антиоксидантные ферменты в регуляции мутационного процесса. — Баку: Элм, 1989. — 111 с.
5. *Agabeyli R.A., Iskenderova I.M.* Genotoxicity of poliene antibiotics in different test-systems and its modification // *J. Drug Metabol. Rev.* — 2001. — **33**. — P. 232.
6. *Агабейли Р.А., Касимова Т.Э.* Композиционный препарат, обладающий генозащитными свойствами: Патент № (21) а 2003 0139 (22) 25.06.2003 (71) (72) (AZ) // Промышленная собственность. — Баку, 2004. — № 2. — С. 54.
7. *Muller H.J.* Embryonen test zum Nachweis rezessiver letalfaktorem bei *Arabidopsis thaliana* // *Biol. Zbl.* — 1963. — **82**. — P. 133.
8. *Agabeyli R.A., Melikova N.K.* To the problem of enzymatic regulation of plant mutation process // *Mutat. Res.* — 1982. — **97**, № 3. — P. 163–164.
9. *Муравьев И.А.* Технология лекарств. — М.: Медицина, 1971. — С. 143–224.
10. *Алекперов У.К.* Антимутагенез: теоретические и практические аспекты. — М.: Наука, 1984. — 143 с.
11. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 350 с.
12. *Redei G.P.* Mutagen assay with *Arabidopsis* a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox-Program // *Mutat. Res.* — 1982. — **99**, № 2. — P. 243–255.
13. *Тарасов В.А.* Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. — М.: Наука, 1982. — 275 с.
14. *Цебюжинский О.И., Потяженко М.М., Малич В.И.* Экспериментальные и клинические исследования при интоксикации фтором // Биофизические и физико-химические исследования в витаминологии. — М.: Наука, 1981. — С. 74–76.
15. *Agabeyli R., Gasimova T.* *Armoracia rusticana* L., *Ficus carica* hulasalarin ve peroksidazin antimutagen aktivligi. — XVI. Ulusal bioloji kongesi. 4–7 Eylul 2002. — Malatya, 2002. — P. 98.
16. *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 // Материалы 3-го Конгресса радиационных исследований (радиобиология и радиэкология). — Киев, 2003. — С. 85.

Поступила 06.08.04