

Защита нормальных и опухолевых клеток человека от действия алкилирующего агента с помощью фракций, выделенных из экстракта *Sambucus nigra*

Л. Л. Лукаш, Е. В. Костецкая, Е. М. Сухорада, В. Г. Манько,
В. В. Лыло, Т. А. Рубан, А. А. Евсеенко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

После комплексной обработки нормальных и опухолевых клеток человека алкилирующим агентом MNNG и фракциями, выделенными из экстракта лекарственного растения бузины черной (S. nigra), наблюдалось изменение выживания клеток в зависимости от экспериментальных условий. Во всех случаях при десятикратном разведении исходного экстракта и каждой из индивидуальных фракций и концентрациях мутагена 4 и 6 мкМ показано значительное снижение выживания исследуемых клеток. Протекторный или антитоксический эффект проявлялся при стократном и больших разведениях как исходного экстракта, так и целого ряда индивидуальных фракций. При этом выживание клеток повышалось до контрольного уровня. Отмечены различия в ответе нормальных и опухолевых клеток на комплексную обработку.

Введение. В связи с возрастанием мутационного давления на природные популяции поиск антиму-тагенных препаратов, защищающих наследственный аппарат человека, становится весьма актуальным. Особое значение приобретают подбор наиболее эффективных и безвредных для человека средств защиты организма и изучение механизмов их действия в модельных системах. В последнее время все больше внимания привлекают антиму-тагены, имеющие природное происхождение [1—5]. Это, прежде всего, такие известные соединения, присутствующие в растительном сырье и употребляемые человеком в пищу, как витамины, пигменты, аминокислоты, фенолы и полифенолы. Они содержатся в разных концентрациях в овощах, фруктах, травах. Появились единичные сведения об антиму-тагенном действии углеводсодержащих белков растительного происхождения [3, 6].

Задачи данного исследования состояли в 1) изучении возможности снижения цитотоксического

действия N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (MNNG) с помощью предварительной обработки клеток исходным экстрактом и индивидуальными фракциями экстракта лекарственного растения, полученными с помощью изоэлектрофокусирования; 2) сравнении чувствительности нормальных и трансформированных клеток человека к комплексной обработке.

Алкилирующий агент MNNG использовали потому, что в ранее проведенных экспериментах была четко показана корреляция его цитотоксического и мутагенного действия [7]. Это позволяло по снижению цитотоксического действия этого мутагена косвенно судить о возможном антиму-тагенном эффекте исследуемых экстрактов.

Материалы и методы. В работе использованы две линии опухолевых клеток человека HeLa и Нер-2, а также первичные фибробласты эмбриона человека (FEN), полученные по стандартной методике [8]. Миникультуры клеток культивировали на стандартных 96-луночных планшетах в среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и канамицина.

© Л. Л. ЛУКАШ, Е. В. КОСТЕЦКАЯ, Е. М. СУХОРАДА,
В. Г. МАНЬКО, В. В. ЛЫЛО, Т. А. РУБАН, А. А. ЕВСЕЕНКО,
1997

Биологически активные вещества из высушенного сырья, соцветий бузины черной (*S. nigra*), экстрагировали в физиологическом растворе. Для этого соцветия бузины черной настаивали в течение 1,5 ч в 0,9 %-м растворе NaCl, фильтровали и центрифугировали при 5000 об/мин. Полученные растворы фракционировали на установке для электрофореза на установке для электрофореза [9]. В каждой фракции присутствовали соединения, изоэлектрическая точка которых равна значению pH для данной фракции. Исходный экстракт (№ 1) и индивидуальные фракции (№№ 2—19) добавляли в культуру в последовательных разведениях от 10^{-1} до 10^{-7} за 2 ч до обработки клеток мутагеном. Они присутствовали в среде во время экспозиции клеток с мутагеном (1 ч). Всего были поставлены три повторности. В каждом варианте исследовали по 2—4 миникультуры.

Алкилирующий агент MNNG использовали в концентрациях от 2 до 200 мкМ. Обработка клеток MNNG описана ранее [7]. После комплексной обработки миникультуры клеток отмывали средой Игла и культивировали в стандартной ростовой среде.

Ранее нами был разработан подход для определения цитотоксичности химических и биологических препаратов, объединяющий оценку качества и количества клеток после обработки [10]. Визуальный контроль клеточных миникультур позволяет выявить специфические и патологические изменения морфологии клеток, проследить за развитием их в динамике и выбрать оптимальное время для остановки эксперимента. Специальное окрашивание обработанных клеточных миникультур с последующим измерением оптической плотности поглощенного гистологического красителя позволяет сделать вывод об изменении количества клеток. Комплексный подход двойной оценки даст возможность обнаружить артефакты, которые имеют место при окрашивании клеток, обработанных лекарственными препаратами или экстрактами лекарственного происхождения. На основе этой разработки был создан тест для оценки антиоксидантного действия химических и биологических факторов. Выживание клеток оценивали в процентах по отношению к контролю (100 %). Перспективными в смысле протекторного действия считали те индивидуальные фракции экстракта, которые повышали выживание клеток до контрольного уровня.

Результаты и обсуждение Все исследованные фракции экстракта бузины черной проявляли цитотоксичность в разведении 10^{-1} , но в последующих разведениях не наблюдалось сколько-нибудь существенного снижения выживания клеток.

Цитотоксическое действие MNNG отмечалось в широком диапазоне доз (от 200 до 4 мкМ) и проявлялось как в ухудшении качества, так и в уменьшении количества клеток при фиксации их на 4-е сут после комплексной обработки. Ранее было показано, что цитотоксическое действие MNNG коррелирует с его мутагенным эффектом в диапазоне доз 2—6 мкМ [7].

После комплексной обработки клеток Нер-2 фракциями экстракта и MNNG наблюдалось изменение выживания клеток как в сторону повышения, так и понижения в зависимости от условий обработки. При использовании мутагена в концентрации 4 мкМ и всех исследуемых препаратов в разведении 10^{-1} выживание клеток снижалось ниже уровня, установленного для действия мутагена. А при разведениях 10^{-2} и 10^{-3} отмечена общая для всех фракций тенденция к повышению показателя выживания. Это проявлялось как в улучшении качества, так и увеличении количества клеток (таблица). Эффективные в смысле протекторного действия фракции локализовались в диапазонах pH: 0,8—0,9 (№ 2 и № 3), 1,9—2,4 (№ 7 и № 8), 4,8—12,8 (№№ 12—19). Наибольшее повышение выживания клеток (до 147 %) наблюдалось при использовании фракции № 17. Возможно, в этом случае проявлялась митогенная активность. Следует отметить, что фракции №№ 17—19 обогащены лектином, который, как показано нами ранее, способен защищать клетки млекопитающих от мутагенного действия MNNG [6].

В последующих экспериментах использовали исходный экстракт со значением pH 5,2 и фракции № 13 (pH 5,0) и № 17 (pH 8,8). При большей концентрации мутагена (6 мкМ) повышение жизнеспособности клеток всех исследованных линий (Нер-2, HeLa и FEN) до контрольного уровня наблюдалось при действии фракции № 17 в разведении 10^{-2} (рис. 1—3). По-видимому, протекторное действие в данных случаях осуществляется по одному и тому же пути. Можно предположить, что антиоксидантный фактор (или факторы) вступает во взаимодействие с мутагеном или активирует репаративные системы в опухолевых и нормальных клетках.

В случае нормальных клеток человека довольно эффективным протектором была фракция № 13 (рис. 1). В присутствии этой фракции экстракта выживание обработанных клеток приближалось к уровню контроля при разведениях 10^{-2} , а также при 10^{-4} — 10^{-7} . На клетках Нер-2 и HeLa, наоборот, наблюдалось снижение выживания ниже уровня, установленного для MNNG при использовании фракции № 13 в разведениях 10^{-2} и 10^{-3} , хотя в

Изучение влияния различных фракций экстракта соцветий бузины черной на цитотоксический эффект MNNG в концентрации 4 мкМ

| № фракции | рН | Жизнеспособные клетки в опыте по отношению к контролю, % | | | | |
|-----------|------|--|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | MNNG без фракций | MNNG и фракции в разведениях | | | |
| | | | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} |
| 1 | 5,2 | 78,41 | 26,66 | 107,42 | 105,07 | 97,23 |
| 2 | 0,8 | — | 24,31 | 101,93 | 116,05* | — |
| 3 | 0,9 | — | 29,79 | 35,28 | 104,28 | — |
| 4 | 1,0 | — | 26,66 | 89,39 | 98,80 | — |
| 5 | 1,2 | — | 29,79 | 94,88 | 90,17 | — |
| 6 | 1,4 | — | 36,07 | 94,88 | 93,31 | — |
| 7 | 1,9 | — | 36,85 | 115,26 | 93,31 | — |
| 8 | 2,4 | — | 31,36 | 115,26 | 89,39 | — |
| 9 | 2,8 | — | 28,23 | 88,60 | 88,60 | — |
| 10 | 3,4 | — | 24,31 | 94,09 | 86,25 | — |
| 11 | 4,2 | — | 27,44 | 87,03 | 90,17 | — |
| 12 | 4,8 | — | 32,93 | 104,28 | 87,82 | — |
| 13 | 5,0 | — | 24,31 | 108,20 | 95,66 | — |
| 14 | 5,8 | — | 21,95 | 116,05 | 118,40* | — |
| 15 | 6,4 | — | 20,39 | 126,24* | 123,89* | — |
| 16 | 7,1 | — | 18,23 | 106,64* | 123,10* | — |
| 17 | 8,8 | — | 21,95 | 147,41* | 132,51* | — |
| 18 | 12,0 | — | 18,82 | 97,23 | 103,50 | — |
| 19 | 12,8 | — | 18,03 | 134,08* | 96,44 | — |

Примечание. Использовали клетки Нер-2. Количество клеток определяли по оптической плотности красителя, поглощенного жизнеспособными клетками; *статистически достоверное превышение по отношению к MNNG по критерию Вилкоксона.

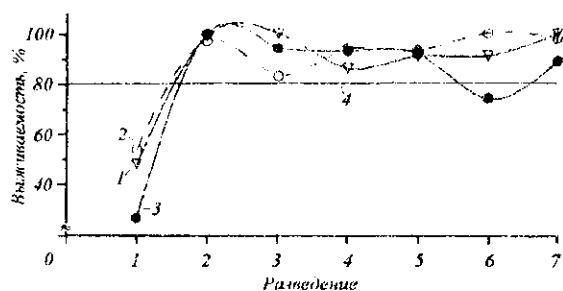


Рис. 1. Выживание первичных фибробластов эмбриона человека после обработки фракциями экстракта №№ 1 (1), 13 (2), 17 (3) и MNNG (4) (концентрация 6 мкМ)

случае HeLa при большом разведении этого препарата (10^6) выживание повышалось до 96 % (рис. 2—3).

В общем картина изменения выживания клеток под влиянием фракций экстракта бузины черной была довольно сложной, что, вероятно, отражает комплексное действие большого количества биологически активных веществ, присутствующих в экстрактах лекарственных растений. Если рассматривать действие различных фракций экстракта в целом, то большинство экспериментальных точек, характеризующих выживание клеток при комплексной обработке, лежало выше уровня, установленного для MNNG (и ближе к контрольному) в случае нормальных клеток человека (т. е. протекторный эффект фракций был выражен наиболее отчетливо). Для опухолевых клеток Нер-2, наобо-

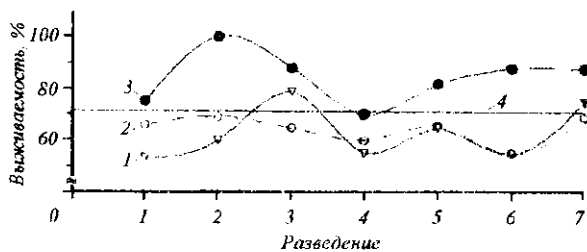


Рис. 2. Вывивание клеток Нер-2 после обработки фракциями экстракта №№ 1 (1), 13 (2), 17 (3) и MNNG (4) (концентрация 6 мкМ)

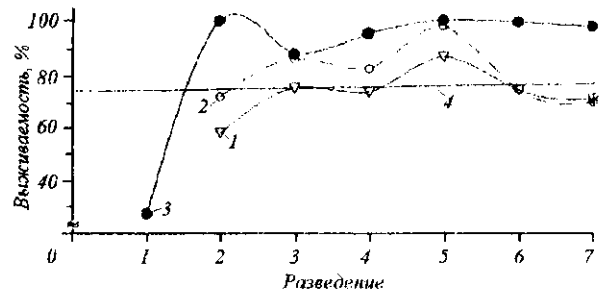


Рис. 3. Вывивание клеток HeLa после обработки фракциями экстракта №№ 1 (1), 13 (2), 17 (3) и MNNG (4) (концентрация 6 мкМ)

рот, большинство экспериментальных точек было ниже уровня выживания, установленного для мутагена, а линия клеток HeLa занимала промежуточное положение. Сравнительные данные выживания клеток после обработки их фракциями экстракта бузины черной и MNNG позволили выявить различную чувствительность исследуемых клеточных линий к комплексной обработке. Различия между клеточными линиями по уровню выживания статистически достоверны при обработке результатов с помощью непараметрического критерия Вилкоксона ($p < 0,01$).

Полученные данные указывают на принципиальную возможность избирательного повышения устойчивости нормальных клеток к действию мутагенов под действием экстрактов лекарственных растений, что важно при использовании токсических препаратов в химиотерапии. Применение подобных протекторов помогло бы снизить токсичность лекарственных препаратов при интенсивной терапии и наличии индивидуальной чувствительности [11].

Лекарственные растения издавна используются для лечения и профилактики практически всех заболеваний человека. Фитопрепараты имеют то существенное преимущество, что при их употреблении в организм поступает целый комплекс лекарственных соединений, действующих более мягко, а часто и более эффективно, чем синтетические аналоги [4].

Разработка антимутагенных препаратов на основе лекарственных растений представляется перспективным направлением. Использование экстрактов лекарственных растений в качестве протекторов *a priori* оправданно благодаря наличию в них целого ряда установленных биологически активных веществ, оказывающих антимутагенное или усили-

вающих антимутагенное действие других соединений, а именно: пектинов, витаминов, микроэлементов, хлорофилла, лектинов и др. [1—6].

Таким образом, в данной работе показана возможность протекторного действия исходного экстракта и индивидуальных фракций экстракта лекарственного растения *S. nigra* в отношении алкилирующего агента MNNG. Не только лектин-содержащие, но и другие индивидуальные фракции экстракта, полученные с помощью изоэлектрофокусирования, дают антитоксический эффект. При этом на клетки могут действовать различные биологически активные вещества или их комплексы. При сравнении ответа на комплексное воздействие нормальных и опухолевых клеток человека показано, что первые более эффективно реагируют на протекторное действие исходного экстракта и индивидуальных фракций, что, вероятно, связано с наличием у них более мощных защитных механизмов.

Л. Л. Лукаш, К. В. Костецька, О. М. Сухорада, В. В. Лило, В. Г. Манько, Т. П. Рубан, А. О. Євсєєнко

Захист нормальних і злоякісних клітин людини від дії алкілюючого агента за допомогою фракцій, отриманих з екстракту *Sambucus nigra*

Резюме

Після комплексної обробки нормальних і злоякісних клітин людини алкілюючим агентом MNNG і фракціями, які виділені з екстракту лікарської рослини бузины чорної (*S. nigra*), спостерігали зміни у виживанні клітин в залежності від експериментальних умов. У всіх випадках при десятикратному розведенні вихідного екстракту і кожної з індивідуальних фракцій і концентраціях мутагена 4 і 6 мкМ показано значне зниження виживання дослідних клітин. Протекторний або антитоксичний ефект проявлявся при стократному і більших

розведеннях як вихідного екстракту, так і цілого ряду індивідуальних фракцій. При цьому виживання клітин підвищувалося до контрольного рівня. Спостерігалися відмінності у відповіді нормальних і злоякісних клітин на комплексну обробку.

L. L. Lukash, K. V. Kostetskaya, Ye. M. Sukhorada, V. V. Lylo, V. G. Manko, T. A. Ruban, A. A. Evseenko

Protection of normal and tumor cells of human against MNNG action with a help of fraction isolated from the extract of *Sambucus nigra*

Summary

After the complex treatment of normal and tumor cell of human with the alkylating agent (MNNG) and the fractions extracted from medical herb *S. nigra* cellular viability was changed depending on the experimental conditions. In all cases under tenfold dilution of the source extract and each of the individual fractions and mutagen's concentrations 4–6 μM significant decreasing of the viability of studied cells has been observed. Protection or antitoxic effect has been revealed under hundredfold and bigger diluting both the source solution and a number of the individual fractions. At these conditions cellular viability was increased up to the control level and different respond of normal and tumor cells on complex treatment was registered.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Фармакологические проблемы поиска и применения антимуутагенов // Вестн. РАМН.—1993.—№ 1.—С. 19—25.
2. Бариляк И. Р., Исаяева А. В. Антимуутагенные и генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения // Цитология и генетика.—1994.—28, № 3.—С. 30—17.
3. Кужир Т. Д., Гончарова Р. И. Механизмы ингибирующего действия производных 1,4-дигидроизоизоникотиновой кислоты при химическом мутагенезе // Вестн. РАМН.—1995.—№ 1.—С. 20—29.
4. Салихова Р. А., Порошенко Г. Г. Антимуутагенные свойства дудника лекарственного // Там же.—С. 58—61.
5. Пентюк А. А., Дурнев А. Д., Матвийчук Н. В. и др. Витамин А и ферментативные системы метаболической активации генотоксических веществ // Там же.—1997.—№ 1.—С. 3—9.
6. Лукаш Л. Л., Карлова І. С., Мірошніченко О. С. та ін. Вивчення антимуутагенної дії лектину суцвіття бузини чорної в культурі клітин ссавців // Матеріали з'їзду мед. генетиків України (Львів, 18—20 жовтня 1995 року).—Львів, 1995.—С. 96.
7. Lukash L. L., Boldt I., Pegg A. E. et al. Effect of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitrosoguanidine in the *hprt* gene of diploid human fibroblasts // Mutat. Res.—1991.—250.—P. 379—409.
8. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования.—М., 1982.—С. 104—108.
9. Лыло В. В., Манько В. Г., Ображей Е. В. и др. Применение метода автофокусирования при изучении водных экстрактов лекарственных растений // Докілля та здоров'я.—1997.—№ 4.—(В печати).
10. Лукаш Л. Л., Патон Е. Б., Сухорада Е. М. и др. Комплексный метод оценки цитотоксичности препаратов с антиканцерогенным действием в культурах клеток человека // Цитология и генетика.—1997.—№ 6.—(В печати).
11. Алекперов У. К. Антимуутагенез.—М.: Наука, 1984.—100 с.

Поступила в редакцию 25.03.97