

ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

*На правах рукописи*



ФАТЫХОВА ДИАНА ГАЗИНУРОВНА

**АНТИМУТАГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БИОКОМПЛЕКСОВ  
РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В МИКРОБНЫХ  
ТЕСТ-СИСТЕМАХ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2012

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета  
ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор  
академик АН РТ  
**Ильинская Ольга Николаевна**

Официальные оппоненты: Доктор ветеринарных наук, профессор  
**Госманов Рауис Госманович**

Кандидат биологических наук, доцент  
**Кипенская Лариса Викторовна**

Ведущая организация: Институт биологии Уфимского научного центра РАН,  
г. Уфа

Защита диссертации состоится «22» февраля 2012 г. в 13-00 часов на заседании  
диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,  
главное здание, ауд. 211.

Факс 8(843)238-71-21, 233-78-40. E-mail: [fadi@bk.ru](mailto:fadi@bk.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского  
Казанского федерального университета

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » января 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



З. И. Абрамова

**Актуальность.** В настоящее время в биосфере идёт прогрессивное накопление химических соединений антропогенного происхождения, многие из которых обладают мутагенными свойствами. Известно, что химические вещества могут индуцировать генные, хромосомные и геномные мутации, обладая высокой специфичностью действия [Болтина, 2009]. Поэтому поиск антимутагенов – веществ, защищающих генетический аппарат соматических и половых клеток человека от повреждения – является необходимым. Открытие новых веществ, снижающих частоту индуцированных мутаций, быстро растёт, и к настоящему времени насчитывается более 300 природных и синтетических антимутагенных соединений: витаминов, аминокислот, естественных метаболитов, пищевых добавок, лекарств и некоторых других соединений органической и неорганической природы [Бентхен, 1986; Arriaga-Alba, 2000].

Особую актуальность и значимость приобретает проведение профилактики мутагенеза на основе применения природных соединений растительного и животного происхождения. В последние годы возрос интерес к исследованию антимутагенной активности растительных и животных компонентов в свете возможности использования их для профилактики и лечения онкологических, а также ряда других заболеваний, сопровождающихся повышенной чувствительностью генома к повреждениям. Растения являются источниками разнообразных биоактивных соединений (витамины, полисахариды, гликопептиды, аминокислоты, сульфиды, сапонины, полифенолы, терпеноиды, изофлавоны, индолы и др.), обладающих антиоксидантными, антимутагенными, антиканцерогенными и иммуномодулирующими свойствами [Santos-Cervantes *et al.*, 2007]. Перспективность использования растительных препаратов в медицине обусловлена также возможной минимизацией их токсических эффектов в млекопитающих, что объясняется сходным химическим составом биологически активных веществ живых организмов, а также определенным сродством метаболизма растительной и животной клетки [Коломиец, Ефимов, 2005]. Биоконплексы животного происхождения также обладают антиоксидантной и иммуностимулирующей активностью, проявляют антисептическое действие и используются в качестве лекарственных средств и биологически активных комплексов. Пчелиная перга обладает выраженными антитоксическими свойствами, способствует повышению содержания в крови эритроцитов, ретикулоцитов и гемоглобина, обеспечивает нормализацию количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы [Хисматуллина, 2005]. Роговое вещество копытных животных издавна является привлекательным материалом как источник биологически активных веществ. Экстракты из рогов сайгака используют для лечения нервных заболеваний, а также как жаропонижающее и гипотензивное средства [Романов, 2005; Романов, Лебедева, 2003]. Однако природа и спектр биологической активности препаратов растительного и животного происхождения изучены недостаточно.

В связи с вышеизложенным **целью** настоящей работы явился сравнительный анализ антимутагенных свойств биоконплексов, полученных из пчел, парнокопытных млекопитающих и растений для оценки потенциала их практического использования.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определить токсические, генотоксические и антимуtagenные эффекты биокомплекса пчелиной перги в бактериальных тест-системах (тест Эймса, SOS-хромотест).
2. Выявить токсические свойства лекарственных соков и экстрактов растений (*Plantago major*, *Tussilago farfara*, *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus*, *Hyssopus officinalis*) по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям.
3. Установить возможность модуляции уровня индуцированных мутаций различными растительными соками и экстрактами (*Aloe arborescens*, *Callisia fragrans*, *Chelidonium majus*, *Plantago major*, *Aegopodium podagraria*, *Tussilago farfara*, *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias fruticosa*, *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus*).
4. Охарактеризовать антимуtagenные свойства экстрактов рогов сайгака *Saiga tatarica* L. до и после периода гона животных.
5. Проанализировать антимуtagenные эффекты и оценить потенциал практического использования биокомплексов, полученных из пчёл, растений и парнокопытных млекопитающих.

**Научная новизна.** Впервые установлены десмутagenные, биоантимуtagenные и биостимулирующие эффекты биокомплекса пчелиной перги для исследуемых концентраций 1, 10 и 100 мкг/мл в бактериальных тест-системах на штаммах *Salmonella typhimurium* TA100 и *Escherichia coli* PQ37. Для исследуемых соков и экстрактов растений *Callisia fragrans*, *Tussilago farfara*, *Chelidonium majus*, *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus* впервые получены данные об антимуtagenных свойствах, выявленных в различных микробных тест-системах (тест Эймса, SOS-хромотест, Rec тест). Впервые получены свидетельства о наличии десмутagenных эффектов у экстракта рогов сайгака возрастом 19 месяцев до периода гона в отношении известных мутагенов N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (МННГ) и N<sup>4</sup>-аминоцитидина (Ац) в тесте Эймса на штамме *Salmonella typhimurium* TA100. В данной работе исследуемые биокомплексы растительного и животного происхождения впервые предложены к разработке как антимуtagenные препараты.

**Практическая значимость.** Основным практическим достижением настоящей работы является обнаружение и характеристика антимуtagenных эффектов биокомплексов, полученных из пчёл, растений и парнокопытных млекопитающих. Установленные результаты в совокупности с данными, свидетельствующими об отсутствии у исследованных биокомплексов токсических и мутагенных свойств, открывают очевидную перспективу их использования для профилактики индуцированного мутагенеза у человека. Таким образом, биокомплексы растительного и животного происхождения могут быть рекомендованы к разработке как антимуtagenные препараты. Учитывая полученные нами данные уже существующие лекарства и биологически активные добавки, содержащие в своем составе биокомплексы, полученные из пчёл, растений и парнокопытных млекопитающих, также могут рассматриваться в качестве антигенотоксических и генопротекторных препаратов.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Биокomплекс пчелиной перги обладает десмутагенными, биоантимутагенными и биостимулирующими свойствами, снижая частоту индуцированных мутаций на 78%.
2. Из десяти исследуемых растений наибольшей антимутагенной активностью обладали соки *Callisia fragrans*, *Chelidonium majus*, *Tussilago farfara* и экстракты *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias filicifolia*, *Panax japonicus*. Максимальная антимутагенность продемонстрирована для сока чистотела большого (снижение частоты мутаций до 88%).
3. Среди экстрактов рогов сайгака *Saiga tatarica* L., исследуемых в возрасте животных от 19 до 43 месяцев, десмутагенную активность в отношении аналогов азотистых оснований проявил экстракт рогов 19-месячного сайгака до периода гона, уменьшающий мутагенный эффект на 31%.
4. Биокomплексы растительного и животного происхождения являются перспективной основой для разработки антимутагенных препаратов, эффективность которых зависит от физиологических и биохимических характеристик биообъекта.

### **Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование.**

Работа выполнена в соответствии с тематическим планом КФУ, регистрационный номер 01200955076, «Механизмы регуляции функциональной активности клеток» при поддержке АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» (2.1.1/920), государственного контракта №02.740.11.0391, совместного гранта Министерства образования и науки Российской Федерации. Биохимический анализ биокomплекса пчелиной перги проводили на базе института фармакологической аналитики г. Бремен, Германия. Биохимический анализ биокomплекса экстрактов рогов сайгака *Saiga tatarica* L. проводили на базе Калмыцкого государственного университета, г. Элиста. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на 79-ой всероссийской студенческой конференции, (Казань, 2005), XLIII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2005), итоговой конференции КГУ (Казань, 2006), II-ой Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008), Международной конференции "Развитие междисциплинарных исследований: перспективные направления и вклад DAAD" (Казань, 2009), научной школе-конференции XIII симпозиума студентов и аспирантов - биологов Европы «SymBioSE - 2009» (Казань, 2009), Международной научно-практической конференции "Научное обеспечение устойчивого ведения сельскохозяйственного производства в условиях глобального изменения климата" (Казань, 2010), III Всероссийского конгресса с международным участием студентов и аспирантов-биологов "Симбиоз-Россия" (Нижний Новгород, 2010), Всероссийской научно-практической конференции "Инновационные разработки молодых ученых - АПК России" (Казань, 2010), а также на Первой Всероссийской молодёжной научной конференции "Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии" (Томск, 2010).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 2 статьи в центральных отечественных рецензируемых журналах: Экологическая генетика; Ученые записки Казанского университета. Секция Естественные науки.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, включает 10 таблиц, 28 рисунков. Библиография содержит 133 наименований, в т.ч. 57 - зарубежных авторов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1.1. Тестерные штаммы

Бактериальные штаммы, использованные в работе, перечислены в таблице 1.

Таблица 1.

Тестерные штаммы бактерий

№	Штамм	Генотип	Источник
1	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	<i>his G46, rfa, uvr, bio, pkm 101</i>	НИИ по БИХС г. Купавна
2	<i>Escherichia coli</i> PQ37	<i>sfi A: :mud (Ap lac) cts, lac A U169, mal<sup>+</sup>, uvr A, gal Y, pho C, rfa</i>	Институт общей генетики, г. Москва
3.	<i>Micrococcus luteus</i>	дикий тип	Коллекция кафедры микробиологии КГУ
4.	<i>Escherichia coli</i> WP2	<i>trpE65</i>	НИИ экологии микроорганизмов УНЦ РАН, г. Пермь
5.	<i>Escherichia coli</i> polA	<i>trpE65, sul, malB, polA</i>	НИИ экологии микроорганизмов УНЦ РАН, г. Пермь
6.	<i>Escherichia coli</i> uvrA	<i>trpE65, sul, uvrA155</i>	НИИ экологии микроорганизмов УНЦ РАН, г. Пермь
7.	<i>Escherichia coli</i> recA	<i>trpE65, recA</i>	НИИ экологии микроорганизмов УНЦ РАН, г. Пермь

### 1.2. Биологические объекты

**1.2.1. Растительный материал.** В работе использованы соки лекарственных растений алоэ древовидного (*Aloe arborescens*), золотого уса (*Callisia fragrans*), чистотела большого (*Chelidonium majus*), подорожника большого (*Plantago major*), мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilago farfara*), сныти обыкновенной (*Aegopodium podagraria*) и экстракты диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea*), полисциаса кустарникового (*Polyscias fruticosa*), полисциаса папоротниколистного (*Polyscias filicifolia*), женьшеня японского (*Panax japonicus*), любезно предоставленные доцентом кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета Абдрахимовой Й.Р. Перед исследованием соки растений разводили стерильной дистиллированной водой до концентрации 1:10 и 1:100. Экстракты исследуемых растений разводили в стерильной дистиллированной воде до концентраций 1; 0.1 и 0.01 мг/мл.

**1.2.2. Экстракты рогов сайгака *Saiga tatarica* L.** В работе использовали экстракты, полученные из рогов сайгаков, любезно предоставленные Романовым

Олегом Ермолаевичем, к.х.н., доцентом кафедры химии Калмыцкого госуниверситета. Оценивали антимутагенную активность следующих биоконплексов животного происхождения: 1.7ДГВ – экстракт верхней трети рогов сайгака, отобранных у животных возрастом 1 год и 7 месяцев до гона; 3.7ДГВ – экстракт верхней трети рогов сайгака, отобранных у животных возрастом 3 год и 7 месяцев до гона; 1.7ПГВ - экстракт верхней трети рогов сайгака, отобранных у животных возрастом 1 год и 7 месяцев после гона.

1.2.3. *Приготовление образцов пчелиной перги.* Образцы биоконплекса пчелиной перги были любезно предоставлены ООО "АНТ". Образцы разводили в стерильной дистиллированной воде. В работе были исследованы следующие концентрации 1; 10; 100; 1000 мкг/мл.

### **1.3. Бактериальные тест-системы для определения токсических и мутагенных эффектов соединений природного происхождения**

1.3.1. *Тест на токсичность по отношению к грамотрицательным и грамположительным микроорганизмам.* О силе токсического действия исследуемых биоконплексов судили по выживаемости тестерных штаммов. В тесте использовали штамм *Salmonella typhimurium* TA100 и *Micrococcus luteus*. Согласно рекомендациям по проведению теста Эймса максимальная доза исследуемых соединений не должна подавлять рост тестерных бактерий более чем на 50% [Дурнев с соавт., 2003].

1.3.2. *Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса).* Мутагенную активность учитывали по кратности превышения числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования [Maron, Ames, 1983]. Для исключения артефактов в тесте Эймса в образцах определяли количественное содержание гистидина по методу, разработанному Ильинской и др. [Ильинская с соавт., 2001].

1.3.3. *SOS-хромотест.* Проведение эксперимента и приготовление сред вели по методике, описанной в работе Миллера [Миллер, 1976] и Килардые [Quillardet *et al.*, 1982]. Фактор индукции SOS–ответа (IF) исследуемого вещества определяли по соотношению активности конститутивной щелочной фосфатазы и индуцибельной  $\beta$ -галактозидазы. Если  $IF < 2$  - вещество негенотоксично,  $IF > 2$  – вещество генотоксично [Mersch-Sundermann *et al.*, 1991; Bouhlef *et al.*, 2007].

### **1.4. Бактериальные тест-системы для определения антимутагенных эффектов соединений природного происхождения**

1.4.1. *Модификации теста Эймса.* Для изучения антимутагенных свойств соединений растительного и животного происхождения использовали модификации теста Эймса: 1. Тестерные бактерии предварительно инкубировали с разными концентрациями биоконплексов в течение 2 часов, а затем в верхний агар добавляли один из мутагенов для оценки биоантимутагенного эффекта. 2. Исследуемые концентрации биоконплексов и один из мутагенов добавляли непосредственно в верхний агар без предварительной инкубации с тестерным штаммом для оценки возможных десмутагенных свойств. Антимутагенный эффект исследуемого соединения оценивали, сравнивая число колоний прототрофов, индуцированных мутагеном без обработки клеток раствором исследуемых соединений, и после преинкубации клеток с раствором и мутагеном. Согласно Negi [Negi *et al.*, 2003] ингибирование мутагенного эффекта менее чем на 25% свидетельствует о слабой, от 25% до 40% о средней, выше 40% - о сильном антимутагенном эффекте.

1.4.2. *Модификации SOS-хромотеста.* 1. Клетки *E. coli* PQ37 были обработаны исследуемыми биоконplexами в течение 2 часов с последующим добавлением мутагена для исследования на биоантимутагенную активность. 2. Исследуемые биоконplexы и мутаген были одновременно добавлены к культуре клеток *E. coli* PQ37. Антигенотоксический эффект растительных соков в SOS-хромотесте оценивали согласно формуле [Bouhleb *et al.*, 2007]: сравнивали фактор индукции SOS-ответа в присутствии мутагена и исследуемых образцов, и фактор индукции SOS-ответа при действии только мутагена.

1.4.3. *Res тест.* На чашки Петри с полноценной агаризованной средой засеивали газон культуры тестерных бактерий. В середину чашки на поверхность газона помещали стерильный бумажный диск (d = 2 см). Для оценки десмутагенного действия на диски одновременно наносили мутаген и исследуемые образцы в различных разведениях. Чашки Петри инкубировали 24 часа при температуре 37°C. Антигенотоксический эффект оценивали, сравнивая размеры зон ингибирования роста штамма вокруг диска при совместном действии мутагена и исследуемых биоконplexов и при действии только мутагена.

## 1.5. Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили в стандартной компьютерной программе Microsoft Office Excel 2007. Данные представлены в виде среднего значения,  $\pm$  среднее квадратическое отклонение. Для оценки достоверности различий между результатами в вариантах опыта использовали t-критерий Стьюдента для множественных сравнений. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был принят за  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Антимутагенные эффекты биоконplexа, полученного из пчел

Перед исследованием антимутагенных свойств биоконplexов растительного и животного происхождения нами была проведена оценка токсического эффекта образцов биоконplexов в отношении тестерных бактерий, а также генотоксического потенциала образцов в бактериальных тест-системах.

#### 2.1.1. Токсический эффект пчелиной перги по отношению к тестерному штамму *Salmonella typhimurium* TA100

Во всех исследованных концентрациях процент выживаемости тестерного штамма составил более 100% (табл.2). Полученные данные свидетельствуют о том, что биоконplex, полученный из пчел, не только не проявил токсических эффектов на штамме *S. typhimurium* TA100 в исследованном спектре концентраций, но и стимулировал рост бактерий.

Таблица 2.

Влияние пчелиной перги на рост штамма *S. typhimurium* TA100

Концентрация пчелиной перги, мкг/мл	1	10	100	1000	Контроль
Количество КОЕ на чашку	40 $\pm$ 2	44 $\pm$ 3	41 $\pm$ 1	43 $\pm$ 5	39 $\pm$ 6
Выживаемость, %	102	113	105	110	100

### 2.1.2. Мутагенные и генотоксические эффекты биокомплекса пчелиной перги в тесте Эймса и SOS-хромотесте

При исследовании пчелиной перги в тесте Эймса было показано, что число индуцируемых пчелиной пергой в концентрациях 1, 10, 100, мкг/мл His<sup>+</sup>ревертантов, не превышало спонтанный фон мутирования (рис.1). Так как число колоний-ревертантов в опыте и контроле различаются менее чем в 2.5 раза, то можно считать, что исследованные образцы перги не обладают мутагенной активностью в тесте Эймса. В SOS-хромотесте пчелиная перга ни в одной из исследуемых концентраций не проявила активности и не индуцировала значительный SOS-ответ в клетках тестерного штамма *E. coli* PQ37, что указывает на отсутствие генотоксических свойств исследуемого биокомплекса животного происхождения (рис.2).

Таким образом, на основании результатов, полученных в различных бактериальных тест-системах (тест Эймса, SOS-хромотест), исследованный биокомплекс пчелиной перги можно охарактеризовать как нетоксичный и немутагенный в широком диапазоне концентраций (1-100 мкг/мл).

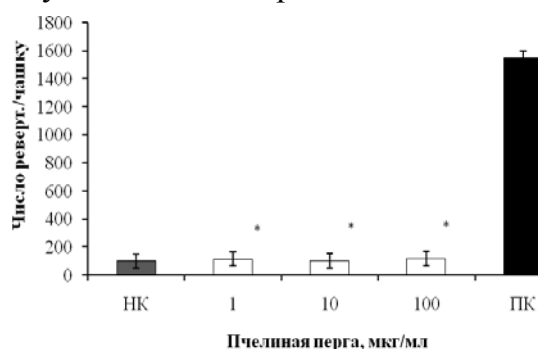


Рис 1. Оценка мутагенного эффекта пчелиной перги в тесте Эймса. ПК - положительный контроль (N-Метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин - МННГ, 50 мкг/мл), НК - негативный контроль (спонтанный фон ревертантов), на данном и последующих рисунках: \* - достоверно отличается от положительного контроля,  $p \leq 0.05$ .

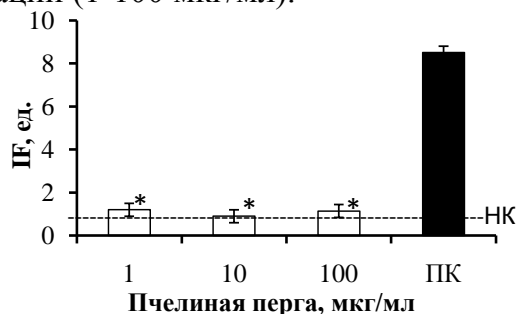
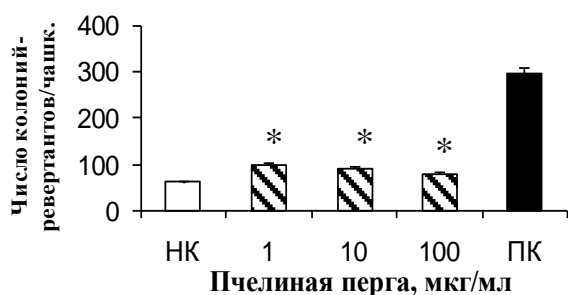


Рис.2. SOS-индуцирующий потенциал пчелиной перги. ПК - положительный контроль: митомицин С (МС) – 100 мкг/мл, НК (пунктирная линия) - негативный контроль (спонтанный фон индукции SOS-ответа).

### 2.1.3. Антимутагенное действие биокомплекса, полученного из пчел, в тесте Эймса

#### А) Биоантимутагенное действие



#### Б) Десмутагенный эффект

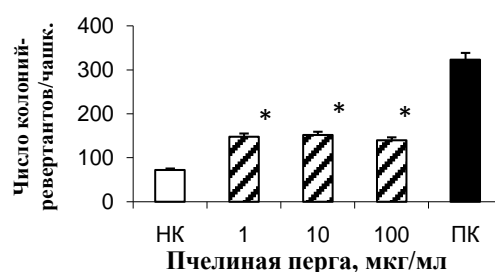


Рис. 3. Влияние пчелиной перги на мутагенную активность МННГ в тесте Эймса: А) вариант предварительной инкубации тестерных бактерий с исследуемым биокомплексом с последующим добавлением МННГ; Б) вариант одновременного действия пчелиной перги и МННГ на клетки тестерных бактерий. ПК - положительный контроль (МННГ, 50 мкг/мл), НК - негативный контроль (спонтанный фон ревертантов).

Биокомплекс, полученный из пчел, обладает статистически достоверным выраженным биоантимутагенным эффектом, снижая число колоний-ревертантов, индуцированных N-Метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (МННГ) на 67-73% (рис.3А). Во второй модификации теста биокомплекс пчелиной перги показал десмутагенную активность, снижая число колоний-ревертантов, индуцированных мутагеном на 55-57% (рис.3Б).

#### 2.1.4. Антигенотоксическое действие пчелиной перги в SOS-хромотесте

В целях определения предположительного механизма антигенотоксических эффектов пчелиной перги SOS-хромотест проводился в различных модификациях (вариантах). Инкубация культуры клеток *E. coli* PQ37 с биокомплексом пчелиной перги в течение 2 ч. приводила к практически полному исчезновению мутагенного действия классического индуктора SOS-ответа клеток митомицина С (МС). Фактор индукции SOS-ответа МС при предварительной инкубации культуры клеток с 100 мкг/мл исследуемого биокомплекса составлял 0.8 ед., в то время как IF для позитивного контроля достигал 4.5 ед. (рис.4А). Результаты экспериментов при одновременном внесении МС и пчелиной перги (рис.4Б) подтверждают наличие у исследуемого биокомплекса десмутагенного эффекта, показанного нами ранее во второй модификации теста Эймса (рис. 3Б). При одновременном добавлении перги и МС к культуре клеток *E. coli* PQ37 наблюдалось статистически достоверное снижение фактора индукции SOS-ответа на 62-68%.

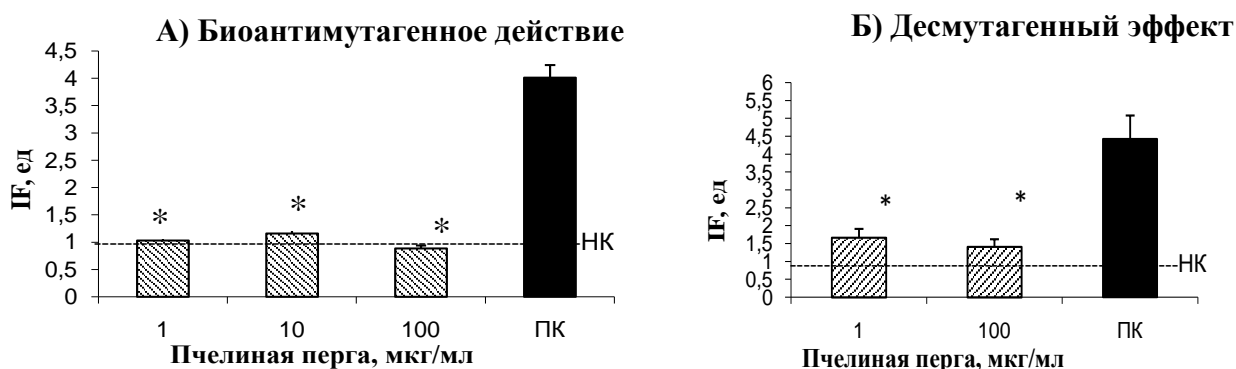


Рис.4. Влияние пчелиной перги на SOS-индуцирующую активность МС: А) вариант предварительной инкубации тестерных бактерий *E. coli* PQ37 с исследуемым биокомплексом с последующим добавлением МС; Б) вариант одновременного действия пчелиной перги и МС на клетки *E. coli* PQ37. ПК - позитивный контроль: митомицин С (МС) – 100 мкг/мл, НК (пунктирная линия) - негативный контроль (спонтанный фон индукции SOS-ответа).

## 2.2. Антимутагенное действие биокомплекса, полученного из парнокопытных млекопитающих

### 2.2.1. Токсическое действие экстрактов рогов сайгака *Saiga tatarica* L.

Выживаемость тестерного штамма *S. typhimurium* TA100 при действии исследуемых экстрактов в концентрациях 10, 100, 500 мкг/чашку лишь незначительно отличалась от такового в контрольном варианте и составила 95 %, 92.5 %, 91 % для 1.7 ДГВ; 97 %, 95%, 93.5 % для 1.7 ПГВ, соответственно, что свидетельствуют о возможности тестирования экстрактов в данных концентрациях на антимутагенную активность в тесте Эймса (рис.5).

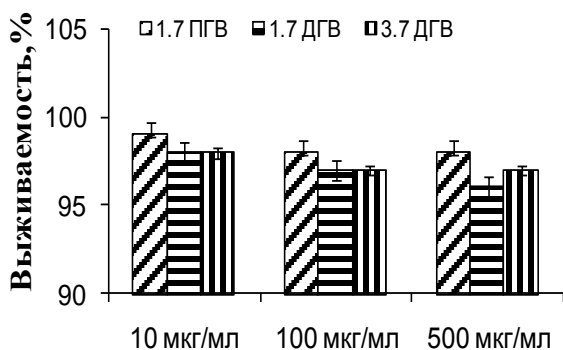


Рис.5. Токсичность экстрактов рогов сайгака *Saiga tatarica* L. в возрасте 19 месяцев до и после периода гона и в возрасте 43 месяцев до периода гона животных по отношению к *Salmonella typhimurium* TA100

### 2.2.2. Биоантимутагенное действие исследуемых экстрактов

Концентрация свободного гистидина в исследованных образцах ниже критической и, следовательно, не может быть причиной артефактов в тесте Эймса. При тестировании экстрактов 1.7 ДГВ и 1.7 ПГВ в тесте Эймса с преинкубацией установлено, что экстракты во всем диапазоне исследованных концентраций ингибируют мутагенный эффект МННГ менее чем на 25 %, что свидетельствует об отсутствии биоантимутагенного эффекта.

### 2.2.4. Десмутагенное действие исследуемых экстрактов

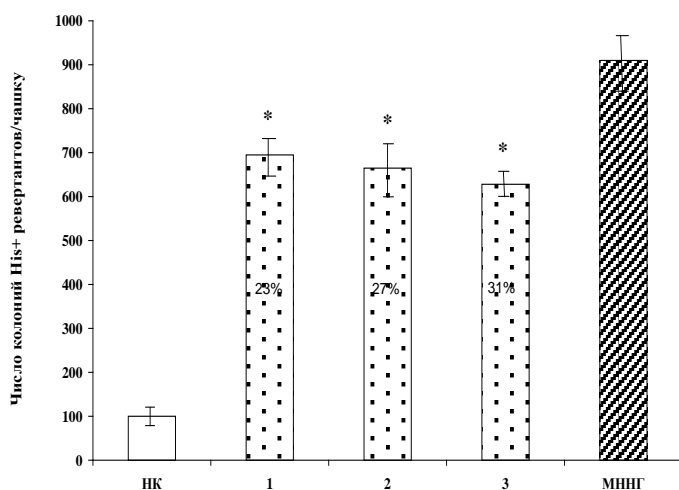


Рис. 6. Десмутагенный эффект экстракта 1.7 ДГВ в отношении МННГ (5 мкг/чашку) в тесте Эймса. НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования). 1 - МННГ+1.7 ДГВ 10 мкг/чашку, 2 - МННГ+1.7 ДГВ 100 мкг/чашку, 3 - МННГ+1.7 ДГВ 500 мкг/чашку. % - Антимутагенный эффект.

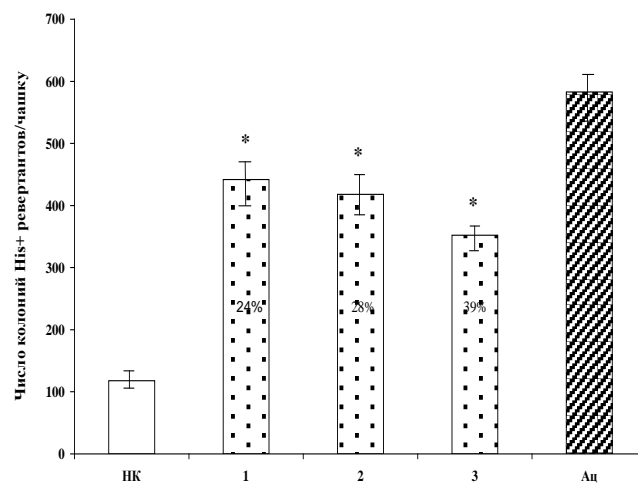


Рис. 7. Десмутагенный эффект экстракта 1.7 ДГВ в отношении Ac (1 мкг/чашку) в тесте Эймса. НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования). 1 - Ac+1.7 ДГВ 10 мкг/чашку, 2 - Ac+1.7 ДГВ 100 мкг/чашку, 3- Ac+1.7 ДГВ 500 мкг/чашку.

Как видно из результатов, представленных на рис. 6, экстракт 1.7 ДГВ статистически достоверно снижает мутагенный эффект МННГ в клетках тестерного штамма *S. typhimurium* TA100 на 23%, 27%, 31 % в концентрации 10 мкг/чашку, 100 мкг/чашку и 500 мкг/чашку соответственно. При совместном действии N<sup>4</sup>-аминоцитидина (Ac) и экстракта 1.7 ДГВ на тестерные бактерии мы также наблюдали заметное уменьшение числа колоний индуцированных мутантов (рис.7). Экстракт 1.7 ДГВ снижает мутагенный эффект Ac в концентрации 10 мкг/чашку на 24%, а в наивысшей из исследованных концентраций 500 мкг/чашку - до 39%. Второй исследованный нами экстракт - 1.7 ПГВ - не оказывал существенного влияния на уровень мутагенеза, индуцированного МННГ и Ac в клетках тестерных

бактерий. Таким образом, анализ полученных результатов показывает, что из двух исследованных экстрактов только экстракт 1.7 ДГВ демонстрирует средний десмутагенный эффект, до 39% снижая мутагенную активность известных мутагенов МННГ и Ац. Следует отметить, что обнаруженный нами эффект носит дозо-зависимый характер.

### 2.3. Антимутагенные эффекты биокомплексов растительных соков и экстрактов

#### 2.3.1. Токсическое действие экстрактов и соков лекарственных растений по отношению к грамотрицательным и грамположительным микроорганизмам

Соки и экстракты биокомплексов растительного происхождения проявили различные эффекты по отношению к штамму *S. typhimurium* TA100. Сок мать-и-мачехи обыкновенной (*T. farfara*) оказал стимулирующее действие на рост бактерий, разница с контролем составила 26.4% (табл. 3). Сок подорожника большого (*P. major*), проявил бактерицидные свойства, выживаемость тестерного штамма сократилась на 30.7%. Экстракты диоскореи дельтовидной (*D. deltoidea*), иссопа лекарственного (*H. officinalis*), женьшеня японского (*P. japonicus*) и полисциаса папоротниколистного (*P. filicifolia*) не оказали значительного влияния на выживаемость тестерного штамма.

Таблица 3.  
Выживаемость штамма *S. typhimurium* TA100 под действием соков и экстрактов лекарственных растений

Вариант	Среднее кол-во колоний/чашку	Выживаемость, %
Контроль	400.25±13.9	100
<i>Plantago major</i>	277.25±15.3	69.3
<i>Dioscorea deltoidea</i>	382±14	95.4
<i>Tussilago farfara</i>	506±8.5	126.4
<i>Polyscias filicifolia</i>	395.5±15.6	98.8
<i>Panax japonicus</i>	404.25±7	100.9
<i>Hyssopus officinalis</i>	422.25±8.6	105.4

Таблица 4.  
Выживаемость *M. luteus* под действием экстрактов и соков лекарственных растений

Вариант	Среднее кол-во колоний/чашку	Выживаемость, %
Контроль	1257.75±31.2	100
<i>Plantago major</i>	1337.5±31.5	106.3
<i>Dioscorea deltoidea</i>	1155.25±17	91.9
<i>Tussilago farfara</i>	1132.75±16.4	90
<i>Polyscias filicifolia</i>	1289.5±13.3	102.4
<i>Panax japonicus</i>	1264.75±20.23	100.5
<i>Hyssopus officinalis</i>	1272.25±22.4	101.2

В результате токсикологического анализа исследуемых соков и экстрактов лекарственных растений на грамположительном штамме *M. luteus* было выявлено, что сок мать–и–мачехи обыкновенной (*T. farfara*) проявил бактерицидные свойства, разница с контролем составила 10% (табл.4). Экстракт диоскореи дельтовидной (*D. deltoidea*) оказал ингибирующее действие на рост бактерий, выживаемость сократилась на 8.1%. Подорожник большой (*P. major*), полисциас папоротниколистный (*P. filicifolia*), иссоп лекарственный (*H. officinalis*) и женьшень японский (*P. japonicus*) не оказали существенного влияния на рост *M. luteus*.

#### 2.3.2. Генотоксические эффекты соков исследуемых растений

Из результатов, представленных на рис.8 видно, что во всех случаях фактор индукции SOS-ответа соков растений алоэ древовидного (*Aloe arborescens*) и золотого уса (*Callisia fragrans*) не превышал 2, что свидетельствует об отсутствии генотоксических эффектов у исследованных биокомплексов.

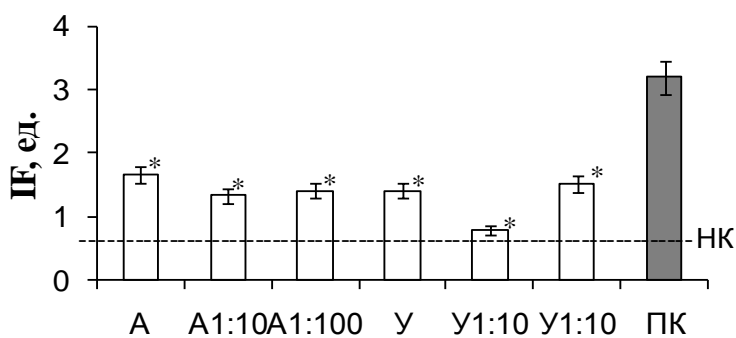


Рис. 8. Оценка генотоксического эффекта соков растений в SOS-хромотесте. ПК - позитивный контроль (налидиксовая кислота - НС, 60 мкг/мл), НК (пунктирная линия) – негативный контроль (спонтанный уровень SOS-ответа), А - сок алоэ древовидного, А1:10, А1:100 – сок алоэ древ. в соответствующих разведениях; У – сок золотого уса, У1:10, У1:100 – сок з. уса в соответствующих разведениях.\* - Достоверно отличается от позитивного контроля – НС,  $p \leq 0.05$ .

### 2.3.3. Антигенотоксические эффекты растительных соков и экстрактов

После предварительной инкубации исследуемых соков лекарственных растений с бактериями *E. coli* PQ37, максимальный антимуtagenный эффект был установлен для соков *A. arborescens* и *C. fragrans* в разведении 1:10, который выразился в снижении фактора индукции SOS-ответа на 60 и 62% соответственно (рис.9А). При одновременном же добавлении исследуемых соков лекарственных растений и НС наблюдалось снижение уровня индукции SOS-ответа в разведении 1:10 соков *A. arborescens* (59%) и *C. fragrans* (62%) (рис.9Б).

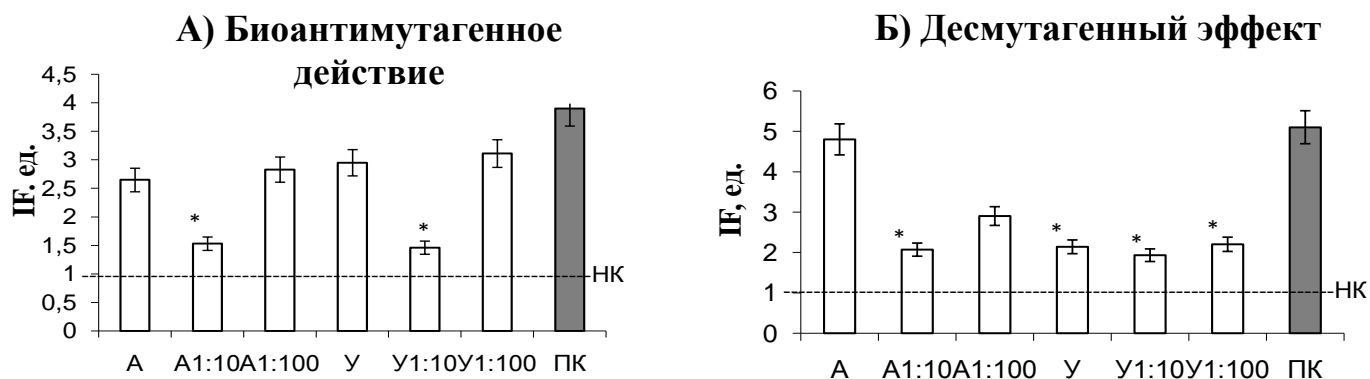


Рис.9. Влияние соков растений *Aloe arborescens* и *Callisia fragrans* на SOS-индуцирующий потенциал НС (А: при предварительной обработке клеток *E. coli* PQ37 соками растений в течение 2 ч.; Б: при одновременном действии растительных соков и НС на клетки *E. coli* PQ37); А – Сок алоэ древовидного и НС, А1:10, А1:100 – сок алоэ древ. в соответствующих разведениях и НС; У – сок золотого уса и НС, У1:10, У1:100 – сок з. уса в соответствующих разведениях и НС. ПК – позитивный контроль (НС, 60 мкг/мл), НК (пунктирная линия) – негативный контроль (спонтанный уровень SOS-ответа).

Максимальное биоантимутагенное действие было показано для сныти обыкновенной (*Aegorodium podagraria*) в разведении 1:100 (65%) и чистотела большого (*Chelidonium majus*) в разведении 1:10 (66%) (рис.10А). Эффективность антигенотоксического действия сока чистотела и его разведений 1:10 и 1:100 в SOS хромотесте составляет 79 %, 76 % и 79 % соответственно (рис.10Б). В отличие от *C. majus* сок растения *A. podagraria* не показал выраженного десмутагенного действия.

Из результатов, представленных в таблице 5 видно, что сок чистотела большого проявляет десмутагенное действие в Rec тесте. Наивысший эффект наблюдался при совместном действии фурацилина и сока чистотела на штамм *rolA*, дефектный по ДНК-полимеразе I, что выражалось в существенном снижении генотоксического действия фурацилина (90 %). В то же время, нам не удалось обнаружить выраженного десмутагенного эффекта сока чистотела большого при тестировании на штаммах *uvrA* и *гесА* (табл. 5).

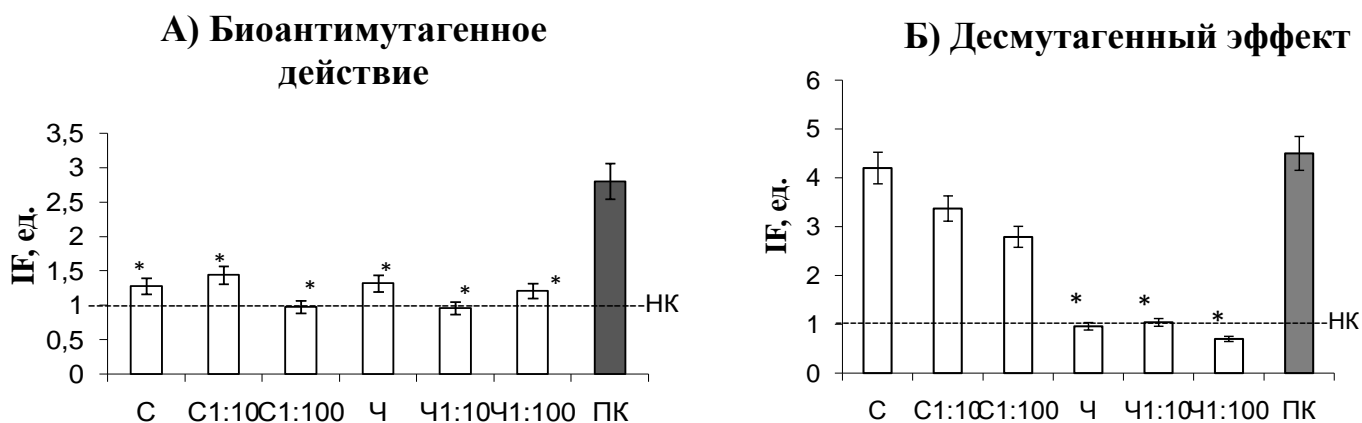


Рис.10. Влияние соков растений *Aegopodium podagraria* и *Chelidonium majus* на SOS-индуцирующий потенциал НС (А: при предварительной обработке клеток *E. coli* PQ37 соками растений в течение 2 ч.; Б: при одновременном действии растительных соков и НС на клетки *E. coli* PQ37); где С – Сок сняты обыкновенной и НС, С1:10,С1:100 – сок сняты обыкн. в соответствующих разведениях и НС). Ч – сок чистотела большого и НС, Ч1:10,Ч1:100 – сок чистотела бол. в соответствующих разведениях и НС. ПК – позитивный контроль – НС (60 мкг/мл), НК (пунктирная линия) – негативный контроль (спонтанный уровень SOS-ответа).

Таблица 5.

Результаты оценки антигенотоксического эффекта сока чистотела большого в Рес тесте

Исследуемые соединения	Зона ингибирования роста штаммов, мм			
	WP2	recA	polA	uvrA
Фурацилин	1.5±0.10	6.5±0.52	5.5±0.35	6.0±0.54
Сок чистотела и фурацилин	1.0±0.08	5.5±0.45(10%)	1.5±0.12(88%)*	4.5±0.38(23%)
Сок чистотела 1:10 и фурацилин	1.3±0.12	5.0±0.37(26%)	1.7±0.09(90%)*	3.2±0.30(58%)*
Сок чистотела 1:100 и фурацилин	0.5±0.03	3.7±0.21(36%)*	1.3±0.11(80%)*	3.0±0.22(45%)*

\* - Статистически достоверно отличается от позитивного контроля,  $P \leq 0,05$ . В скобках приведены показатели эффективности антигенотоксического действия, %.

Из результатов, представленных на рис. 11А, видно, что предварительная инкубация клеток тестерных бактерий с соком растений подорожника большого (*Plantago major*) снижала фактор индукции SOS-ответа в 1.6–2 раза. Антигенотоксический эффект сока данного растения, как неразбавленного, так и в разведениях 1:10 и 1:100 составил 55 %, 36 % и 39 %, соответственно. При исследовании сока растений мать-и-мачехи (*Tussilago farfara*) установлено, что разведение сока приводит к повышению его биоантимутагенной активности, эффективность антигенотоксического действия достигала 86 %. Одновременное добавление сока растений *P. major* к культуре клеток *E. coli* PQ37 не вызывал заметного снижения генотоксического эффекта НС (рис.11Б). Сок растений *T. farfara* проявил десмутагенный эффект, что выразилось в снижении фактора индукции SOS-ответа клеток *E. coli* PQ37 в 2 раза. При последующем разведении сока мы не обнаружили выраженного десмутагенного эффекта — 16 % и 13 % для разведений сока 1:10 и 1:100, соответственно (рис.11Б).

При одновременном действии растительных *P. major*, *T. farfara* и фурацилина на тестерные штаммы *E. coli* в Рес тесте различия между размерами зон

ингибирования на чашках с нормальными и дефектными по репарации бактериями были незначительными.

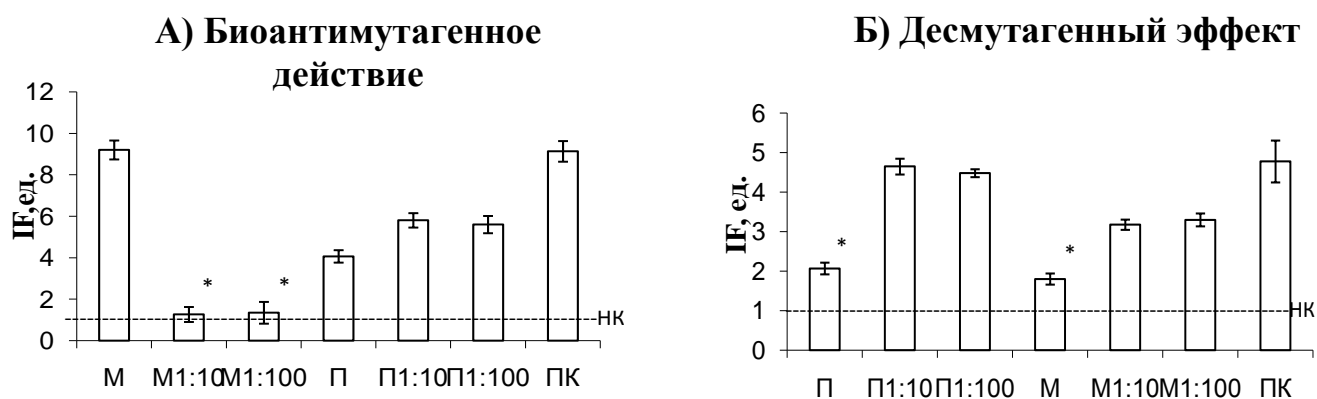


Рис.11. Влияние соков растений *Tussilago farfara* и *Plantago major* на SOS-индуцирующий потенциал НС (А: при предварительной обработке клеток *E. coli* PQ37 соками растений в течение 2 ч.; Б: при одновременном действии растительных соков и НС на клетки *E. coli* PQ37); ПК - позитивный контроль - НС, НК (пунктирная линия) – негативный контроль (спонтанный уровень SOS-ответа), М – сок мать-и-мачехи обыкн. и НС, М1:10, М1:100 – сок мать-и-мачехи обыкн. в соответствующих разведениях и НС; П – сок подорожника бол. и НС, П1:10, П1:100 – сок подорожника бол. в соответствующих разведениях и НС.

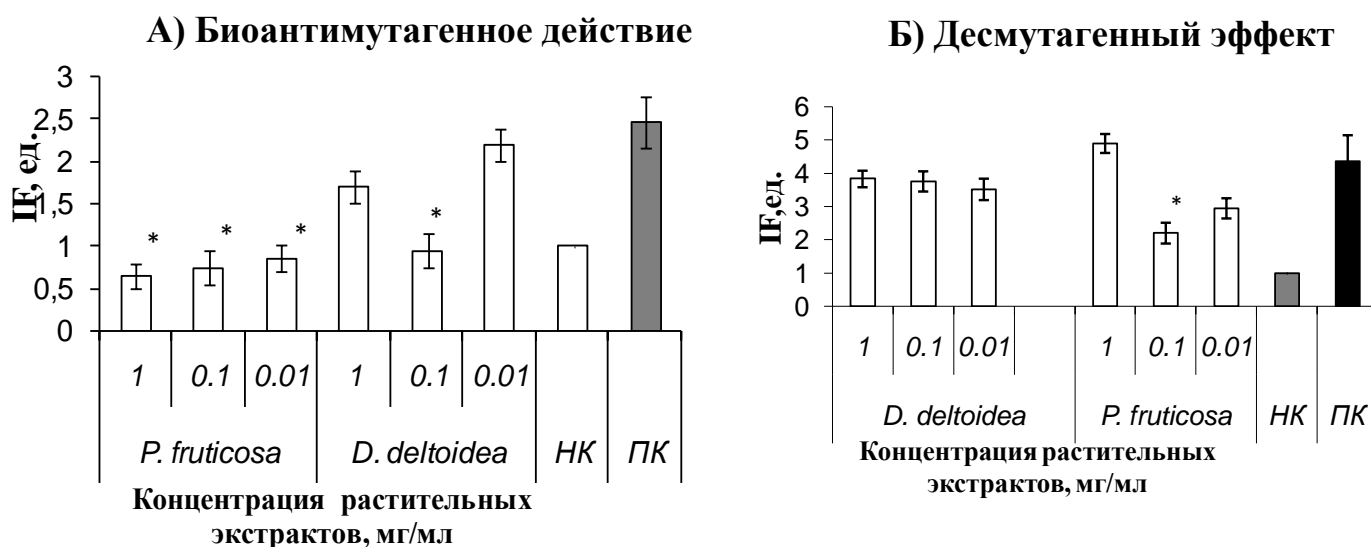


Рис.12. Влияние экстрактов растений *Polyscias fruticosa* и *Dioscorea deltoidea* на SOS-индуцирующий потенциал НС: А) при предварительной обработке клеток *E. coli* PQ37 экстрактами растений в течение 2 ч. и с последующим добавлением НС; Б) при одновременном добавлении исследуемых экстрактов и НС к клеткам *E. coli* PQ37. ПК - позитивный контроль-НС, НК – негативный контроль (спонтанный уровень SOS-ответа).\* - Достоверно отличается от позитивного контроля – НС,  $p \leq 0.05$ .

Максимальный биоантимутагенный эффект показали экстракты полисциаса кустарникового (*Polyscias fruticosa*) в концентрации 1 мг/мл (73%) и диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea*) в концентрации 0.1 мг/мл (62%) (рис.12А). При одновременном добавлении экстрактов исследуемых растений и известного мутагена к культуре клеток *E. coli* PQ37 для экстракта *P. fruticosa* в концентрациях 0.1 и 0.01 мг/мл наблюдалось снижение фактора индукции SOS-ответа на 49 и 32% соответственно (рис. 12Б). Экстракт *D. deltoidea* не проявил антимутагенного эффекта ни в одной из исследованных концентраций.

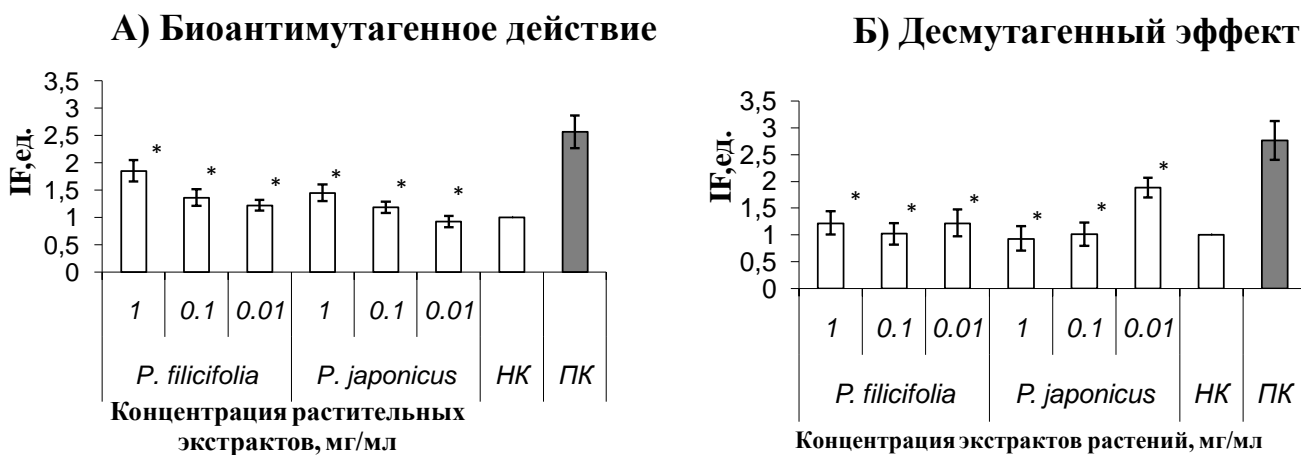


Рис.13. Влияние экстрактов растений *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus* на SOS-индуцирующий потенциал НС: А) при предварительной обработке клеток *E. coli* PQ37 соками растений в течение 2 ч. с последующим добавлением НС; Б) при одновременном добавлении исследуемых экстрактов и НС к клеткам *E. coli* PQ37. ПК - позитивный контроль-НС, НК – негативный контроль (спонтанный уровень SOS-ответа).

Экстракты лекарственных растений полисциаса папоротниколистного (*Polyscias filicifolia*) и женьшеня японского (*Panax japonicus*) после предварительной обработки клеток *E. coli* PQ37 приводили к практически полному исчезновению мутагенного действия НС. Для экстракта *P. filicifolia* антимуагенный эффект составил 27-52%, а для *P. japonicus* – 43-64% (рис.13А). Одновременное добавление экстрактов растений *P. filicifolia* и *P. japonicus* к культуре клеток *E. coli* PQ37 привело к практическому полному исчезновению генотоксических эффектов НС, снижая фактор индукции на 63% для концентрации 0.1 мг/мл экстракта *P. filicifolia* и на 81% для концентрации 1 мг/мл экстракта *P. japonicus* (рис. 13Б).

#### 2.3.4. Антимутагенное действие соков и экстрактов растений

Данные о десмутагенном эффекте сока мать-и-мачехи обыкновенной, показанные в SOS-хромотесте подтверждаются также и в тесте Эймса. Исследуемый сок *T. farfara* снижал количество колоний-ревертантов, индуцированных мутагеном азидом натрия, на 67% (рис.14). В отличие от SOS-хромотеста экстракт растения *D. deltoidea* нейтрализовал действие мутагена азиды натрия в тесте Эймса, приводя к снижению количества колоний-ревертантов на 61% (рис.15). Таким образом, нами выявлен дифференциальный десмутагенный эффект экстракта растения *D. deltoidea*. Десмутагенный эффект также подтвердился в тесте Эймса для экстракта женьшеня японского. Экстракт *P. japonicus* снижал мутагенное действие азиды натрия в 2 раза (рис.16).

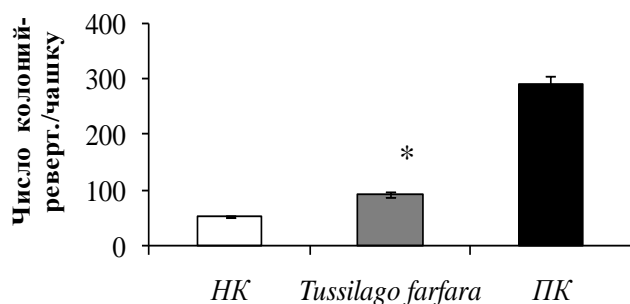


Рис.14. Влияние сока *Tussilago farfara* на мутагенную активность азиды натрия (1 мкг/чашку) в тесте Эймса при одновременном добавлении исследуемого сока и мутагена в верхний агар. ПК - позитивный контроль с азидом натрия. НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования). \* -  $p \leq 0.05$ , достоверно отличается от позитивного контроля.

Рис.15. Влияние экстракта *Dioscorea deltoidea* на мутагенную активность азид натрия. ПК - позитивный контроль – азид натрия (1 мкг/чашку), НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования).

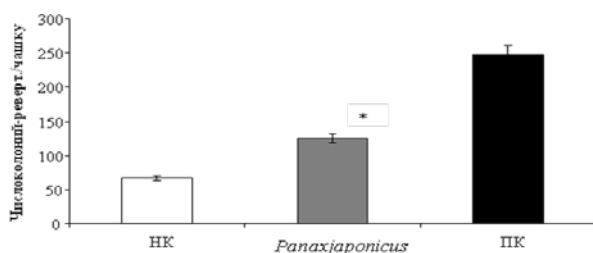
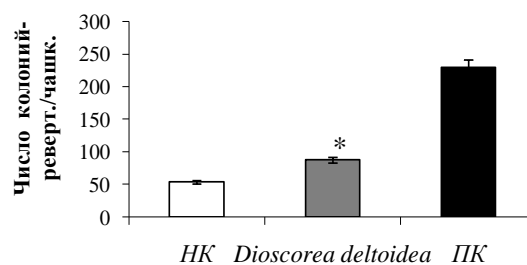


Рис.16. Влияние экстракта *Panax japonicus* на мутагенную активность азид натрия. ПК - позитивный контроль – азид натрия (1 мкг/чашку), НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 3.1. Антимутагенное действие биокомплекса пчелиной перги

Биостимулирующие свойства биокомплекса пчелиной перги объясняются наличием в его составе аминокислот, витаминов и ферментов, обладающих биологической ценностью для пчёл. В ходе работы биокомплекс, полученный из пчел, не проявил мутагенного и генотоксического действия ни в одной из исследованных концентраций в тесте Эймса и SOS-хромотесте (рис.1,2). Отсутствие токсичности, мутагенности, канцерогенности и тератогенности на микробных тест-системах было также выявлено у препарата «Галидомид», представляющий собой многокомпетентную смесь на основе аминокислот и обладающего сходным действием с препаратом «Винибис» на основе пчелиной перги [Поройков, Филимонов, 2000].

Таблица 6.

Компонентный состав пчелиной перги

ВИТАМИНЫ	МИКРО - и МАКРОЭЛЕМЕНТЫ	АМИНОКИСЛОТЫ
Витамин А 200 I.E.	Фосфор 24 мг	Аргинин 200 мг
Витамин В <sub>1</sub> 33 мкг	Калий 44 мг	Изолейцин 204 мг
Витамин В <sub>2</sub> 71 мкг	Кальций 45 мг	Лейцин 252 мг
Витамин В <sub>3</sub> 76 мкг	Натрий 1.6 мг	Лизин 260 мг
Витамин В <sub>6</sub> 22 мкг	Магний 14 мг	Метионин 84 мг
Витамин В <sub>12</sub> 5 мкг	Медь 0.06 мг	Фенилаланин 164мг
Фолиевая к-та 24 мкг	Железо 10 мг	Треонин 128 мг
Витамин С 70 мкг	Марганец 5.6 мг	Валин 232 мг
Витамин D 64 мкг	Сера 40 мг	Гистидин 112 мг
Витамин РР 15 мкг	Хлор 3.2 мг	Триптофан 56 мг
Витамин (Н) 2.4 мкг	Кремний 5 мг	Еще 9 аминокислот и более
Витамин Е 3.6 мг	Еще 16 микроэлементов	40 ферментов
Витамин Р 2.4 мг		

Данные предоставлены Институтом Фармакологической Аналитики (Бремен).

Антимутагенные эффекты биокомплекса пчелиной перги, выявленные нами в тесте Эймса и SOS-хромостесте, ранее были обнаружены и у других продуктов пчеловодства: прополиса и мёда. Прополис обладает уникальными противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами [Türkez, 2009]; участвует в локализации (ограничении) опухолевого процесса, очищении клеточных мембран, нормализации процессов дыхания клеток, контроле процессов размножения клеток в организме. Мёд также показал антиканцерогенные свойства в отношении известного канцерогена Тгр-Р-1(3-амино-1,4-диметил-5Н-пиридо[4,3-*b*]индол) в тесте Эймса, максимально снижая его мутагенные свойства в концентрациях 10 и 20 мкг/мл [Wang, 2002].

Полученные результаты характеризуют биокомплекс пчелиной перги как биологически активный препарат, обладающий определенным антимутагенным потенциалом. Его антимутагенное и ростостимулирующее действие может быть объяснено тем, что в составе биокомплекса содержится широкий спектр витаминов-антиоксидантов, аминокислот, ферментов, макро- и микроэлементов (табл.6) [Фарм. статья, 2001]. Известно, что витамины А, С, Е [Ramel *et al.*, 1986], а также некоторые аминокислоты обладают ярко выраженными антимутагенными свойствами и поэтому вполне обоснованным представляется предположение о связи антимутагенных свойств пчелиной перги с наличием в его составе данных соединений. Таким образом, биокомплекс пчелиной перги может быть рекомендован к разработке как перспективный антимутагенный, безопасный в области малых доз (1-100 мкг/мл) препарат.

### **3.2. Десмутагенный эффект экстракта рогов 19-месячного сайгака *Saiga tatarica* L. до периода гона в тесте Эймса**

Установлено, что во всем диапазоне исследованных концентраций ни один из экстрактов рогов сайгака *Saiga tatarica* L. не обладал выраженным биоантимутагенным эффектом. Мы предполагаем, что инкубация с различными концентрациями экстрактов рогов сайгака не приводит к активации систем, задействованных в процессе антимутагенеза. Десмутагенные свойства экстрактов рогового вещества сайгака 1.7 ДГВ и 1.7 ПГВ, т.е. способность снижать активность мутагенов до их взаимодействия с различными системами организма были обнаружены у экстракта 1.7 ДГВ (рис.6,7). Разные эффекты экстрактов 1.7 ДГВ и 1.7 ПГВ, возможно, объясняются изменением состава биологически активных веществ в рогах в зависимости от физиологического состояния животных. Десмутагенное действие экстракта рогов сайгака 1.7 ДГВ в тесте Эймса в отношении Ац и МННГ, может быть обусловлено: а) связыванием молекулы мутагена, что в свою очередь препятствует его воздействию на клетки тестерных бактерий; б) модификацией молекулы мутагена при его взаимодействии с компонентами исследованного экстракта. Установлено, что в состав рогов любых копытных животных входят кератин, аминокислоты, пептиды, липиды, остатки нуклеиновых кислот, микроэлементы: кальций, алюминий, хром, медь, железо, марганец и цинк [Романов, 2005]. Основными составляющими элементами являются аминокислоты - от 30% до 90% (табл. 7) и белки - до 52% [Брызгалова и Михайлова, 1998]. Отмечается, что возможно именно присутствием пептидов обусловлены некоторые физиологические эффекты препаратов на основе экстрактов рогов [Поляков с соавт, 2002]. Антимутагенная активность показана для ряда аминокислот. По данным Osawa *et al.* цистеин обладает выраженным антимутагенным эффектом против мутагенных компонентов, образующихся в пище в процессе приготовления [Osawa

*et al.*, 1980]. При оценке эффекта аминокислот в отношении МННГ в тесте Эймса была установлена высокая антимуtagenная активность цистеина, глицина, триптофана, лизина и аргинина [Roy *et al.*, 2002]. Учитывая данные о химическом составе рогов сайгака, вполне можно допустить, что обнаруженный десмутagenный эффект экстракта 1.7 ДГВ обусловлен присутствующими в нем аминокислотами и пептидами.

Таблица 7.

Аминокислотный состав (мкмоль/100г) чехла рогов сайги и сайтарина

Аминокислота	Мука из рогов сайги					Экстракт из рогов сайги			
	Полный аминокислотный состав		Содержание свободных аминокислот, мкмоль/100г, при значениях экстракции			Полный аминокислотный состав		Содержание свободных аминокислот	
	Мкмоль/100г	% от суммы ам.к-т	3	6	9	Мкмоль/100мл.	%	Мкмоль/100 мл	%
Лизин	58000	6.4	5	2	9	10.0	3.4	≈ 2.0	≈ 1.7
Гистидин	16000	1.6	Сл.	Сл.		1.3	0.4	0	-
Аргинин	71000	7.8	5	12	Сл.	10.9	3.7	2.6	2.2
Аспарг. к-та	≈64000	≈7.2	-	-	9	30.9	10.5	2.5	2.1
Треонин	72000	8.1	-	-	30	18.4	6.2	2.1	1.8
Серин	80000	9.0	100	97	58	27.1	9.2	9.3	7.9
Глутамин	135000	15.0	21	39	8	42.7	14.5	3.1	2.6
Пролин	37000	4.2	55	30	23	22.8	7.7	6.1	5.2
Глицин	84000	9.3	100	120	49	33.1	11.2	30.8	26.1
Аланин	65300	7.2	69	57	31	≈20.0	≈6.8	10.6	9.0
Валин	54500	6.0	53	31	20	17.1	5.8	13.5	11.4
Изолейцин	37000	4.1	36	24	14	10.1	3.4	7.5	6.3
Лейцин	87600	10.0	64	38	19	28.3	9.6	15.6	13.2
Тирозин	23900	2.6	81	52	33	12.5	4.2	≈7.0	≈5.9
Фенилаланин	25300	2.7	54	33	20	9.2	3.1	≈5.0	≈4.2
Всего	910600	101.2	723	585	333	294.4	99.7	115.7	99.6

### 3.3. Антимуtagenные и антигенотоксические эффекты биокomплексов растений в микробных тест-системах

Проведенное исследование позволяет сделать вывод о дифференциальном токсическом действии растительных биокomплексов в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (табл.3,4). Нами показано, что сок *Plantago major* обладал антибактериальной активностью в отношении грамотрицательных бактерий *S. typhimurium*, причем бактерицидное действие данного сока в отношении грамположительных микроорганизмов *M. luteus* отсутствовало. Экстракт *Dioscorea deltoidea* и сок *Tussilago farfara* избирательно подавляли рост и развитие грамположительных бактерий, в то же время комплекс БАВ *T. farfara* проявлял ростостимулирующую активность в отношении *S. typhimurium*. По всей видимости, такое неодинаковое действие соков и экстрактов лекарственных растений на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы объясняется разницей химического состава комплекса БАВ, а также разницей в составе клеточных стенок бактерий.

Имеется ряд исследований, свидетельствующих об антиканцерогенных, антимуtagenных и противоопухолевых эффектах соков и экстрактов различных

растений [Ogunjobi, 2007]. Биоантимутагенные и десмутагенные свойства *Aloe arborescens*, выявленные нами в SOS-хромостесте на штамме *E. coli* PQ37 характеризуют данное растение как перспективный антимутагенный препарат (рис.9А,Б). В составе растения *Callisia fragrans* содержатся гликозиды, фитостериды, пектины, флавоноиды, микроэлементы (железо, медь, никель, хром и др.), витамины группы В, провитамин А, дубильные вещества, аскорбиновая кислота, кверцетин, который владеет противоопухолевой и Р-витаминной активностью, антиоксидантным и спазмолитическим действием. *C. fragrans*, оказывая противоопухолевым действием и обладая иммуномодулирующим эффектом, используется в гинекологии при лечении миом [Булатова, 2009]. Антигенотоксические свойства сока *C. fragrans*, выявленные нами в SOS-хромостесте, наиболее эффективно проявились в разведении 1:10 (рис.9А,Б).

Известно, что *Chelidonium majus* содержит значительное количество биологически активных веществ: дубильные вещества, флавоноиды, сапонины, витамины А и С, органические кислоты и алкалоиды (около 27 видов), оказывающих селективное цитостатическое действие на опухолевые клетки человека в условиях *in vitro*. Результаты, полученные нами при исследовании сока растений чистотела большого в SOS-хромостесте (рис.10А,Б) и Rec тесте (табл.5), свидетельствуют о том, что антиканцерогенные, антикластогенные и антимутагенные эффекты сока данного растения могут быть обусловлены десмутагенным действием его биоактивных компонентов. На основании данных о биоантимутагенном эффекте сока чистотела большого в SOS-хромостесте с преинкубацией мы можем предположить, что протекторное действие биологически активных веществ растения связано также с влиянием на процессы репарации ДНК. *Aegopodium podagraria* обладает значительным целебным потенциалом [Сокольская, 2010]. В липофильной фракции содержится хлорофилл (1.6%), ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая и др.); органические кислоты – яблочная и лимонная, углеводы (глюкоза и фруктоза); фенолкарбоновые кислоты – хлорогеновая и кофейная; флавоноиды – кверцетин, кемпферол; холин. Инкубация сока сныти обыкновенной с клетками бактерий *E. coli* PQ37 приводила к стимуляции защитных систем клетки, что приводило к проявлению данным соком биоантимутагенных свойств (рис.10А).

Нам не удалось обнаружить значительный антимутагенный эффект для сока *Plantago major* как в SOS-хромостесте (рис.11А,Б), так и Rec тесте. В литературе имеются данные о том, что экстракты данного растения могут оказывать генотоксическое действие. В работе Басаран с соавт. [Basaran *et al.*, 1996] установлено, что экстракты *P. major* вызывают повреждения в лимфоцитах человека (метод ДНК-комет), хотя и не обладают мутагенной активностью в тесте Эймса на штаммах *S. typhimurium* TA98 и TA100. Возможно, что генотоксические эффекты обусловлены входящими в состав растения токсичными соединениями, такими как нитраты, щавелевая и эруковая кислоты [Guil *et al.*, 1997]. При исследовании биоантимутагенных свойств сока растений *Tussilago farfara* нами установлен значительный ингибирующий эффект сока этого растения на развитие SOS-ответа, индуцируемого НС в клетках *E. coli* PQ37 (рис.11А). Интересно отметить, что биоантимутагенное действие сока проявляется при его разведении. Увеличение эффективности биопротекторного действия с уменьшением дозы показано при изучении некоторых биологически активных веществ, в частности, антиоксидантов [Савина с соавт., 2009]. Сок растения *T. farfara* проявил десмутагенный эффект в

тесте Эймса по отношению к азиду натрия, снижая количество колоний-ревертантов, индуцированных мутагеном на 67% (рис.14). Эти данные объясняются различием механизма действия известных мутагенов. Так, НС ингибирует синтез нуклеиновой кислоты, предотвращая ее полимеризацию, а азид натрия, являясь прямым мутагеном, вызывает мутации замены пар оснований у бактерий. Таким образом, нами выявлен дифференциальный десмутагенный эффект сока растения *T. farfara*.

*Dioscorea deltoidea* проявила антигенотоксические свойства в SOS-хромотесте в варианте с предварительной инкубацией исследуемого экстракта с клетками бактерий *E. coli* PQ37 (рис. 12А). У стероидных сапогенинов, содержащихся в *D. deltoidea*, была обнаружена способность тормозить рост некоторых форм злокачественных образований; снижать уровень холестерина в крови и стимулировать овуляторные процессы у животных, а также антигрибковая, антимикробная и противовирусная активности [Васильева, 2000]. В отличие от SOS-хромотеста, экстракт растения *D. deltoidea* нейтрализовал действие известного мутагена азид натрия в тесте Эймса, приводя к снижению количества колоний-ревертантов на 61% (рис.15). Таким образом, нами выявлен дифференциальный десмутагенный эффект экстракта растения *D. deltoidea*.

Антимутагенные эффекты *Polyscias filicifolia*, выявленные нами в SOS-хромотесте (рис.13А,Б), возможно объясняются наличием в его составе гликозидов, которые также присутствуют в экстрактах растения *Panax ginseng*, показавшие антиканцерогенные и противоопухолевые свойства в исследовании Юнг-Жуна [Young-Joon *et al.*, 2001]. Главными действующими веществами *Panax japonicus* считаются тритерпеновые гликозиды - гинзенозиды (А, В, С, D, Е, F, G, H, I-K), пептиды, полисахариды и эфирные масла (сесквитерпены и др.), обладающие высокой биологической активностью. Данные литературы свидетельствуют о значительном антиканцерогенном действии экстрактов растений женьшеня японского [Общие сведения о женьшене, 2010]. В последние годы появился интерес к женьшеню как к средству для профилактики рака. В опытах на клеточных культурах женьшень и его гинзенозиды тормозили рост клеток рака печени и толстой кишки [Оздоровительные продукты для снижения онкологического риска, 2005]. Таким образом, биоантимутагенные и десмутагенные свойства женьшеня японского могут быть объяснены наличием в его составе тритерпеновых гликозидов, продукция которых в данном растении на порядок выше, чем в растении женьшеня настоящего [Смирнова, 2008].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемые биокомплексы растительного и животного происхождения проявили антимутагенные эффекты различной степени в бактериальных тест-системах. Биокомплекс пчелиной перги приводил к снижению частоты индуцированных мутаций на 53-78% в тесте Эймса, а также к практическому полному исчезновению генотоксического эффекта митомицина С в SOS-хромотесте. Результаты по исследованию биокомплекса, полученного из пчел, характеризуют пчелиную пергу как биологически активный препарат, обладающий определенным антимутагенным потенциалом. Его биоантимутагенное, десмутагенное и ростостимулирующее действие может быть объяснено тем, что в составе биокомплекса содержится широкий спектр витаминов-антиоксидантов,

аминокислот, ферментов, макро- и микроэлементов. Десмутагенный эффект биокомплекса рогов сайгака возраста 19 месяцев до периода гона приводил к снижению мутагенной активности известных мутагенов N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина и N<sup>4</sup>-аминоцитидина на 31% в тесте Эймса на тестерном штамме *Salmonella typhimurium* TA100. Учитывая данные о химическом составе биокомплекса, полученного из парнокопытных млекопитающих, можно допустить, что обнаруженный десмутагенный эффект экстракта рогов сайгака *Saiga tatarica* L. 1.7 ДГВ обусловлен присутствующими в нем аминокислотами (аналогичными составляющим пчелиной перги). Таким образом, антимуутагенная активность биокомплексов, полученных из пчел и парнокопытных млекопитающих, может быть объяснена антиоксидантным эффектом компонентов экстракта рогов сайгака и пчелиной перги, который вносит значительный вклад в лечебные свойства препаратов, основанных на биокомплексах животного происхождения. Данные литературы говорят о прямой связи между проявлением антиоксидантных и антимуутагенных эффектах, а также о том, что основным механизмом действия антимуутагенных соединений являются их антиоксидантные свойства. На основании данных, полученных при изучении биоантимуутагенной и десмутагенной активности растительных соков растений чистотела большого *Chelidonium majus*, мать-и-мачехи обыкновенной *Tussilago farfara*, золотого уса *Callisia fragrans*, а также экстрактов диоскореи дельтовидной *Dioscorea deltoidea*, полисциаса папоротниколистного *Polyscias filicifolia* и женьшеня японского *Panax japonicus* мы можем предположить, что антимуутагенная активность биокомплексов растений скорее всего объясняется наличием в их составе биологически активных вторичных метаболитов (флавоноиды, терпеноиды, гликозиды, сапонины и др.), которые способствуют блокированию процесса индукции SOS сигнала, либо активируют иные системы репарации, способствующие безошибочному исправлению повреждений ДНК.

Дальнейшие исследования, направленные на выяснение конкретных компонентов и механизмов, обуславливающих антимуутагенные эффекты биокомплексов животного и растительного происхождения, помогут разработать стратегию их рационального использования для создания антимуутагенных препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. Биокомплекс пчелиной перги в диапазоне исследуемых концентраций (1-100 мкг/мл) проявил десмутагенные, биоантимуутагенные и биостимулирующие эффекты в бактериальных тест-системах на штаммах *Salmonella typhimurium* TA100 и *Escherichia coli* PQ37, снижая частоту индуцированных мутаций на 78%.
2. Из шести исследованных растений сок *Plantago major* проявил бактерицидные свойства, снижая выживаемость штамма *S. typhimurium* TA100 на 30.7% и соки *Dioscorea deltoidea* и *Tussilago farfara*, снижая выживаемость *M. luteus* на 10% и 8.1% соответственно.
3. Соки растений *Callisia fragrans*, *Tussilago farfara*, *Chelidonium majus* и экстракты растений *Dioscorea deltoidea*, *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus* проявили десмутагенные и биоантимуутагенные свойства; максимальным эффектом обладал сок *Chelidonium majus* (90%) и экстракт *Panax japonicus* (81%).
4. Установлен десмутагенный эффект экстракта рогов сайгака *Saiga tatarica* L. возраста 19 месяцев до периода гона в отношении известных мутагенов N-метил-N'-

нитро-N-нитрозогуанидина и N<sup>4</sup>-аминоцитидина в тесте Эймса на тестерном штамме *Salmonella typhimurium* TA100 (снижение мутагенности на 31%).

5. Биоконплексы, полученные из пчел, лекарственных растений и парнокопытных млекопитающих могут быть рекомендованы к разработке как антимутагенные препараты, эффективность которых зависит от физиологических и биохимических характеристик биообъекта.

#### Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Карамова, Н.С. Исследование антигенотоксических свойств соков растений *Chelidonium majus* L., *Plantago major* L. and *Tussilago farfara* L. / Н.С. Карамова, Д.Г.Фатыхова, Й.Р.Абдрахимова, О.Н.Ильинская // Экологическая генетика. - 2010. – Т. VIII. - №2. - С.56-65.
2. Карамова, Н.С. Антимутагенная активность экстрактов рогового вещества *Saiga tatarica* L. / Н.С.Карамова, П.В.Зеленихин, Д.Г.Фатыхова, Д.Р.Сафиуллина, О.Н.Ильинская, О.Е.Романов // Ученые записки Казанского Государственного университета. Секция «Естественные науки». - 2011. - Т.-153. - Кн. 1. - С.127-135.

#### Другие публикации по теме диссертации:

3. Фатыхова, Д.Г. Полезные свойства растений: возможность снятия мутагенной нагрузки на организм человека / Д.Г.Фатыхова, О.Н.Ильинская, Й.Р.Абдрахимова, И.В.Пархимович // Журнал Агротехнологии Поволжья. - 2009. - №1. - С.48-50.
4. Фатыхова, Д.Г. Токсическая и генетическая безопасность препарата «Винибис» / Д.Г.Фатыхова, В.Г.Евтюгин, О.Н.Ильинская // Материалы тезисов 79-ой Всероссийской научной студенческой конференции. – Казань, 2005. - С.200.
5. Евтюгин, В.Г. Оценка токсических и мутагенных эффектов биоконплекса пчелиной перги / В.Г.Евтюгин, Д.Г.Фатыхова, О.Н.Ильинская // Материалы тезисов 79-ой Всероссийской научной студенческой конференции. – Казань, 2005. - С.201.
6. Евтюгин, В.Г. Генотоксические эффекты пчелиной перги / В.Г.Евтюгин, Д.Г.Фатыхова, О.Н.Ильинская // Материалы XLIII международной научной студенческой конференции «Студенты и научно-технический прогресс». – Казань, 2005. - С.88-89.
7. Фатыхова, Д.Г. Антимутагенная активность препарата «Винибис» / Д.Г.Фатыхова, О.Н. Ильинская // Материалы финальной конференции Казанского Государственного Университета. - 2006. - С.48-49.
8. Fatykhova, D.G. Evaluation of antimutagenic potential of *Aloe arborescens*, *Callisia fragrans*, *Chelidonium majus* and *Aegopodium podagraria* plants / D.G. Fatykhova, N.S.Karamova, I.V.Parchimovich, A.A.Bajazitova, J.R.Abdrakhimova, O.N.Ilinskaya // Abstracts of XIV Internat.Confer. devoted to the 20th anniv. of partnership between Kazan State University and Justus\_liebig Giessen University “Microbial Enzymes in biotechnology and medicine”. – Kazan, 2009. – P.22-23.
9. Fatykhova, D.G. Antimutagenic effects of “Vinibis” preparation / D.G.Fatykhova, V.G.Evtugin, L.T.Akhmetova, O.N.Ilinskaya // Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders». – 2009. - P. 50.
10. Fatykhova, D.G. Evaluation of Antimutagenic potential of *Aloe arborescens*, *Callisia fragrans*, *Chelidonium majus* and *Tussilago farfara* plants / D.G.Fatykhova,

N.S.Karamova, I.V.Parkhimovich, A.A.Bajazitova, O.N.Ilinskaya // Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders». – 2009. - P.49.

11. Parkhimovich, I.V. Antimutagenic activities of cellular juices from various medicinal plants / I.V.Parkhimovich, **D.G.Fatykhova**, Y.R.Abrakhimova, O.N.Ilinskaya // Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders». – 2009. - P.91.

12. Мвапе, И. Сок растения *Chelidonium majus* L. понижает токсический эффект фурацилина / И.Мвапе, С.Катема, Н.С.Карамова, **Д.Г.Фатыхова**, Й.Р.Абдрахимова, О.Н.Ильинская // Материалы Российской научно-практической конференции «Инновационные разработки молодых ученых – АПК Россия». - Казань: Фолиант, 2010. - С.253-257.

13. Гафиятова, Е.И. Оценка биологической активности и содержания вторичных метаболитов комнатно- и дикорастущих растений / Е.И.Гафиятова, И.В.Пархимович, **Д.Г.Фатыхова**, Й.Р.Абдрахимова, О.Н.Ильинская // Тезисы 3Всероссийского конгресса с участием международных студентов и молодых ученых «Симбиоз-Россия». - Нижний Новгород, 2010. - С.49.

14. **Фатыхова**, Д.Г. Антимутагенные эффекты соков лечебных растений / **Д.Г.Фатыхова**, Я.В.Хилинская, Н.С.Карамова, Й.Р.Абдрахимова, О.Н.Ильинская // Тезисы 1Всероссийской научной конференции «Основы и прикладные аспекты биологии». – Томск, 2010. - С.77-78.

15. **Фатыхова**, Д.Г. Антимутагенные эффекты экстрактов лекарственных растений / **Д.Г.Фатыхова**, Н.С.Карамова, Й.Р.Абдрахимова, О.Н.Ильинская // Материалы Международной научно-практической конференции «Научное обеспечение устойчивого сельско-хозяйственного производства в условиях глобального изменения климата». – Казань, 2010. - С.367-372.

16. Karamova, N.S. Assessment of antigenotoxic potential of juices of plants *Chelidonium majus* L., *Plantago major* L. and *Tussilago farfara* L. in bacterial tests / N.S.Karamova, Y.R.Abrakhimova, **D.G.Fatykhova**, T.V.Bagaeva, O.N.Ilinskaya // Abstr. of the Chinese confer. on Modern Genetics. - 2011. - P. 353.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю профессору, д.б.н., академику АН РТ О.Н. Ильинской за постановку проблемы, внимательное отношение к работе и плодотворную помощь в обсуждении результатов. К.б.н., доц. Й.Р. Абдрахимовой (каф. Физиологии растений) за предоставленные исследуемые соки и экстракты растений. К.м.н., лауреату Гос. премии РТ в области науки и техники Ж.Ж. Сибгатуллину (ООО «АНТ») за предоставление пчелиной перги. К.х.н. Л.Т. Ахметовой (ООО «АНТ») за предоставление данных химического анализа препарата «Винибис» на основе пчелиной перги. К.х.н., доц. О.Е. Романову (Калмыцкий государственный университет, г. Элиста) за предоставленные экстракты рогов сайгака *Saiga tatarica* L. К.б.н. доц. Н.С. Карамовой, к.б.н., доц. П.В. Зеленихину, к.б.н., доц. А.Б.Маргулис, к.б.н., ст. препод. Д.Р. Яруллиной за постоянное внимание, помощь в проведении, обсуждении работы и экспериментов, консультации. Особая благодарность А.И. Колпакову и всем сотрудникам кафедры за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне и по факсу: (843) 238-76-01