

УДК 575.224

**АНТИМУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ
РОГОВОГО ВЕЩЕСТВА САЙГАКА *Saiga tatarica* L.**

*Н.С. Карамова, П.В. Зеленихин, Д.Г. Фатыхова, Д.Р. Сафиуллина,
О.Н. Ильинская, О.Е. Романов*

Аннотация

Практическое применение медицинских препаратов и пищевых добавок, созданных на основе эффективных и недорогих антимутагенов природного происхождения, представляется перспективным подходом к снижению генетического риска, обусловленного распространением мутагенных факторов в природной среде. Несмотря на широкое использование рогового вещества копытных животных в качестве источника биологически активных веществ и лечебного сырья, природа и спектр эффектов, особенно генетических, изучены недостаточно. В работе проведена оценка антимутагенной активности экстрактов рогового вещества сайгака *Saiga tatarica* L., отобранных у животных возрастом 1 год и 7 месяцев до и после гона. Антимутагенное действие экстрактов в отношении известных мутагенов *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидина и *N*⁴-аминоцитидина исследовали в тесте Эймса на тестерном штамме *Salmonella typhimurium* TA 100. Установлен дозозависимый средний десмутагенный эффект экстракта рогов, отобранных у животных до гона. Экстракт рогов, отобранных у животных после гона, не вызывал существенного снижения числа колоний индуцированных His⁺-ревертантов по сравнению с позитивным контролем. В тесте с преинкубацией оба экстракта не оказывали заметного влияния на уровень мутагенеза, индуцированного *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидином, что свидетельствует об отсутствии биоантимутагенного эффекта.

Ключевые слова: антимутагенность, экстракт рогового вещества сайгака, тест Эймса.

Введение

Загрязнение окружающей среды мутагенами физической, химической и биологической природы является серьезным фактором риска, способствующим развитию многих хронических заболеваний, в том числе и онкологических. Известно, что мутации в соматических клетках играют ключевую роль в инициации и развитии канцерогенеза [1, 2]. Исследование мутагенной активности ряда канцерогенных соединений позволило установить высокую степень корреляции между мутагенностью и канцерогенностью [3]. Интенсивное изучение механизмов генетических повреждений и открытие биологического феномена антимутагенеза позволили разработать подходы, направленные на профилактику индуцированного мутагенеза. К настоящему времени известно уже более 300 соединений, обладающих антимутагенной активностью [4]. Поиск антимутагенов природного происхождения и создание на их основе медицинских препаратов и пищевых добавок можно рассматривать в качестве наиболее перспективного подхода к массовой профилактике канцерогенеза, а также целого

ряда других заболеваний, обусловленных изменениями в генетическом аппарате организма.

Известно, что роговое вещество копытных животных издавна является привлекательным материалом в качестве источника биологически активных веществ. Так, одним из широко применяемых в тибетской медицине видов лекарственного сырья являются рога степной антилопы – сайгака. Экстракты из рогов сайгака используют для лечения нервных заболеваний, а также как жаропонижающее и гипотензивное средства [5, 6]. Однако природа и спектр биологической активности препаратов, приготовленных из рогов диких копытных, изучены недостаточно.

Целью настоящей работы явилось исследование антимутагенных свойств экстрактов рогов сайгака (*Saiga tatarica* L.).

1. Материалы и методы

В работе использованы экстракты рогов сайгака, любезно предоставленные О.Е. Романовым (Калмыцкий государственный университет, г. Элиста):

1.7ДГВ – экстракт верхней трети рогов сайгака, отобранных у животных возрастом 1 год и 7 месяцев до гона;

1.7ПГВ – экстракт верхней трети рогов сайгака, отобранных у животных возрастом 1 год и 7 месяцев после гона.

Предварительно измельченное роговое вещество 3 раза экстрагировали равным объемом 50%-ного этанола. Полученные экстракты упаривали на водяной бане (температура до 70 °C) под вакуумом до сухого состояния. Образцы экстрактов разводили в стерильной дистиллированной воде (100 мкг/мл, 1, 5 мг/мл) и стерилизовали кипячением на водяной бане в течение 15 мин.

Антимутагенную активность образцов оценивали с помощью теста Эймса. Эксперименты проводили согласно методу, описанному Мароном и Эймсом [7]. В качестве тестерного штамма использовали ауксотрофный по гистидину штамм *Salmonella typhimurium* TA 100 (*hisG46*, *rfa*, *DuvrB*, *bio*-, pKm101), полученный из Уральского НИИ экологии и генетики микроорганизмов, г. Пермь. При действии мутагенных факторов тестерный штамм, ауксотрофный по гистидину, может ревертировать к прототрофности. *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидин (МННГ, 50 мкг/мл в ДМСО) (фирма Serva, Германия) и *N*⁴-аминоцитидин (10 мкг/мл в дистиллированной воде) (фирма Sigma, Германия) были использованы в качестве известных мутагенов.

При оценке десмутагенных свойств растворы исследуемых образцов (0.1 мл), известного мутагена (0.1 мл) и бактериальную суспензию (0.1 мл, 10⁹ клеток/мл) вносили в 3 мл 0.6% верхнего агара (45 °C). После перемешивания 0.6%-ный верхний агар наслаивали на поверхность селективного агара в чашках Петри. При оценке биоантимутагенных свойств образцов использовали метод преинкубации. Бактериальную суспензию предварительно инкубировали с раствором исследуемого образца при 37 °C в течение 20 мин. Затем в верхний 0.6%-ный агар добавляли 0.1 мл бактериальной суспензии, 0.1 мл раствора известного мутагена и наслаивали на селективный агар в чашках Петри. После инкубации в течение 48 ч при 37 °C подсчитывали число колоний His⁺-ревертантов, выросших в присутствии мутагена (МННГ или *N*⁴-аминоцитидин) и при совместном

действию исследуемых образцов и известного мутагена. Антимутагенный эффект оценивали согласно формуле: $АЭ (\%) = (M - A) / M \cdot 100$, где M – число колоний His⁺-ревертантов, выросших в присутствии мутагена, A – число колоний His⁺-ревертантов, выросших при совместном действии исследуемых образцов и известного мутагена.

Согласно Неги с соавторами [8], ингибирование мутагенного эффекта менее чем на 25% свидетельствует о слабом, от 25% до 40% – о среднем, выше 40% – о сильном антимутагенном эффекте.

Полученные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ среднеквадратическое отклонение. Для оценки достоверности различий между результатами в вариантах опыта использовали t -критерий Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони [9]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был принят за $p \leq 0,05$.

2. Результаты и обсуждение

Согласно классификации, предложенной Када с соавторами [10], антимутагены можно разделить на две основные группы: десмутагены – соединения, препятствующие повреждению ДНК путем связывания или модификации мутагена до проникновения в клетку; биоантимутагены – вещества, снижающие частоту мутаций за счет влияния на различные процессы, индуцируемые в организме при действии мутагенного фактора.

2.1. Десмутагенный эффект исследуемых экстрактов. Как видно из результатов, представленных на рис. 1, экстракт 1.7ДГВ статистически достоверно снижал мутагенный эффект МННГ в клетках тестерного штамма *S. typhimurium* TA 100 на 23%, 27%, 31% в концентрации 10, 100 и 500 мкг/чашку соответственно.

При совместном действии N^4 -аминоцитидина и экстракта 1.7ДГВ на тестерные бактерии мы также наблюдали заметное уменьшение числа колоний индуцированных мутантов (рис. 2). Экстракт 1.7ДГВ снижал мутагенный эффект N^4 -аминоцитидина в концентрации 10 мкг/чашку на 24%, а в наивысшей из исследованных концентраций 500 мкг/чашку – до 39%.

Второй исследованный нами экстракт – 1.7ПГВ – не оказывал существенного влияния на уровень мутагенеза, индуцированного МННГ и N^4 -аминоцитидином в клетках тестерных бактерий (рис. 3, 4).

Разные эффекты экстрактов 1.7ДГВ и 1.7ПГВ, возможно, объясняются изменением состава биологически активных веществ в рогах в зависимости от физиологического состояния животных.

2.2. Биоантимутагенный эффект исследуемых экстрактов. При тестировании экстрактов 1.7ДГВ и 1.7ПГВ 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 (рис. 5).

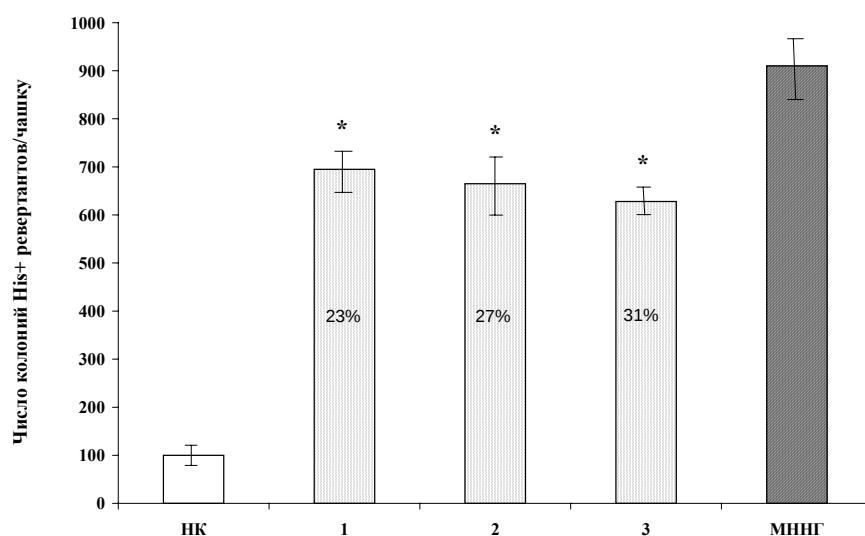


Рис. 1. Десмутагенный эффект экстракта 1.7ДГВ в отношении МННГ (5 мкг/чашку) в тесте Эймса: НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования); 1 – МННГ + 1.7ДГВ 10 мкг/чашку; 2 – МННГ + 1.7ДГВ 100 мкг/чашку; 3 – МННГ + 1.7ДГВ 500 мкг/чашку. Антимутагенный эффект указан в %. Звездочкой отмечено достоверное отличие от позитивного контроля (МННГ), $p \leq 0.017$ (0.05/3 – поправка Бонферрони)

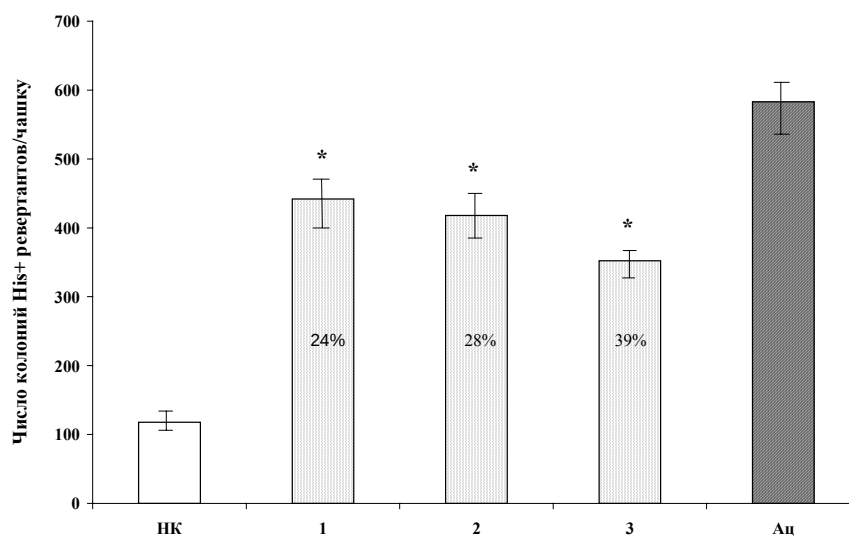


Рис. 2. Десмутагенный эффект экстракта 1.7ДГВ в отношении N^4 -аминоцитидина (Ac, 1 мкг/чашку) в тесте Эймса: НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования); 1 – Ac + 1.7 ДГВ 10 мкг/чашку; 2 – Ac + 1.7ДГВ 100 мкг/чашку; 3 – Ac + 1.7 ДГВ 500 мкг/чашку. Антимутагенный эффект указан в %. Звездочкой отмечено достоверное отличие от позитивного контроля (Ac), $p \leq 0.017$ (0.05/3 – поправка Бонферрони)

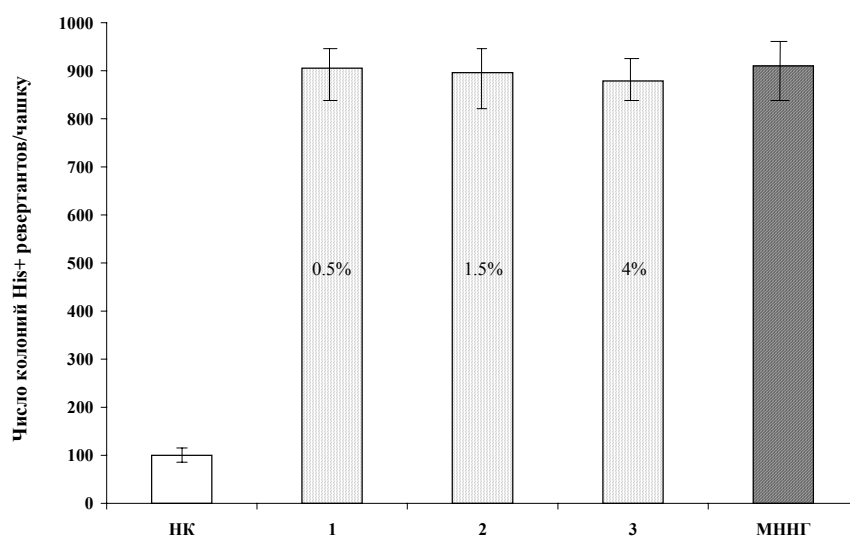


Рис. 3. Десмутагенный эффект экстракта 1.7ПГВ в отношении МННГ (5 мкг/чашку) в тесте Эймса: НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования); 1 – МННГ + 1.7ПГВ 10 мкг/чашку; 2 – МННГ + 1.7ПГВ 100 мкг/чашку; 3 – МННГ + 1.7ПГВ 500 мкг/чашку. Антимутагенный эффект указан в %

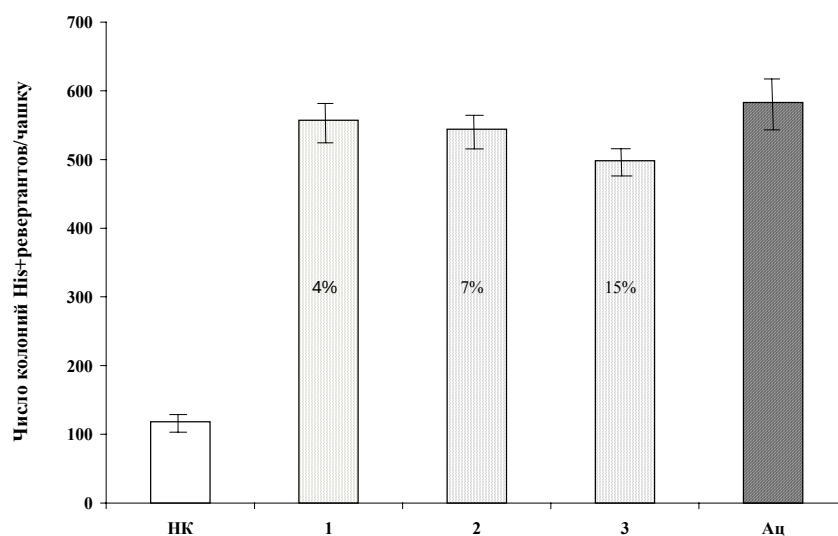


Рис. 4. Десмутагенный эффект экстракта 1.7ПГВ в отношении N^4 -аминоцитидина (Ац, 1 мкг/чашку) в тесте Эймса: НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования); 1 – Ац + 1.7 ПГВ 10 мкг/чашку; 2 – Ац + 1.7ПГВ 100 мкг/чашку, 3 – Ац + 1.7ПГВ 500 мкг/чашку. Антимутагенный эффект указан в %

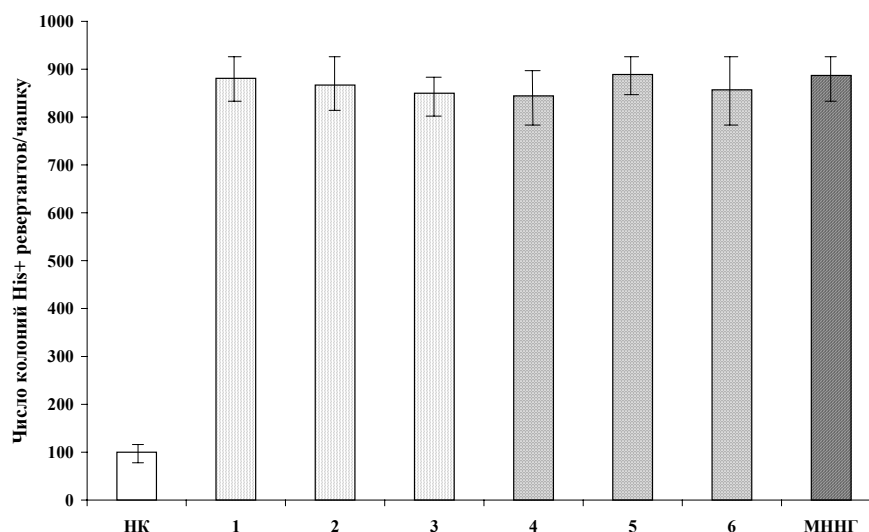


Рис. 5. Биоантимутагенный эффект экстрактов 1.7ДГВ и 1.7ПГВ в тесте Эймса с преинкубацией: НК – негативный контроль (спонтанный фон мутирования). 1 – МННГ + 1.7 ПГВ 50 мкг/чашку; 2 – МННГ + 1.7ПГВ 100 мкг/чашку; 3 – МННГ + 1.7ПГВ 500 мкг/чашку; 4 – МННГ + 1.7ДГВ 50 мкг/чашку; 5 – МННГ + 1.7ДГВ 100 мкг/чашку; 6 – МННГ + 1.7ДГВ 500 мкг/чашку

Таким образом, анализ полученных результатов показывает, что из двух исследованных экстрактов только экстракт 1.7ДГВ демонстрирует средний десмутагенный эффект, до 39% снижая мутагенную активность известных мутагенов МННГ и N^4 -аминоцитидина. Следует отметить, что обнаруженный нами эффект носит дозозависимый характер.

Десмутагенное действие экстракта рогов сайгака 1.7ДГВ в тесте Эймса в отношении МННГ и N^4 -аминоцитидина 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, такие, как кальций, алюминий, хром, медь, железо, марганец. Основными составляющими элементами являются аминокислоты (от 30% до 90%) [11, 12] и белки (до 52%) [12]. В гидролизате экстракта рогов сайгака (сайтарине) преобладают аспарагиновая кислота, треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, валин, лейцин, причем содержание аминокислот изменяется в зависимости от физиологического состояния сайгака [12–14]. Помимо свободных аминокислот в рогах присутствуют и пептиды. Отмечается, что возможно именно присутствием пептидов обусловлены некоторые физиологические эффекты препаратов на основе экстрактов рогов [15].

Присутствующие в сайтарине пролинсодержащие пептиды могут относиться к ди- и трипептидам: Pro-Gly (PG), Gly-Pro (GP) и Pro-Gly-Pro (PGP) – глипро-

линам. Показано, что глипролины обладают антитромботическим, противоязвенным действием [16].

Антимутагенная активность показана для ряда аминокислот. По данным Осава с соавторами [17], цистеин обладает выраженным антимутагенным эффектом против мутагенных компонентов, образующихся в пище в процессе приготовления. При оценке эффекта аминокислот (кроме гистидина) в отношении *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидина в тесте Эймса была установлена сильная антимутагенная активность цистеина, глицина, триптофана, лизина и аргинина. Другие аминокислоты проявляли средний или слабый антимутагенный эффект [18].

Способность некоторых протеинов и пептидов, содержащихся в пищевых продуктах, ингибировать процесс канцерогенеза, по всей видимости, также обусловлена их антимутагенным действием. Показано, что казеин, основной белок молока, и его пептиды обладают антимутагенными свойствами. Анतिकанцерогенный эффект сыворотки, установленный в опытах с экспериментальными животными, объясняется высоким содержанием цистеина и гамма-глутамилцистеиновых дипептидов, эффективных субстратов для синтеза глутатиона [19].

Протеины и пептиды являются также важным фактором антимутагенной активности бактерий, в частности *Propionibacterium shermanii*, *Enterococcus faecalis*, и актиномицетов (*Streptomyces griseus* var. *rhodochrous* AJ9029) [4, 20].

Таким образом, учитывая данные о химическом составе рогов сайгака, вполне можно допустить, что обнаруженный десмутагенный эффект экстракта 1.7ДГВ обусловлен присутствующими в нем аминокислотами и пептидами. Тем не менее для подтверждения и понимания механизма антимутагенного эффекта данного экстракта необходимы дальнейшие исследования.

Summary

N.S. Karamova, P.V. Zelenikhin, D.G. Fatykhova, D.R. Safiullina, O.N. Ilinskaya, O.E. Romanov. Antimutagenic Activity of Saiga Antelope (Saiga Tatarica L.) Horn Extracts.

Practical use of medicines and food additives consisting of natural antimutagens is a perspective approach to decreasing the mutation rate induced by mutagenic factors in the environment. The extracts of horns are used as a source of biologically active compounds and to cure different types of diseases for a very long time. However, the chemical nature and mechanisms of effects on human health, especially genetic material, are mostly unknown. The antimutagenic activity of two extracts of the horns of 1-year- and 7-month-old saiga antelope was studied. Antimutagenicity was determined against the known mutagens *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and *N*⁴-aminocytidine using Ames test on *Salmonella typhimurium* TA 100 strain. The extract of the horns of saiga antelope taken before mating period (BM) showed a moderate dose-dependent desmutagenic effect. The extract of the horns of saiga antelope taken after mating period (AM) did not cause a marked decrease in the number of induced His⁺ revertants in Ames test. Preincubation of the *Salmonella typhimurium* tester strain with the both extracts did not significantly inhibit mutagenicity induced by MNNG. The obtained results indicate that the extracts tested do not possess bioantimutagenic activity. The authors emphasize that further work should be performed to confirm the desmutagenic activity of the extract BM in other test systems and to assess the mechanisms of the effect obtained.

Key words: antimutagenic activity, saiga antelope horn extracts, Ames test.

Литература

1. *Bos J.L.* ras oncogene in human cancer: a review // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49, No 17. – P. 4682–4689.
2. *De Flora S., Ferguson L.* Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 591, No 1–2. – P. 8–15.
3. *McCann J., Spingarn N.E., Kabori J., Ames B.N.* Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1975. – V. 72, No 12. – P. 5135–5139.
4. *Vorobijeva L.I., Abilev S.K.* Antimutagenic properties of bacteria: review // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2002. – V. 38, No 2. – P. 97–107.
5. *Романов О.Е.* О химическом составе рогов животных // *Научная мысль Кавказа.* – 2005. – Спец. вып. – С. 91–95.
6. *Романов О.Е., Лебедева А.И.* Состав экстракта рогов сайгака в зависимости от физиологического состояния животных // *Сб. науч. тр. Междунар. науч. конф. «Селекционные и технологические основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных».* – Ярославль, 2003. – Ч. II. – С. 208–212.
7. *Maron D., Ames B.* Revised methods for the Salmonella mutagenicity test // *Mutat. Res.* – 1983. – V. 113, No 3/4. – P. 174–210.
8. *Negi P.S., Jayaprakasha G.K., Jena B.S.* Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts // *Food Chem.* – 2003. – V. 80. – P. 393–397.
9. Одновыборочные критерии. Критерий Стьюдента. Дисперсионный анализ ANOVA. – URL: http://www.sevin.ru/seminary/statistika/lecture_3.pdf.
10. *Kada T., Inoue T., Ohta T., Shirasu Y.* Antimutagens and their modes of action // *Shankel D.M., Hartman Ph.E., Kada T., Hollaender A. (eds.), Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms.* – N. Y.: Plenum Press, 1986. – P. 181–196.
11. *Силаев А.Б., Галкин В.С., Филиппова Л.А. и др.* Химическая природа биологически активных веществ пантов // *Пантовое оленеводство: Сб. науч. работ ЦНИЛ пантового оленеводства.* – Барнаул, 1975. – Вып. 4. – С. 93–100.
12. *Силаев А.Б., Чельцова-Бebutova Г.В., Размахнин В.Е., Сухорева-Немакова Н.Н.* Некоторые данные о химическом составе рогов сайги // *Науч. докл. высш. школы. Биол. науки.* – 1976. – № 8. – С. 27–30.
13. *Размахнин В., Силаев А., Сухарева Н., Чельцова Г.* Рога сайгаков // *Охота и охотничье хозяйство.* – 1976. – № 10. – С. 16–17.
14. *Поляков Н.Б., Стрелецкий А.В., Васильковский Б.В. и др.* Хроматомасс-спектральный анализ препарата сайтарин (водно-спиртовой экстракт из рогов сайгака) // *Материалы школы-семинара «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии».* – Звенигород, 2002. – С. 64–65.
15. *Нестеренко И.Ф., Солодова Е.Е., Спрыгин В.Г.* Сравнительное изучение фракций сайтарина по ориентировочной двигательной активности мышей // *Валеология. Диагностика, средства и практика обеспечения здоровья.* – Владивосток, 2000. – Вып. 4. – С. 166–172.
16. *Ашмарин И.П., Самонина Г.Е., Желязник Н.Я., Бакаева З.В.* Протекторное действие пептида RGP на слизистую оболочку желудка // *Докл. РАН.* – 1999. – Т. 368, № 5. – С. 709–710.
17. *Osawa T., Ishibashi H., Namiki M., Kada T.* Desmutagenic action of ascorbic acid and cysteine to a new pyrrole mutagen formed by the reaction between food additives: ascorbic acid and sodium nitrite // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1980. – V. 95, No 2. – P. 835–841.

18. Roy M.K., Kuwabara Y., Hara K. *et al.* Antimutagenic effect of amino acids on the mutagenicity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) // Biosci., Biotechnol., Biochem. – 2002. – V. 66, No 6. – P. 1400–1402.
19. Parodi P.W. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention // Curr. Pharm. Des. – 2007. – V. 13, No 8. – P. 813–828.
20. Воробьева Л.И., Чердынцева Т.Ф., Абилов С.К. Биоантимутагенное действие культуральной жидкости *Streptococcus faecalis* против мутагенеза, индуцированного 2-нитрофлуореном у *Salmonella typhimurium* TA 1538 и TA 98 // Микробиол. – 1996. – Т. 65, № 1. – С. 79–83.

Поступила в редакцию
18.10.10

Карамова Назира Сунагатовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ ББФ Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Nazira.Karamova@ksu.ru

Зеленихин Павел Валерьевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: pasha_mic@mail.ru

Фатыхова Диана Газинуровна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: fadi@bk.ru

Сафиуллина Дарья Радиевна – студент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: daria.safiullina@gmail.com

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru

Романов Олег Ермолаевич – кандидат химических наук, доцент кафедры химии Калмыцкого государственного университета, г. Элиста.

E-mail: romanov_oe@kalmsu.ru