

А.С. ДВОРНИК, Т.П. ПЕРЕРВА,
Л.П. МОЖИЛЕВСЬКА, В.А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. акад. Заболотного, 150, Київ, 03143

ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ РОСЛИННИХ ЕКСТРАКТІВ У СИСТЕМІ НЕСТАБІЛЬНИХ МУТАНТІВ *ESCHERICHIA COLI*



Встановлено здатність екстрактів клітинної біомаси деяких лікарських рослин інгібувати спонтанне вищеплення нових форм у системі MS2-індукованих нестабільних мутантів E. coli. Виявлений ефект аналізується з позицій стабілізуючої активності екстрактів відносно мембран бактеріальної оболонки. Обговорюється можливість застосування даної бактеріальної системи для вивчення стабілізуючого ефекту як окремого етапу протекторної дії відомих антимутагенів.

© А.С. ДВОРНИК, Т.П. ПЕРЕРВА, Л.П. МОЖИЛЕВСЬКА,
В.А. КУНАХ, 2004

Вступ. Процеси спонтанного мутування властиві кожному організму навіть за відсутності явного впливу екзогенних мутагенних чинників. Противагою процесу мутування є функціонування системи антимутагенного захисту організму [1–4]. За нормальних умов ці два протилежних процеси до деякої міри врівноважують один одного, наслідком чого є той чи інший кінцевий рівень сформованих спонтанних мутацій, властивий кожній групі живих організмів [5]. Цей еволюційно сформований рівень може значно підвищуватися залежно від генотоксичного навантаження конкретного регіону [6–8].

Одним із способів протистояти підвищенню рівня мутабільності є посилення опірності організму шляхом підтримки та підвищення ефективності роботи його аутоантимутагенної системи [3], тобто пошук та застосування речовин природного походження з антимутагенними властивостями. Вивчення антимутагенних та антиканцерогенних властивостей екстрактів, отриманих із 2750 видів рослин наземного та морського походження, показало, що у бактеріальній тест-системі Еймса лише 3,5 % цих екстрактів можна було вважати активними та нетоксичними. Дослідження лікарських рослин з чітко встановленими терапевтичними властивостями продемонструвало більш високу їх перспективність — у цьому випадку серед них було виявлено 20 % нетоксичних та активних з точки зору антимутагенної дії екстрактів [9]. Проте забруднення довкілля продуктами техногенного походження та прогресуюче скорочення запасів багатьох видів лікарських рослин значно обмежують використання природної рослинної сировини і зумовлюють необхідність її заміни альтернативною сировиною. Такою сировиною може бути біомаса культивованих *in vitro* клітин, яку можна отримувати в необхідній кількості і яка відповідає критеріям екологічної чистоти та стандартності. Разом з цим саме виявлення активності досліджуваних препаратів значно залежить від арсеналу використовуваних тест-систем [10]. Перспективними в цьому відношенні можуть бути мутанти бактерій з дефектами зовнішньої оболонки — візуально деякі типи таких мутантів можна розрізнити за зміненою формою бактеріальних колоній [11, 12]. Використання таких мутантів дозволяє проаналізувати вплив тестованої речовини не тільки на частоту вищеплення сег-

регантів (наприклад колоній S-типу), але й відслідкувати рівень, на якому відбувається реалізація активності тестованої речовини. Зниження кількості спонтанних сегрегантів свідчить про наявність антимутагенної функції препарату незалежно від її механізму — дисмутагенного чи біоантимутагенного [13]. Здатність сегрегантів повертатися до вихідної форми колонії забезпечується за рахунок подій на рівні бактеріальної оболонки під впливом умов культивування або складу середовища [14] і не супроводжується генетичними змінами. Вищеплення сегрегантів, здатних стійко зберігати нові ознаки, свідчить про те, що набуті зміни відбуваються на рівні ДНК [15].

Дана робота переслідувала дві мети: 1) дослідити вплив екстрактів, отриманих із біомаси культивованих *in vitro* клітин лікарських рослин, на частоту вищеплення спонтанних мутантів; 2) проаналізувати придатність нестабільних мутантів *E. coli* за формою бактеріальних колоній для тестування механізмів реалізації антимутагенної активності досліджуваних екстрактів.

Матеріали і методи. Використано один із описаних раніше нестабільних MS2-індукованих мутантів *E. coli* AB 259 Hfr 3000 [12]. Бактерії вирощували на живильному середовищі LB (Luria Broth). У двошарових посівах за Грація [16] використовували агаризоване середовище LB (1,8 % — для нижнього шару та 0,6–0,8 % — для верхнього шару).

Досліджували активність 40 % етанольних екстрактів, одержаних із біомаси культивованих клітин стандартним методом перколяції сухої біомаси. Кінцеве співвідношення спирт : біомаса становило 10:1. Джерелом біомаси слугували біомаса культури тканин женьшеня справжнього *Panax ginseng* С. А. Меу. із родини *Araliaceae* (штам *Panax* БІО-2МК, колекційний № 11, ККК ІМБіГ НАН України, Київ) — далі екстракт *P. ginseng*; полісціасу папоротелистого *Polyscias filicifolia* Bailey із родини *Araliaceae* (штам *Polyscias* F-2, колекційний № 6, ККК ІМБіГ із родини *Crassulaceae* (штам ЗК-1, колекційний № 29, ВСКК-ВР, Москва, Росія) — далі екстракт *Rh. rosea*; угернії Віктора *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko із родини *Amaryllidaceae* (штам UV-2, колекційний № 10, ККК ІМБіГ НАН України, Київ) — далі екстракт *U. victoris*. Використані штами клітинних культур

лікарських рослин одержано у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Екстракти випаровували за допомогою вакуумно-ротаційного випаровувача при 40 °С майже до сухого залишку і розчиняли у стерильній дистильованій воді до вихідного об'єму екстракту.

Експеримент проводили наступним чином. Вихідну культуру мутанта *E. coli* вирощували протягом 2 діб при 37 °С у рідкому живильному середовищі, що містило 10 % водного рослинного екстракту. У контроль замість екстракту вносили такий же об'єм фізіологічного розчину. Відібрані проби висівали на тверде живильне середовище і визначали титри вихідної культури та сегрегантів. Вихід сегрегантів вираховували як відсоток кількості колоній сегрегантів від кількості колоній вихідної форми. Антимутагенним ефектом вважали зменшення виходу сегрегантів у варіанті з екстрактом порівняно з контролем. Статистичну обробку даних проводили за *t*-критерієм Ст'юдента [17].

Результати досліджень та їх обговорення. Мутант *E. coli*, вибраний нами як тест-об'єкт, вищеплює спонтанно варіант, який відрізняється від вихідного формою та щільністю колоній на твердому живильному середовищі. Колонії вихідної культури мають розпливчасту форму та оточені більш дрібними дочірніми колоніями, утворюючи своєрідну групу. Колонії сегрегантів щільніші порівняно з колоніями вихідної культури, мають чіткі обриси і добре видимі на газоні прозорої вихідної культури.

Особливістю цих сегрегантів є їх здатність з часом повертатись до фенотипу вихідної культури при пересіві на свіже агаризоване живильне середовище. При вирощуванні та зберіганні у рідкому живильному середовищі така здатність не простежується. При висіві із рідкого на тверде живильне середовище сегреганти зберігають характерну для них щільну та чітку форму колоній, що можна пояснити селективним тиском рідкого середовища на сегреганти, а саме на стабільність їх оболонки, що визначає ступінь ригідності клітин, їх здатність до спонтанного лізису та подальшу форму утворюваних ними колоній.

Незважаючи на недостатню закріпленість ознак сегрегантів на рівні генотипу, в даній екс-

периментальній системі значення має сам факт постійного їх вищеплення як постійна ознака вихідної культури. Антимутагенну дію рослинних екстрактів визначали саме за впливом на ефективність спонтанного вищеплення сегрегантів вихідною культурою.

Загалом, вирощування вихідної культури у присутності екстрактів приводило до досить значного, а в окремих випадках і до повного інгібування процесу вищеплення сегрегантів. Це виражалось у сильному зменшенні порівняно з контролем кінцевого відсотка колоній сегрегантів від колоній вихідного типу у варіантах з додаванням екстракту. Так, у контрольній культурі цей показник становив 152 %, тобто кількість сегрегантів була у 1,5 раза вищою за кількість колоній вихідного типу. Імовірно, що високий вміст сегрегантів зумовлений здатністю вихідної культури як нестабільної системи вищеплювати їх з високою частотою, що зростає в міру старіння цієї культури, а також вищою швидкістю розмноження самих сегрегантів, оскільки в контрольному експерименті рівень накопичення їх біомаси істотно перевищував рівень накопичення вихідної культури (рис. 1).

Присутність екстракту *P. ginseng* у середовищі викликала зменшення частки вищеплених сегрегантів до 117 %. Разом з тим у присутності екстрактів *P. filicifolia*, *Rh. rosea* та *U. victoris* сегреганти практично не вищеплювались, оскільки після вирощування відсоток сегрегантів відносно колоній вихідного типу становив 1,1 та 0,3 відповідно (рис. 2). Зниження виходу сегрегантів не пов'язане з чутливістю уже вищеплених сегрегантів до екстрактів, оскільки у відповідному контрольному досліді сегреганти виявились менш чутливими до них, ніж вихідна культура. Це свідчить про те, що випробувані екстракти впливали саме на процес вищеплення сегрегантів, але не на уже сформовані сегреганти.

Отже, встановлено, що досліджені рослинні екстракти здатні гальмувати процес спонтанного вищеплення сегрегантів, проте слід враховувати, що мова йде про генетично незакріплені ознаки вищеплюваних форм, зважаючи на їх здатність повертатись при певних умовах до вихідного фенотипу.

Оскільки обриси бактеріальних колоній пов'язані зі структурною організацією мембран

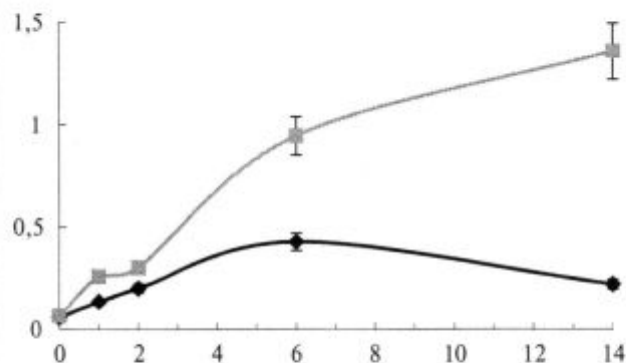


Рис. 1. Накопичення біомаси вихідної культури та сегрегантів: по вертикалі — оптична густина; по горизонталі — тривалість росту, доба; а — сегреганти; б — вихідна культура

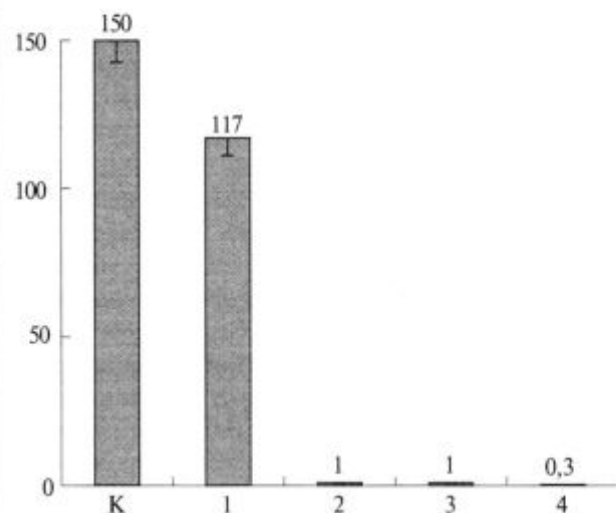


Рис. 2. Вихід сегрегантів (по вертикалі, %) у присутності екстрактів *P. ginseng* (1), *P. filicifolia* (2), *Rh. rosea* (3), *U. victoris* (4) та фізіологічного розчину (К). Відсоток сегрегантів вираховували від кількості клітин вихідної культури

клітинної оболонки [11, 12, 14, 15, 18], можна припустити, що спонтанне вищеплення клітин, які утворюють колонії, відмінні від вихідних, пов'язано в нестабільній вихідній культурі з досить легкою переорганізацією мембранних шарів оболонки її клітин в процесі їх росту та ділення. Враховуючи це, здатність рослинних екстрактів послаблювати процес вищеплення сегрегантів можна пояснити їх стабілізуючим впливом на оболонку клітин вихідного типу.

Рослинні екстракти являють собою багатокомпонентну суміш різноманітних високо- і низькомолекулярних сполук і деякі з них во-

лодіють певною спорідненістю до компонентів мембрани. Прикладом може служити кверцетин, сполука рослинного походження, біологічна дія якої в організмі, в тому числі людини, проявляється як антиоксидантна активність, гальмування активності мембранотропних ферментів, захист мембранозв'язаних ферментів, які коригують іонний гомеостаз у клітинах [19–21]. Відомо також захисна дія рослинного препарату фітогемаглютиніну щодо аберантної активності циклофосфаміду на клітини кісткового мозку сірійських хом'ячків, яким попередньо згодовували цей препарат [22]. Припускається, що даний ефект зумовлений активацією імунної системи, та оскільки фітогемаглютинін відноситься до лектинів рослинного походження, описаний вплив може в якійсь мірі опосередковуватись активацією певних рецепторів клітинних мембран [23]. Стабілізуючий вплив рослинних екстрактів на мембрани прокаріотичної клітини був досліджений нами в попередній роботі [24] в системі трансформації *E. coli* бактеріальною плазмідною. Показано, що обробка екстрактом компетентних клітин знижує вихід трансформантів, що свідчить про реставацію проникної для ДНК бактеріальної оболонки, пошкодженої внаслідок обробки клітини хлористим кальцієм та температурним шоком.

В нашій експериментальній системі, представлений мутантами *E. coli* по оболонці, також, очевидно, простежується не тільки антимуtagenна, але й стабілізуюча дія екстрактів, яка виявляється на рівні клітинної оболонки бактерій. При цьому взаємодія з мембранними структурами може утруднювати спонтанну переорганізацію мембранних шарів оболонки, результатом якої є вищеплення колоній з відмінною формою. Не виключено, що така стабілізуюча дія екстрактів є одним із перших етапів прояву їх антимуtagenних властивостей, які можна було б проаналізувати у випадку вищеплення форм з генетично закріпленими ознаками. Оскільки антимуtagenна та протекторна активність досліджених рослинних екстрактів була показана раніше [25], можна припустити, що виявлення в даній системі стабілізуючої активності препаратів може бути додатковим показником їх потенційних гензахисних властивостей. Слід зауважити, що використання таких нестабільних систем, які

вищеплюють форми з генетично незакріпленими ознаками, може виявитись цінним для виявлення постадійної дії препаратів, антимуtagenна активність яких була чітко показана при використанні тест-систем, що дозволяли відслідковувати рівень генетично закріплених мутацій.

Властивості вибраної нами експериментальної системи (модифікація форми і щільності колоній та посилення темпу накопичення біомаси сегрегантів порівняно з вихідною культурою) нагадують до деякої міри події, що супроводжують процеси канцерогенезу і можуть бути використані для тестування антимуtagenних (антиканцерогенних) властивостей речовин, біологічна активність яких націлена на клітинну оболонку [26]. Не виключено, що описана нами бактеріальна система може виявитись корисною для виявлення подібної активності і серед речовин нерослинного походження.

SUMMARY. Ability of cell biomass extracts of some medicinal plants to inhibit spontaneous segregation of new forms in *E. coli* MS2-induced unstable mutants system has been shown. The effect described is analyzed from the position of stabilizing activity of extracts concerning bacterial envelope membranes. The possible use of this bacterial system to study stabilizing effect as a separate stage of the known antimutagen protective action is discussed.

РЕЗЮМЕ. Установлена способность экстрактов клеточной биомассы некоторых лекарственных растений ингибировать спонтанное выщепление новых форм в системе MS2-индуцированных нестабильных мутантов *E. coli*. Описанный эффект анализируется с позиций стабилизирующей активности экстрактов по отношению к мембранам бактериальной оболочки. Обсуждается возможность использования данной бактериальной системы для изучения стабилизирующего эффекта как отдельного этапа протекторного действия известных антимутагенов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акифьев А.П., Худолый Г.А. Мутагенез и генетический гомеостаз у высших организмов // Вестн. РАМН. — 1993. — № 1. — С. 3–9.
2. Гончарова Р.И. Антимутагенез как генетический процесс // Вестн. РАМН. — 1993. — № 1. — С. 26–33.
3. Порошенко Г.Г. Антимутагены: подходы к классификации и перспектива поиска активных соединений // Вестн. РАМН. — 1995. — № 1. — С. 38–41.
4. Семенов В.В. Индукция естественных систем антимутагенеза // Влияние солнечной активности,

- климатических, погодных условий на состояние организма : Тез. докл. Респ. науч.-практ. конф. — Казань, 1988. — Т. 2. — С. 54.
5. Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J. Rates of spontaneous mutation // *Genetics*. — 1998. — **148**, № 4. — P. 1667–1686.
 6. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. — М., 1998.
 7. Ковальчук Л.Є., Нейко Є.М., Братівник Л.І. Комплексна оцінка мутагенних наслідків антропогенного забруднення довкілля і принципи їх профілактики // *Цитология и генетика*. — 1996. — **30**, № 5. — С. 60–65.
 8. Горовая А.И., Климкина И.И. Использование цитогенетического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами // *Цитология и генетика*. — 2002. — **36**, № 5. — С. 21–25.
 9. Wall M.E., Wani M.C., Hughes T.J., Taylor H. Plant antimutagens // *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*. — New York : Plenum Press, 1989. — P. 61–78.
 10. Тарасов В.А., Абилов С.К., Велибеков Р.М., Асланян М.М. Эффективность батарей тестов при оценке потенциальной мутагенной опасности химических соединений // *Генетика*. — 2003. — **39**, № 10. — С. 1406–1417.
 11. Браун В. Генетика бактерий. — М.: Наука, 1968. — 446 с.
 12. Перерва Т.П., Малюта С.С. Система MS2-индуцированных мутантов *E. coli* по F-фактору // *Молекуляр. биология*. — 1984. — Вып. 38. — С. 81–90.
 13. Kada T. Desmutagens and bio-antimutagens — their mode of action // *Bioassays*. — 1987. — **7**. — P. 113–116.
 14. Cadmus M.C., Rogovin S.P., Burton K.A., Pittsley J.E., Knutson C.A., Jeans A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain // *Can. J. Microbiol.* — 1976. — **22**. — P. 942–948.
 15. Prehm P., Schmidt G., Stirm S. On the mutations responsible for the rough phenotype of *Escherichia coli* B // *J. General Microbiol.* — 1976. — **97**. — P. 121–124.
 16. Адамс М. Бактериофаги. — М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1961. — 527 с.
 17. Лакин Г.Ф. Биометрия : Учеб. пособие для биол. спец. вузов. — М.: Высш. шк., 1980. — 293 с.
 18. Thompson E.D., Parks L.W. Genetic and biochemical studies on mannose-negative mutants with colonial morphological alteration // *Mol. Gen. Genet.* — 1976. — **149**. — P. 187–193.
 19. Максютіна Н.П., Мойбенко О.О., Пархоменко О.М. та ін. Використання нових лікарських форм кверцетину при ішемічних та радіаційних ушкодженнях : Метод. рекомендації. — Київ : Укр. центр духов. культури, 2000. — 13 с.
 20. Максютіна Н.П., Пилипчук Л.Б. Рослинні антиоксиданти і пектини в лікуванні і профілактиці променевих уражень і детоксикації організму // *Фармацевт. журн.* — 1996. — № 2. — С. 35–41.
 21. Leighton T., Ginther C., Flass L. et al. Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in allium vegetables // *Phenolic compounds in foods and their effects on health : American Chemical Society Symposium Series 507*. — Washington, D.C. — 1992. — P. 220–238.
 22. Лалчев С. Цитогенетична оцінка на антимутогенна активність на препарат PHS in vivo // *Съвремен. мед.* — 1987. — № 12. — С. 14–16.
 23. Порошенко Г.Г., Абилов С.К. Антропогенні мутагени і природні антимутогени // *Ітоги науки і техніки*. — М.: ВИНТИ. 1988. — С. 1 — 206. (Сер. Обща генетика, т. 12).
 24. Мирюта Г.Ю., Дворник А.С., Можилевська Л.П., Перерва Т.П. Вивчення біологічної активності рослинних екстрактів у системі трансформації *Escherichia coli* плазмідною ДНК // *Біополімери і клітина*. — 2003. — **19**, № 6. — С. 525–529.
 25. Дворник А.С., Перерва Т.П., Кунах В.А. Скринінг препаратів, отриманих із культури тканин лікарських рослин, на антимутогенну активність у системі *Escherichia coli* — бактериофаг λ // *Цитология и генетика*. — 2002. — **36**, № 2. — С. 3–10.
 26. Чехун В.Ф., Кулик Г.Л., Триндяк В.П., Тодор І.М. Молекулярно-біологічні аспекти структурно-функціонального стану клітинної поверхні як основа розвитку нової стратегії терапії раку // *Онкологія*. — 2002. — **4**, № 1. — С. 4–8.

Надійшла 19.12.03