

АНТИГЕНОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСТРАКТАХ *Inula britannica* И *Limonium gmelinii*

© 2017 г. А. В. Ловинская^{1, *}, С. Ж. Колумбаева¹, Т. М. Шалахметова¹,
М. В. Марсова², С. К. Абилов^{2, 3, **}

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, Алматы 050040

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра генетики, Москва 119991

*e-mail: annalovinska@rambler.ru

**e-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 10.05.2017 г.

С помощью биолюминесцентного теста были изучены антигенотоксические и антиоксидантные свойства биологически активных веществ (БАВ) в экстрактах *Inula britannica* L. и *Limonium gmelinii* (Willd.) Kuntze на штаммах *E. coli* MG1655 (pColD-*lux*), *E. coli* MG1655 (pSoxS-*lux*) и *E. coli* MG1655 (pKatG-*lux*). Растительные экстракты девясила и кермека в использованных концентрациях (0.5, 5.0, 50.0 и 500.0 мкг/мл) не проявили генотоксической и оксидантной активности. Экстракты статистически значимо снижали интенсивность биолюминесценции сенсоров pColD-*lux*, pKatG-*lux* и pSoxS-*lux* ($p < 0.05$), индуцированной 4-НХО и диоксидином, перекисью водорода и паракватом соответственно. Активность экстрактов зависела от их концентрации, наибольший антигенотоксический и антиоксидантный эффекты были выявлены в концентрации 500.0 мкг/мл.

Ключевые слова: *lux*-биосенсоры, биологически активные вещества, антигенотоксикант, окислительный стресс, антиоксидант.

DOI: 10.7868/S0016675817120086

В настоящее время известно, что химические загрязнители окружающей среды могут оказывать генотоксическое действие на живые организмы, приводящее к мутагенезу, канцерогенезу и другим специфическим токсическим эффектам. Генотоксичность, согласно определению Международного агентства по изучению рака (МАИР), включает прямые и косвенные воздействия на ДНК [1]. Это означает, что генотоксичность является не только результатом непосредственного взаимодействия химического соединения с молекулой ДНК, но и результатом непрямых воздействий на нее. К ним относятся активация процессов образования внутриклеточных свободных радикалов и ингибирования активности репаративных ферментных систем [2, 3]. В этой связи в генетической токсикологии принято регистрировать не только непосредственно мутагенные эффекты, но и более широкий круг генетических эффектов. Для этого используются методы определения индукции SOS-ответа в бактериальных клетках, репаративного синтеза и разрывов ДНК в клетках млекопитающих [1].

Исключить контакт человека с генотоксическими факторами окружающей среды практически невозможно, поэтому первостепенное значе-

ние приобретает поиск протекторов от их действия, получивших название антигенотоксикантов. К ним относятся и антимутагены, если изучение их активности проводится по отношению к индукции мутаций в тест-системах, регистрирующих наследуемые генетические изменения. Таким образом, антигенотоксичность и антимутагенность являются тест-специфическими понятиями, так же как и генотоксичность, и мутагенность. Антигенотоксическими свойствами обладают многие биологически активные вещества (БАВ) природного происхождения, в числе которых витамины, растительные флавонолы, фитогормоны, полипептиды, аминокислоты и др. Большинство из них являются антиоксидантами и могут повысить устойчивость организма к генотоксическому действию широкого ряда поллютантов. Изучение лекарственных растений в качестве перспективных источников биологически активных веществ, обладающих антигенотоксичностью, значительно активизировалось в последние годы, что обусловлено низкой токсичностью и низкой аллергенностью природных БАВ, комплексным воздействием их на организм и возможностью длительного применения без побочных эффектов [4–6]. Антигенотоксичность природных соединений часто

связана с их антиоксидантной активностью. Более того, они способны ингибировать определенные биохимические процессы, проявляя свойства антиметаболитов. Основу антигенотоксического действия многих БАВ составляют несколько механизмов обеспечения защиты наследственных структур от различных мутагенов. Большинство защитных агентов либо реагируют непосредственно с мутагеном или с производимыми им свободными радикалами и активными формами кислорода, либо ингибируют цитохром P450-опосредованный метаболизм или инактивацию активных метаболитов. Необходимо отметить, что способность биологически активных соединений влиять на генотоксичный фактор одновременно несколькими различными способами значительно увеличивает эффективность самого антигенотоксиканта [7]. Следовательно, поиск БАВ природного происхождения для коррекции генотоксических эффектов широко используемых в хозяйственной деятельности ксенобиотиков, а также для использования в качестве профилактических средств защиты генетических структур организма от мутагенных воздействий является чрезвычайно актуальной задачей. К таким веществам следует отнести в первую очередь витамины, пигменты, аминокислоты, фенолы и полифенолы. Эти соединения в различных концентрациях присутствуют в овощах, фруктах и травах. В этом плане перспективными растениями для производства ценных фитопрепаратов являются девясил британский (*Inula britannica*) и кермек Гмелина (*Limonium gmelinii*). Многие растения семейства Compositae обладают рядом лекарственных свойств. Фитопрепараты из растений рода *Inula* обладают противовоспалительным, антимикробным, бронхолитическим, противоаллергическим, секреторолитическим, желчегонным, отхаркивающим, ранозаживляющим, мочегонным свойствами [8]. В составе субстанций из растений рода *Limonium* семейства Plumbaginaceae имеются фенольные и полифенольные соединения, аминокислоты, витамины, которые известны как ингибиторы свободнорадикальных процессов.

Цель настоящего исследования – изучение антигенотоксической активности БАВ, экстрагируемых из растений дикорастущей флоры Казахстана рода *Inula* семейства Compositae и рода *Limonium* семейства Plumbaginaceae, с помощью *lux*-биосенсоров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На антигенотоксическую активность тестировали водные растворы экстрактов из подземной и надземной частей растений девясила британского (*Inula britannica* L., сем. Compositae) и кермека Гмелина (*Limonium gmelinii* (Willd.) Kuntze,

сем. Plumbaginaceae) в концентрациях 0.5, 5.0, 50.0 и 500.0 мкг/мл.

Экстракция биологически активных веществ из растений *I. britannica* и *L. gmelinii* была проведена с помощью 70%-ного водно-этилового спирта. Ранее был определен качественный и количественный состав БАВ изученных растений. В экстрактах *I. britannica* доминируют сапонины, дубильные вещества, витамины, полисахариды, а в экстрактах *L. gmelinii* – дубильные вещества, флавоноиды, полисахариды и каротиноиды [9, 10].

В качестве негативного контроля была использована дистиллированная вода. В качестве генотоксикантов (позитивного контроля) были использованы 1,4-диоксид-2,3-хиноксалиндиметанол (диоксидин, C₁₀H₁₀N₂O₄) и 4-нитрохинолин-1-оксид (4-НХО, C₉H₆N₂O₃), в качестве оксидантных веществ (позитивного контроля) были использованы перакват (C₁₂H₁₄Cl₂N₂) и перекись водорода (H₂O₂).

В работе использованы генетически модифицированные штаммы *E. coli*, содержащие плазмиды, несущие оперон *luxCDABE* морской фотобактерии *Photobacterium luminescens*, поставленный под контроль соответствующих промоторов – *katG*, *soxS*, *colD*: *E. coli* MG1655 (*pSoxS-lux*), *E. coli* MG1655 (*pKatG-lux*), *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*). Данный оперон отвечает за работу люциферазы и обеспечивает биолюминесценцию, используемую в данном тесте в качестве репортерной функции. Штаммы любезно предоставлены Г.Б. Завильгельским и А.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, г. Москва). Генотипы штаммов, конструкции рекомбинантных плазмид, а также пороговая чувствительность биосенсоров *E. coli* MG1655 (*pSoxS-lux*) и *E. coli* MG1655 (*pKatG-lux*) к действию пераквата и перекиси водорода приведены в работах [11–13].

Для активации *PcolD*-промотора использовали 4-НХО в концентрации 75.0 мкг/мл и диоксидин в концентрации 0.01 мкг/мл, так как было установлено, что эти концентрации являются оптимальными для индукции *ColD*-оперонов биосенсорных штаммов. Для активации промотора *PkatG* использовали перекись водорода (Ferrain) в концентрации 0.005 мкг/мл. Для активации промотора *PsoxS* использовали перакват (1,1'-диметил-4,4'-дипиридилдихлорид, Sigma) в концентрации 5.0 мкг/мл.

Опыты по выявлению антигенотоксического потенциала изучаемых растительных экстрактов с помощью биолюминесцентного теста были представлены следующими вариантами: контрольная группа (дистиллированная вода); группа позитивного контроля (диоксидин, 0.01 мкг/мл; 4-НХО, 75.0 мкг/мл); группа с добавлением экстрактов изучаемых растений; группа с совместным добавлением экстрактов и генотоксикантов.

Опыты по изучению оксидантного и антиоксидантного потенциала БАВ с помощью биолюминесцентного теста были представлены следующими вариантами: контрольная группа (дистиллированная вода); группа позитивного контроля (паракват, 5.0 мкг/мл; перекись водорода, 0.005 мкг/мл); группа с добавлением экстрактов изучаемых растений; группа с сочетанным добавлением экстрактов растений и оксидантов.

Культуры клеток *E. coli* выращивали на полноценной среде Луриа–Бертани (LB) [14]. Как в жидкую, так и твердую среду добавляли антибиотик ампициллин (100.0 мкг/мл). Культивирование бактерий в жидкой питательной среде проводили при 37°C до ранней или средней логарифмической фазы. Ночную культуру разбавляли свежей средой до плотности 0.01–0.1 ед. Мак-Фарланда (концентрация 3×10^7 – 3×10^6 клеток/мл). Измерения проводили при помощи денситометра DEN-1B (Biosan). Затем суспензию подращивали в течение двух часов при 37°C при 200 об. до ранней логарифмической фазы. Аликвоты этой культуры (по 180–190 мкл) переносили в стерильные ячейки (находящиеся в стрипах планшета) и добавляли в них в зависимости от варианта эксперимента по 10 мкл тестируемого БАВ и/или 10 мкл индуктора окислительного стресса (кроме контрольных ячеек). В контрольные ячейки добавляли 10.0 мкл дистиллированной воды.

При оценке генотоксической и оксидантной активности в аликвоты культуры отдельно добавляли по 10.0 мкл БАВ или индукторов окислительного стресса. При оценке антигенотоксического и антиоксидантного потенциала в аликвоты культуры совместно добавляли по 10.0 мкл БАВ и индукторов окислительного стресса.

После обработки планшет с пробами помещали в микропланшетный ридер Infinite M1000 (Tecan, Австрия) и инкубировали при 30°C. Интенсивность биолюминесценции измеряли каждые 10 мин и выражали в условных единицах светового потока (relative light units – RLU).

Признаком достоверности индукции люминесценции считали статистически значимое превышение L_o над L_k , оцениваемое по t -критерию, где L_k – интенсивность люминесценции контрольной пробы (в усл. ед.), L_o – интенсивность люминесценции опытной пробы (в усл. ед.). Показатель антигенотоксического потенциала, или протекторной активности (A , %), вычисляли по формуле $A = \left(1 - \frac{L_a}{L_p}\right) \times 100$, где L_a – интенсивность люминесценции исследуемым воздействием в присутствии протектора; L_p – интенсивность люминесценции исследуемым воздействием; 100 – коэффициент для перевода в проценты. Антигенотоксический эффект считали умеренным

при ингибировании 25–40% индуцированного свечения, сильным – более 40%, при менее 25% эффект рассматривали как слабый и не признавали результат положительным.

Все эксперименты проводили в четырех независимых повторностях. В качестве характеристики протекторной активности исследуемой концентрации вещества использовали среднюю величину A в течение всего времени измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Изучение антигенотоксической и антиоксидантной активности БАВ из *Inula britannica**

С использованием биолюминесцентного теста (*lux*-биосенсоров) были изучены способности экстрактов девясила британского, содержащих биологически активные вещества, защищать штамм *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) от повреждений ДНК при действии диоксида и 4-НХО, инактивировать супероксид-анион при действии паракувата на биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (*pSoxS-lux*), инактивировать гидроперекиси и органические пероксиды при действии перекиси водорода на биосенсорный штамм *E. coli* MG1655 (*pKatG-lux*).

Полученные результаты показали, что экстракты БАВ из подземной и надземной частей девясила британского обладают антигенотоксической и антиоксидантной активностью, однако степень ингибирования отрицательного действия зависела от концентрации БАВ (табл. 1, 2; рис. 1).

Экстракты БАВ из подземной части девясила британского при концентрациях 0.5, 5.0, 50.0 мкг/мл дали слабый, а при 500.0 мкг/мл – сильный антигенотоксический эффект в отношении диоксида и 4-НХО. Антигенотоксическая активность БАВ из подземной части девясила британского в концентрации 500.0 мкг/мл в отношении 4-НХО составила $51.53 \pm 14.13\%$, а против диоксида – $57.81 \pm 4.60\%$ (рис. 1). Экстракты БАВ из подземной части девясила британского оказали слабое антиоксидантное действие в концентрациях 0.5 и 5.0 мкг/мл и умеренное – в концентрации 50.0 мкг/мл в отношении паракувата. Экстракты в концентрации 5.0 и 50.0 мкг/мл проявили слабую антиоксидантную активность в отношении перекиси водорода. БАВ при самой высокой концентрации, равной 500.0 мкг/мл, проявили сильную антиоксидантную активность в отношении всех использованных оксидантов – перекиси водорода и паракувата. Антиоксидантная активность БАВ из подземной части девясила британского в концентрации 500.0 мкг/мл в отношении перекиси водорода составила $44.87 \pm 0.87\%$, а в отношении паракувата – $55.15 \pm 0.99\%$ (рис. 1).

Таблица 1. Влияние экстрактов надземной и подземной частей (мкг/мл) девясила британского (*Inula britannica*) на люминесценцию* бактерий штамма *E. coli* MG1655 (pColD-*lux*), индуцированную 4-НХО и диоксином

Вариант опыта	Надземная часть					Подземная часть				
	0	0.5	5.0	50.0	500.0	0	0.5	5.0	50.0	500.0
Экстракт (контроль)	1414.63 ± ± 14.37	978.56 ± ± 72.54	897.47 ± ± 67.65	797.92 ± ± 42.18	544.64 ± ± 27.26	1990.34 ± ± 65.03	1931.11 ± ± 85.08	1324.17 ± ± 40.82	1207.33 ± ± 27.42	790.92 ± ± 37.17
4-НХО, 75.0 мкг/мл + экстракт	3845.89 ± ± 114.09	4029.86 ± ± 220.28	3347.94 ± ± 47.63	3043.14 ± ± 73.27	891.08 ± ± 14.13	3063.17 ± ± 89.40	3158.83 ± ± 112.04	2658.32 ± ± 137.21	2383.85 ± ± 262.92	1456.54 ± ± 385.06
Диоксидин, 0.01 мкг/мл + экстракт	4795.14 ± ± 258.62	3809.17 ± ± 296.62	3664.19 ± ± 202.03	3999.08 ± ± 232.70	1292.89 ± ± 70.39	4814.1 ± ± 117.18	4387.42 ± ± 151.77	3771.83 ± ± 172.72	4593.19 ± ± 177.93	2015.83 ± ± 174.08

* В условных единицах светового потока (relative light units – RLU).

Таблица 2. Влияние экстрактов надземной и подземной частей (мкг/мл) девясила британского (*Inula britannica*) на люминесценцию* бактерий штамма *E. coli* MG1655 (pKatG-*lux*), индуцированную перекисью водорода, и бактерий штамма *E. coli* MG1655 (pSoxS-*lux*), индуцированную паракватом

Вариант опыта		Надземная часть					Подземная часть				
		0	0.5	5.0	50.0	500.0	0	0.5	5.0	50.0	500.0
Экстракт (контроль)	Штамм	3775.29 ± ± 48.54	3386.88 ± ± 627.42	4296.81 ± ± 605.72	22127.94 ± ± 361.82	11744.38 ± ± 275.31	3632.75 ± ± 73.56	3379.33 ± ± 552.19	3385.50 ± ± 694.29	3970.58 ± ± 300.71	12328.67 ± ± 310.76
Перекись водорода, 0.005 мкг/мл + экстракт	<i>E. coli</i> MG1655 (pKatG- <i>lux</i>)	34223.34 ± ± 591.04	35736.19 ± ± 1003.21	34094.31 ± ± 772.18	31697.38 ± ± 440.94	18212.56 ± ± 187.71	35386.04 ± ± 185.63	41674.33 ± ± 4144.05	32996.75 ± ± 852.21	31114.33 ± ± 1852.41	19504.58 ± ± 215.60
Экстракт (контроль)	Штамм	7113.68 ± ± 121.63	5645.17 ± ± 122.83	5424.04 ± ± 87.43	4488.25 ± ± 60.64	3353.96 ± ± 85.53	7773.99 ± ± 91.24	5924.42 ± ± 51.75	6023.38 ± ± 136.42	5217.71 ± ± 91.91	3734.46 ± ± 109.94
Паракват, 5.0 мкг/мл + экстракт	<i>E. coli</i> MG1655 (pSoxS- <i>lux</i>)	8843.50 ± ± 143.94	8352.96 ± ± 169.50	8051.08 ± ± 158.77	5751.96 ± ± 61.22	4060.54 ± ± 77.56	10010.73 ± ± 61.08	9992.58 ± ± 209.51	9659.63 ± ± 105.89	7465.13 ± ± 118.00	4490.17 ± ± 103.77

* В условных единицах светового потока (relative light units – RLU).

Экстракты БАВ из надземной части в концентрациях 0.5 и 50.0 мкг/мл дали слабый, а в концентрации 5.0 мкг/мл – умеренный антигенотоксический эффект в отношении диоксида. Слабая антигенотоксическая активность была выявлена и в отношении 4-НХО, но в концентрациях 5.0 и 50.0 мкг/мл. БАВ в концентрации 500.0 мкг/мл проявили сильную антигенотоксическую активность в отношении как диоксида, так и 4-НХО. Антигенотоксическая активность БАВ из надземной части девясила британского в концентрации 500.0 мкг/мл в отношении 4-НХО составила $76.75 \pm \pm 0.93\%$, а в отношении диоксида – $74.14 \pm \pm 1.28\%$ (рис. 1). Экстракты БАВ из надземной части в концентрациях 5.0 и 50.0 мкг/мл проявили слабую антиоксидантную активность в отношении перекиси водорода, а при 500.0 мкг/мл – сильную. Антиоксидантная активность экстрактов из надземной части также зависела от используемой концентрации. Так, БАВ в концентрациях 0.5 и

5.0 мкг/мл в отношении параквата проявили слабую активность, при концентрации 50.0 мкг/мл – умеренную, а при концентрации 500.0 мкг/мл – сильную. Антиоксидантная активность БАВ из надземной части девясила британского в концентрации 500.0 мкг/мл в отношении перекиси водорода составила $46.76 \pm \pm 0.56\%$, а в отношении параквата – $60.49 \pm \pm 6.02\%$ (рис. 1). Сравнительный анализ протекторной активности экстрактов БАВ из подземной и надземной частей девясила британского показал, что антигенотоксическая активность БАВ из надземной части в отношении 4-НХО и диоксида выше, чем из подземной части. Антиоксидантная активность БАВ из надземной части в отношении перекиси водорода и параквата также была выше, чем из подземной. Однако статистически значимого различия не выявлено, за исключением протекторного потенциала БАВ из надземной части в концентрациях

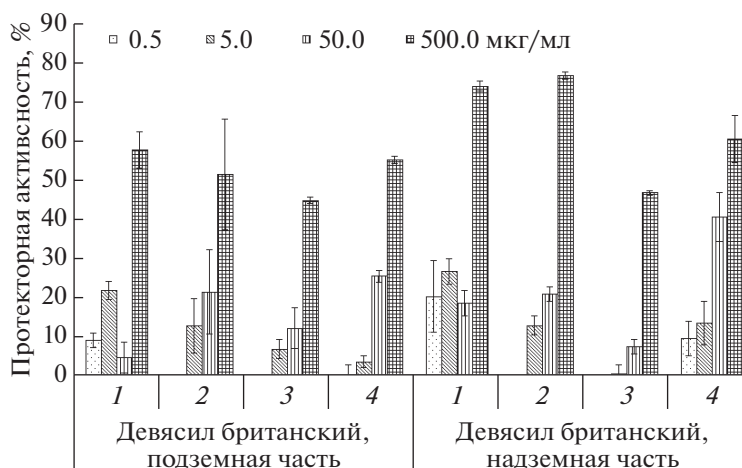


Рис. 1. Протекторная активность БАВ из подземной и надземной частей девясила британского в отношении диоксида (1), 4-НХО (2), перекиси водорода (3) и параквата (4).

50.0 и 500.0 мкг/мл по сравнению с подземной частью в отношении диоксида ($p < 0.05$).

Изучение антигенотоксической и антиоксидантной активности БАВ из *Limonium gmelinii*

Аналогичные вышеописанным были проведены исследования антигенотоксического и антиоксидантного потенциалов БАВ в растительных экстрактах кермека Гмелина. Установлено, что экстракты из подземной и надземной частей обладают антигенотоксической и антиоксидантной активностью, однако степень ингибирования повреждающего действия используемых в работе генотоксических и оксидантных веществ зависела от концентрации БАВ (табл. 3, 4). Однако экстракт из надземной части в концентрации 50.0 мкг/мл вызывал 10-кратное увеличение ответа сенсора рKatG-*lux* на окислительный стресс, что указывает на наличие прооксидантных

свойств у БАВ кермека Гмелина. БАВ в концентрациях 0.5, 5.0 и 50.0 мкг/мл из подземной части растения проявили слабый (в отношении 4-НХО), умеренный (в отношении диоксида) антигенотоксический эффект и слабый (в отношении параквата) и умеренный (в отношении перекиси водорода) антиоксидантный эффект (рис. 2). Наиболее сильный антигенотоксический и антиоксидантный эффекты дали растворы БАВ в концентрации 500.00 мкг/мл. Так, антигенотоксическая активность БАВ из подземной части растения в концентрации 500.00 мкг/мл в отношении диоксида составила $76.52 \pm 0.52\%$, а в отношении 4-НХО – $80.32 \pm 0.76\%$. Антиоксидантная активность БАВ из подземной части кермека Гмелина в концентрации 500.0 мкг/мл в отношении перекиси водорода составила $61.15 \pm 1.97\%$, а в отношении параквата – $67.91 \pm 0.33\%$ (рис. 2).

Экстракты БАВ в концентрациях 0.5, 5.0 и 50.0 мкг/мл из надземной части кермека Гмелина проявили умеренный антигенотоксический эф-

Таблица 3. Влияние экстрактов надземной и подземной частей (мкг/мл) кермека Гмелина (*Limonium gmelinii*) на люминесценцию* бактерий штамма *E. coli* MG1655 (pColD-*lux*), индуцированную 4-НХО и диоксином

Вариант опыта	Надземная часть					Подземная часть				
	0	0.5	5.0	50.0	500.0	0	0.5	5.0	50.0	500.0
Экстракт (контроль)	1062.84 ± 19.12	1228.28 ± 82.36	1250.86 ± 99.93	1142.22 ± 95.13	678.47 ± 62.96	1379.99 ± 46.03	967.83 ± 19.67	915.67 ± 25.33	817.58 ± 16.57	424.42 ± 13.67
4-НХО, 75.0 мкг/мл + экстракт	10933.83 ± 337.23	7903.92 ± 550.084	8223.75 ± 432.794	7785.72 ± 198.087	1253.22 ± 18.18	2702.89 ± 46.20	2378.11 ± 35.91	2237.17 ± 32.48	2104.86 ± 81.27	531.14 ± 13.66
Диоксидин, 0.01 мкг/мл + экстракт	7691.86 ± 221.22	4216.61 ± 159.37	5265.97 ± 237.40	9954.39 ± 300.68	1990.69 ± 107.39	3579.667 ± 122.44	2711.53 ± 65.89	2683.39 ± 42.83	3015.17 ± 304.77	838.78 ± 14.81

* В условных единицах светового потока (relative light units – RLU).

Таблица 4. Влияние экстрактов надземной и подземной частей (мкг/мл) кермека Гмелина (*Limonium gmelinii*) на люминесценцию* бактерий штамма *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), индуцированную перекисью водорода, и бактериальным штаммом *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), индуцированную паракватом

Вариант опыта		Экстракт кермека Гмелина, мкг/мл									
		надземная часть					подземная часть				
		0	0.5	5.0	50.0	500.0	0	0.5	5.0	50.0	500.0
Экстракт (контроль)	Штамм <i>E. coli</i>	3183.03 ± ± 69.02	3655.56 ± ± 194.77	23291.50 ± ± 859.65	32028.06 ± ± 331.06	13922.38 ± ± 233.37	3799.23 ± ± 47.97	3581.94 ± ± 559.28	10292.13 ± ± 1103.88	25903.56 ± ± 3595.22	12747.13 ± ± 488.63
Перекись водорода, 0.005 мкг/мл + экстракт	Штамм MG1655 (pKatG-lux)	37089.33 ± ± 1039.23	30905.75 ± ± 685.87	32371.42 ± ± 2776.918	28631.83 ± ± 1286.725	15146.17 ± ± 861.48	51378.19 ± ± 1008.27	35142.06 ± ± 1515.97	37404.44 ± ± 4247.03	38165.38 ± ± 1632.06	19912.31 ± ± 722.67
Экстракт (контроль)	Штамм <i>E. coli</i>	7189.47 ± ± 153.74	5274.75 ± ± 61.29	5697.17 ± ± 156.03	4474.54 ± ± 132.00	3073.83 ± ± 225.04	8694.18 ± ± 186.42	7140.38 ± ± 291.53	7057.88 ± ± 83.71	6543.92 ± ± 121.46	3157.75 ± ± 98.53
Паракват, 5.0 мкг/мл + экстракт	Штамм MG1655 (pSoxS-lux)	11042.65 ± ± 181.17	9911.21 ± ± 123.27	9936.50 ± ± 198.62	7090.67 ± ± 105.49	3947.38 ± ± 142.91	12288.02 ± ± 332.83	11919.13 ± ± 65.94	11725.38 ± ± 249.41	11179.79 ± ± 959.25	3941.67 ± ± 94.44

* В условных единицах светового потока (relative light units – RLU).

фект в отношении 4-НХО. Результаты, отражающие способность экстрактов БАВ из надземной части кермека защищать ДНК штамма *E. coli* MG1655 (pColD-lux) от генотоксического действия диоксида были противоречивыми. При концентрации 50.0 мкг/мл растительные экстракты увеличили уровень повреждений ДНК, вызванных диоксидом; при концентрации 5.0 мкг/мл проявили умеренную антигенотоксическую активность; при концентрациях 0.5 и 500.0 мкг/мл – сильную. Экстракты БАВ из надземной части кермека в концентрациях 0.5, 5.0, 50.0 мкг/мл проявили слабую антиоксидантную активность в отношении перекиси водорода; в концентрациях 0.5 и 5.0 мкг/мл – в отношении параквата и умеренную в концентрации 50.0 мкг/мл. Растительные экстракты в концен-

трации 500.00 мкг/мл проявили сильную антигенотоксическую и антиоксидантную активность в отношении всех использованных в работе генотоксикантов и оксидантов. Так, протекторная активность БАВ из надземной части кермека в отношении 4-НХО составила $88.51 \pm 0.36\%$, а в отношении диоксида – $74.06 \pm 1.58\%$. Антиоксидантная активность БАВ из подземной части кермека в отношении перекиси водорода составила 59.04% , а в отношении параквата – $64.25 \pm 1.19\%$ (рис. 2).

Сравнительный анализ протекторной активности экстрактов БАВ из подземной и надземной частей растений показал, что антигенотоксическая активность в отношении 4-НХО выше у экстрактов из надземной части по сравнению с экстрактами из подземной части. Что касается диоксида, то наблюдается противоположная картина – антигено-

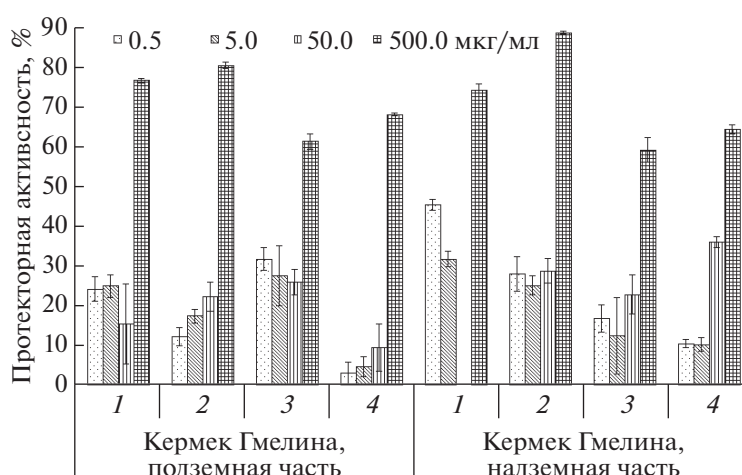


Рис. 2. Протекторная активность БАВ из подземной и надземной частей кермека Гмелина в отношении диоксида (1), 4-НХО (2), перекиси водорода (3) и параквата (4).

токсическая активность экстрактов из подземной части выше, чем из надземной части. Антиоксидантная активность БАВ из подземной части кермека в отношении перекиси водорода и параквата была выше, чем из надземной части. Однако статистически значимых различий не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки токсического и мутагенного потенциала различных химических соединений в качестве экспресс-методов используют микробиологические тест-системы. В настоящее время наряду с тестом Эймса начинают широко использовать бактериальные *lux*-биосенсоры, которые представляют собой комплекс из сенсорных биолюминесцентных штаммов, отвечающих изменением люминесценции на специфические для каждого штамма токсины, и регистрирующий эти изменения люминометр.

Нами была предпринята попытка изучить антигенотоксические свойства биологически активных веществ лекарственных растений *I. britannica* и *L. gmelinii*, произрастающих на территории Казахстана и широко используемых в народной медицине, с помощью биолюминесцентного теста.

Генотоксическую и антигенотоксическую активность БАВ определяли на штамме *E. coli* MG1655 (pColD-*lux*), а оксидантную и антиоксидантную – на штаммах *E. coli* MG1655 (pSoxS-*lux*) и *E. coli* MG1655 (pKatG-*lux*).

Биосенсор с плазмидой pColD фиксирует наличие в клетке факторов, вызывающих повреждение ДНК. В гибридной плазмиде pColD транскрипция генов люминесценции находится под контролем SOS-промотора гена *cda* (получен из плазмиды pColD-CA23, содержащей ген *colD*, кодирующий синтез колицина). ColD-биосенсор демонстрирует высокую чувствительность к генотоксическому действию таких соединений, как цисплатин, 4-НХО, перекись водорода. Продукт гена *colD* колицин необходим клеткам только в стрессовых условиях, выделяясь во внешнюю среду в качестве киллера. ColD-биосенсор можно использовать для первичной детекции в среде генотоксических агентов и для определения их концентрационной зависимости [12]. Биосенсоры с промоторами PkatG и PsoxS фиксируют наличие в среде окислителей, образующих в клетке гидроперекиси и супероксид-анион-радикал. Характерным признаком окислительного стресса у *E. coli* является индукция генов антиоксидантной системы и повышение активности антиоксидантных ферментов, кодируемых этими генами [15]. Поэтому в генетических конструкциях, составляющих основу биосенсоров, реагирующих на окислительный стресс, были использованы промоторы именно этих генов. Ген *katG* определяет

синтез каталазы; его промотор PkatG (белок-активатор OxyR) специфически реагирует на перекись водорода и органические пероксиды. Промотор PsoxS (белок-активатор SoxR) специфически реагирует на супероксид-анион-радикалы.

Для активации PcolD-промотора использовали 4-НХО и диоксидин. 4-НХО является сильным мутагеном и канцерогеном, ингибитором клеточных делений, обладающим высоким уровнем кластогенной активности, и широко используется в качестве позитивного контроля при изучении ДНК-повреждающей активности различных химических соединений [16]. Диоксидин – антимикробный препарат широкого спектра действия, в основе которого лежит нарушение биосинтеза ДНК микробной клетки, приводящее к глубоким изменениям структуры нуклеоида уже при действии субингибирующих концентраций [17]. Диоксидин индуцирует мутации в клетках бактерий, хромосомные aberrации и микроядра в клетках костного мозга мышей, разрывы ДНК в клетках ряда органов, а также доминантные летальные мутации в половых клетках самцов мышей [18, 19]. В условиях анаэробнозиса, в том числе и в инфицированном организме, диоксидин (как и другие производные ди-N-окси хиноксалина) активизирует свободнорадикальные процессы, индуцируя образование активных форм кислорода [17]. Для активации промотора pKatG часто используют перекись водорода, являющуюся классическим оксидантом. Для активации промотора PsoxS использовали паракват, способный к генерации супероксид-анион-радикала [20].

Проведенные исследования показали, что ответ штамма *E. coli* MG1655 (pColD-*lux*) при добавлении БАВ из подземной и надземной частей *I. britannica* и *L. gmelinii* в концентрациях 0.5, 5.0, 50.0 и 500.0 мкг/мл был статистически значимо ниже значений данного показателя при воздействии диоксидина и 4-НХО ($p < 0.001$). Полученные результаты указывают на отсутствие генотоксической активности у исследуемых экстрактов. Согласно ответам на сенсорах pKatG-*lux* и pSoxS-*lux* растительные экстракты девясила и кермека при использованных концентрациях не обладают оксидантной активностью, за исключением экстракта из надземной части кермека Гмелина в концентрации 50.0 мкг/мл.

Растительные экстракты девясила и кермека при совместном воздействии с токсикантами статистически значимо снижали люминесценцию pColD-*lux*, pKatG-*lux* и pSoxS-*lux* ($p < 0.05$), индуцированную соответственно 4-НХО и диоксидином, перекисью водорода и паракватом. Степень ингибирования повреждающего действия генотоксикантов и оксидантов зависела от концентрации БАВ. При концентрации 500.0 мкг/мл БАВ отмечены сильный антигенотоксический и

антиоксидантный эффект в используемой тест-системе.

Ранее было установлено, что основными группами БАВ в экстрактах *L. gmelinii* являются дубильные вещества, полисахариды, флавоноиды, кумарины, витамины, каротиноиды и сапонины, а в экстрактах *I. britannica* доминируют сапонины, дубильные вещества, витамины, полисахариды. Известно, что большинство БАВ обладают протекторными свойствами [9, 10]. Например, флавоноиды — известные антиоксиданты и способны к нейтрализации всех видов свободных радикалов, в частности супероксида и гидроксильных радикалов с помощью хелатирования [21, 22]. Многие флавоноиды обладают антимуtagenным действием. Например, кверцетин и лютионин снижали образование микроядер и хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, обработанных пищевыми мутагенами [1]. В литературе встречаются сведения, что некоторые БАВ, например флавоноиды, витамины С и Е, каротиноиды, наряду с антиоксидантными способны проявлять прооксидантные свойства при определенных условиях [23].

В работах De Flora, Bouhlef с соавт., Wu и Yen [24–26] показано, что антиоксидантная активность является одним из механизмов антигенотоксичности.

Все биологически активные вещества природного происхождения играют огромную роль в организме, хотя относятся к продуктам вторичного обмена. Фитосоединения оказывают влияние на процессы метаболизма и обезвреживания чужеродных веществ, в числе которых канцерогены и мутагены. Они обладают способностью связывать свободные радикалы и реакционноспособные метаболиты чужеродных веществ, ингибируют ферменты, активирующие ксенобиотики, и активируют ферменты детоксикации [27]. Необходимо всестороннее изучение фитосоединений как потенциальных протекторов при токсическом, генотоксическом и мутагенном действии различных загрязнителей окружающей среды на организм.

В настоящем исследовании впервые в биолюминесцентном тесте была показана антигенотоксическая активность экстрактов БАВ из *I. britannica* и *L. gmelinii* на штамме *E. coli* MG1655 pColD-*lux*, а также антиоксидантная активность на штаммах *E. coli* MG1655 pSoxS-*lux* и *E. coli* MG1655 pKatG-*lux*.

В биолюминесцентном тесте регистрация ответа происходит по свечению бактерий и не требует дополнительных манипуляций, таких как лизис бактерий после инкубации и определение ферментативной активности. Непосредственный анализ люминесценции бактерий позволяет одновременно регистрировать зависимость ответа

как от концентрации тестируемого соединения, так и от продолжительности инкубирования в динамике. Биолюминесцентный тест отличается высокой чувствительностью, быстротой выполнения и возможностью автоматизации, что было показано рядом авторов [11–13, 28]. Это позволяет использовать данный тест не только для скрининга химических соединений на оксидантную и генотоксическую активность, но и для первичного скрининга фитосоединений на антиоксидантную и антигенотоксическую активность.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК ГР № 0115РК00378 (руководитель С.Ж. Колумбаева), частично финансировалась Программой Президиума РАН “Живая природа” (руководитель проекта С.К. Абилов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абилов С.К., Глазер В.М. Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие. М.; СПб.: Нестор-История, 2015. 304 с.
2. Natarajan A., Molnar P., Sieverdes K. et al. Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity // *Toxicol. in Vitro*. 2006. V. 20. № 3. P. 375–381. doi 10.1016/j.tiv.2005.08.014
3. Holland N.T., Duramad P., Rothman N. et al. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *in vitro* and *in vivo* // *Mutat. Res. / Gen. Toxicol. Environm. Mutagenesis*. 2002. V. 521. № 1–2. P. 165–178. doi 10.1016/S1383-5718(02)00237-1
4. Гончарова Р.И., Кужур Т.Д. Молекулярные основы применения антимуtagenов в качестве антиканцерогенов // *Экол. генетика*. 2005. Т. 3. № 3. С. 19–32.
5. Дурнев А.Д. Методические аспекты исследований по модификации химического мутагенеза // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2008. Т. 146. № 9. С. 281–287. doi 10.1007/s10517-008-0273-5
6. Uzun F., Kalender S., Durak D. et al. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E // *Food Chem. Toxicol.* 2009. V. 47. № 8. P. 1903–1908. doi 10.1016/j.fct.2009.05.001
7. Słoczyńska K., Powroźnik B., Pękala E., Waszkielewicz A.M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action // *J. Appl. Genetics*. 2014. V. 55. № 2. P. 273–285. doi 10.1007/s13353-014-0198-9
8. Seca A.M.L., Grigore A., Pinto D.C.C.A., Silva A.M.S. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses // *J. Ethnopharmacology*. 2014. V. 154. № 2. P. 286–310. doi 10.1016/j.jep.2014.04.010
9. Колумбаева С.Ж., Ловинская А.В., Жусупова А.И. и др. Токсическая и мутагенная активность биологически активных веществ из растений *Limonium gmelinii* семейства Plumbaginaceae (=Limoniaceae Lincz.) // *Вестн. КазНУ. Сер. биол.* 2016. Т. 66. № 1. С. 144–153.
10. Колумбаева С.Ж., Ловинская А.В., Ахтаева Н.З. и др. Токсическая и мутагенная активность биологически активных веществ из растений *Inula britannica* L.

- семейства Compositae // Вестн. КазНУ. Сер. биол. 2016. Т. 69. № 4. С. 134–145.
11. Манухов И.В., Котова В.Ю., Мальдов Д.Г. и др. Индукция окислительного стресса и SOS-ответа в бактериях *Escherichia coli* растительными экстрактами: роль гидроперекисей и эффект синергизма при совместном действии с цисплатиной // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 590–597. doi 10.1134/S0026261708050020
 12. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завигельский Г.Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16–25. doi 10.1134/S0003683810080089
 13. Zavilgelsky G.B., Kotova V.Y., Manukhov I.V. Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide // Mutat. Res. 2007. V. 634. № 1–2. P. 172–176. doi 10.1016/j.mrgentox.2007.07.012
 14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
 15. Farr S.B., Kogota T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // Microbiol. Rev. 1991. V. 55. P. 561–585.
 16. Downes D.J., Chonofsky M., Tan K. et al. Characterization of the mutagenic spectrum of 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) in *Aspergillus nidulans* by whole genome sequencing // G3 (Bethesda). 2014. V. 4. № 12. P. 2483–2492. doi 10.1534/g3.114.014712
 17. Падейская Е.Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции // Инфекции и антимикробная терапия. 2001. № 5. С. 150–155.
 18. Сычева Л.П., Коваленко М.А., Шереметьева С.М. и др. Изучение мутагенного действия диоксида полиорганным микроядерным методом // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2004. Т. 138. № 8. С. 188–190.
 19. Орджоникидзе К.Г., Занадворова А.М., Абилев С.К. Изучение органоспецифичности генотоксического действия циклофосфана и диоксида методом щелочного гель-электрофореза // Генетика. 2011. Т. 47. № 6. С. 853–855.
 20. Rzezniczak T.Z., Douglas L.A., Watterson J.H. et al. Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress // Analyt. Biochem. 2011. V. 419. № 2. P. 345–347. doi 10.1016/j.ab.2011.08.023
 21. Havsteen B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids // Pharmacol. Ther. 2002. V. 96. № 2–3. P. 67–202. doi 10.1016/S0163-7258(02)00298-X
 22. Lin Y., Shi R., Wang X. et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy // Curr. Cancer Drug Targets. 2008. V. 8. № 2. P. 634–646. doi 10.2174/156800908786241050
 23. Скопичев В.Г., Боголюбова И.О., Жичкина Л.В., Максимюк Н.Н. Экологическая физиология. СПб.: ООО “Квадро”, 2014. 480 с.
 24. De Flora S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis // Mutat. Res. 1998. V. 402. P. 151–158.
 25. Bouhrel I., Mansour H.B., Limem I. et al. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2007. V. 23. № 1. P. 56–63. doi 10.1016/j.etap.2006.07.001
 26. Wu Ch.-H., Yen G.-Ch. Antigenotoxic properties of Cassia tea (*Cassia tora* L.): Mechanism of action and the influence of roasting process // Life Sci. 2004. V. 76. № 1. P. 85–101. doi 10.1016/j.lfs.2004.07.011
 27. Tsao R., Deng Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals // J. Chromatography B. 2004. V. 812. P. 85–99. doi 10.1016/j.jchromb.2004.09.028
 28. Игонина Е.В., Марсова М.В., Абилев С.К. Лух-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // Экол. генетика. 2016. Т. XIV. № 4. С. 52–62. doi 10.17816/ecogen14452-62

Antigenotoxic Activity of Biologically Active Substances from *Inula britannica* and *Limonium gmelinii*

A. V. Lovinskaya^{a,*}, S. Zh. Kolumbayeva^a, T. M. Shalakhmetova^a,
M. V. Marsova^b, and S. K. Abilev^{b,c,**}

^aAl-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040 Kazakhstan

^bVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^cDepartment of Genetics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: annalovinska@rambler.ru

**e-mail: abilev@vigg.ru

The antigenotoxic and antioxidant activities of biologically active substances of extracts from *Inula britannica* L. and *Limonium gmelinii* (Willd.) Kuntze in *E. coli* strains MG1655 (pColD-*lux*), MG1655 (pSoxS-*lux*), and MG1655 (pKatG-*lux*) were studied by the bioluminescent test. Plant extracts from *I. britannica* and *L. gmelinii* in all used concentrations (0.5, 5.0, 50.0, and 500.0 µg/mL) had no genotoxic or oxidant activity. The extracts statistically significantly reduced the bioluminescence intensity of the pColD-*lux*, pKatG-*lux*, and pSoxS-*lux* sensors ($p < 0.05$) induced by 4-NQO and dioxidine, hydrogen peroxide, and paraquat, respectively. The activity of the extracts depended on their concentration; the greatest antigenotoxic and antioxidant effects were detected at a concentration of 500.0 µg/mL.

Keywords: *lux* biosensors, biologically active substances, antigenotoxic, oxidative stress, antioxidant.