

ТОКСИЧЕСКАЯ И МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТЕНИЙ *INULA BRITANNICA* L. СЕМЕЙСТВА *COMPOSITAE*

*Колумбаева С.Ж., Ловинская А.В., Ахтаева Н.З., Литвиненко Ю.А., Воронова Н., Илиясова А.И., Аликул А.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, г. Алматы

*E-mail: S_kolumb@mail.ru

Выделены биологически активные вещества (БАВ) из подземной и надземной частей растений девясила британского (*Inula britannica* L., сем. Compositae). Определены показатели доброкачественности девясила (влажность, общая зола); показатели экстрактивных веществ, аминокислотный и жирнокислотный состав. Проведена идентификация основных групп БАВ. Изучено токсическое и мутагенное действие БАВ из надземной и подземной частей растений *Inula britannica* на семена ячменя в тестах по учету всхожести семян и по учету хромосомных aberrаций в клетках корневой зародышевой меристемы. Установлено, что комплекс БАВ в использованных концентрациях (25,0; 50,0 и 100,0 мг/л) не оказывал фитотоксического и мутагенного действия. Обработка семян ячменя водными растворами экстрактов из девясила при всех концентрациях не снизило их всхожести по сравнению с контрольными растениями. Частота структурных нарушений хромосом и число хромосомных aberrаций на 100 просмотренных метафаз в корневой зародышевой меристеме семян ячменя, обработанных водными растворами БАВ, статистически значимо не отличались от аналогичных показателей у необработанных растений. Метилметансульфонат, используемый в качестве положительного контроля, увеличил изучаемые показатели в несколько раз как по сравнению с контрольным вариантом, так и семенами, обработанными экстрактами, содержащими БАВ.

Ключевые слова: биологически активные вещества, мутаген, всхожесть семян, хромосомные aberrации, *Inula britannica*.

Введение

Современный период развития биосферы характеризуется глобальным загрязнением окружающей среды продуктами хозяйственной деятельности человека. Среда обитания современного человека характеризуется присутствием в ней мутагенных факторов различной природы. Многие из них обладают способностью повышать эволюционно сложившийся оптимальный уровень мутирования, свойственный для каждого вида, включая человека. Радикальным методом предупреждения химического мутагенеза является устранение из окружающей среды веществ с повышенным мутационным потенциалом. Однако в силу ряда причин это не представляется возможным, так как остаются сферы деятельности человека, которые будут связаны с непосредственным контактом с мутагенами химической и физической природы. Подобная ситуация делает актуальными поиск и разработку фармакологических средств защиты генетических структур для профилактики мутагенных эффектов [1].

В настоящее время ведется активный поиск и изучение природных средств, призванных предотвращать или, по крайней мере, уменьшить воздействие химических агентов на генетический аппарат человека и многих других живых организмов. Одним из перспективных источников биологически активных веществ (БАВ), обладающих протекторными свойствами (антиоксидантной и антимуtagenной), являются лекарственные растения. Как правило, БАВ обладают низкой токсичностью и аллергенностью, а также возможностью длительного применения без побочных эффектов [2, 3]. Многие растения семейства *Compositae* обладают рядом лекарственных свойств. Фитопрепараты из растений рода *Inula* обладают противовоспалительными, антимикробными, бронхолитическими, противоаллергическими, секреторолитическими, желчегонными, отхаркивающими, ранозаживляющими, мочегонными свойствами [4]. Растения рода *Achillea* имеют кровоостанавливающий, противовоспалительный эффекты, применяют против желудочно-кишечных расстройств, при болезнях печени и желчного пузыря, сердечно-сосудистых заболеваниях [5]. Фармакологическое действие растений из рода *Cichorium* обладают противораковым, гипогликемическим, гепатопротекторным, противоязвенными эффектами [6]. Однако в растительных экстрактах различных видов растений данных родов

присутствуют алкалоиды и другие БАВ, которые могут быть токсичны [7, 8]. Многочисленные исследования показывают, что лекарственные растения в зависимости от дозы применения могут обладать мутагенной и антимутагенной активностью [9-12]. Поэтому необходимо всестороннее изучение растительных экстрактов, в том числе токсических и мутагенных свойств, на различных тест-объектах и тест-системах.

Целью настоящего исследования явилось изучение фитотоксической и мутагенной активности экстрактов из надземной и подземной частей растений *Inula britannica* L. (сем. *Compositae*), эффективно продуцирующих биологически активные вещества.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили семена ярового двурядного ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Байшешек, районированного в Алматинской области. Ячмень обладает низкой частотой спонтанного мутирования и одновременно достаточно высокой чувствительностью к внешним повреждающим воздействиям, что делает его уникальным тест-объектом для индикации биологического действия ксенобиотиков [13].

В качестве испытуемых веществ на токсическую и мутагенную активность были взяты водные растворы экстрактов из надземной и подземной частей растений девясила британского (*Inula britannica* L., сем. *Compositae*). Были проведены полевые экспедиционные выезды в 2015 году для заготовки растительного сырья в естественных условиях произрастания (в Райымбекский район Алматинской области и в Шиелыйский район Кызылординской области) для их последующего фитохимического исследования.

По общепринятым методикам ГОСТов и Государственной Фармакопеи Казахстана (ГФ РК) были определены показатели доброкачественности *I. britannica* (влажность, общая зола); показатели экстрактивных веществ разнополярными растворителями (водой, 70% и 90% водно-этиловым, 50% водным ацетоном, ацетоном, хлороформом), аминокислотный и жирнокислотный состав [14, 15].

Для выделения биологически активных соединений проведен подбор растворителей, оптимизирован технологический режим. С целью оптимизации процесса экстракции биологически активных веществ изучено влияние соотношений: сырье-растворитель, время экстракции, температура. Для идентификации биологически активных веществ использовали методы одно- и двумерной бумажной, тонкослойной хроматографии на закрепленном слое сорбента. Для количественного определения основных групп БАВ использовали методы экстракции, титрования, УФ-спектрометрии [14, 15]. Методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «CARLO ERBA – 4200» (Carlo Erba, Италия) было определено количественное содержание аминокислот и жирных кислот изученных образцов растений. Состав аминокислот определяли по известной методике по времени удерживания стандартных образцов [15].

Для определения количественного содержания аминокислот 1 г анализируемого вещества гидролизовали в 6Н соляной кислоте при 105°C в течение 24 часов, в ампулах, запаянных под струей аргона. Полученный гидролизат трижды выпаривали досуха на роторном испарителе при $t^0=40-50^{\circ}\text{C}$ и давлении 1 атмосфера. Образовавшийся осадок растворяли сульфосалициловой кислотой. После центрифугирования (1500 об/мин) в течение 5 мин надосадочную жидкость пропускали через колонку с ионно-обменной смолой Даукс 50, Н-8, 200-400 меш, со скоростью 1 капля в сек. После этого смолу промывали раствором деионизированной воды и 0,5 Н уксусной кислоты, и затем смолу отмывали до нейтральной рН. Для элюирования аминокислот с колонки через нее пропускали 6Н NH_4OH со скоростью 2 капли в сек. Элюат досуха выпаривали на роторном испарителе под давлением 1 атм. и температуре 40-50°C. Затем добавляли 1,5 % раствора SnCl_2 , 2,2-диметоксипропана и насыщенного соляной кислотой пропанола, нагревали до 110°C, выдерживая эту температуру в течение 20 мин, а затем содержимое вновь выпаривали на роторном испарителе.

На следующем этапе в колбу добавляли свежеприготовленный ацелирующий реагент (уксусный ангидрид, триэтиламин и ацетон в соотношении 1:2:5) и нагревали при температуре 60°C в течение 1,5-2 мин. Затем образец снова выпаривали на роторном испарителе досуха и добавляли этилацетат и насыщенный раствор NaCl. Содержимое колбы тщательно перемешивали и по мере того, как отчетливо образуется 2 слоя жидкостей – берут верхний (этиацетатный) для газохроматографического анализа.

Для построения калибровочного графика использовали доминирующую в составе сырья аминокислоту или смесь равных количеств нескольких аминокислот (фенилаланин, аспарагин, пролин, глутаминовая) в мерной колбе на 100 мл. Цвет должен совпадать по окраске анализируемого образца с нингидриновым реактивом. Для каждого анализа брали по 10 мл стандартного раствора, добавляли 10 мл нингидринового реактива (4 г нингидрина, 150 мл диоксана, 50 мл ацетатного буфера (0,2М раствора ацетата натрия и 0,2 М раствора уксусной кислоты в соотношении 7:3., pH 5,0) и 76 мг хлорида олова), нагревали в течение 15 мин при температуре бани 80-85°C и охлаждали. Для построения калибровочного графика в ряд колб помещали по 0,1; 0,2; 0,3...0,8 мл окрашенного раствора стандартного образца, объемы в колбах доводили до 50 мл и измеряли их оптическую плотность.

Для определения количественного содержания жирных кислот 1 объем образца экстрагировали 20 кратным объемом смеси хлороформа и метанола (2:1) в течение 5 минут. Затем содержимое фильтровали через бумажный фильтр до получения чистого экстракта, который выпаривали на роторном испарителе при температуре бани 30-40 °С досуха. После этого добавляли в колбу 10 мл метанола и 2-3 капли хлористого ацетила и метилировали при температуре 60-70°C в течение 30 минут. Затем метанол выпаривали на роторном испарителе, а образец экстрагировали 5 мл гексана и впрыскивали в газовый хроматограф.

Для определения токсической и мутагенной активности БАВ из девясила британского были использованы водные растворы экстрактов растений в концентрациях 25,0; 50,0; 100,0 мг/л и водный раствор метилметансульфоната в концентрации 5,0 мг/л (положительный контроль). Обработку каждым веществом (замачивание семян) проводили в течение 4-х часов. После каждой обработки семена промывали, слегка подсушивали и проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, при $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ в условиях термостата в течение 24 часов.

В качестве положительного контроля использовали классический мутаген метилметансульфонат (ММС, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_3\text{S}$) – алкилирующий агент прямого действия, который проявляет мутагенную активность в стандартных краткосрочных тестах *in vivo* и *in vitro*. Индуцирует SOS-ответ в ум-тесте на *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 и точковые мутации у бактерий без метаболической активации. У дрозофилы ММС вызывает рецессивные соматические и сцепленные с полом летальные мутации. Отмечены увеличение частоты сестринских хроматидных обменов и хромосомных aberrаций, а также неопластическая трансформация в культурах клеток грызунов. *In vivo* метилметансульфонат вызывает мутации в половых клетках мышей, а в соматических клетках грызунов - ДНК-повреждения, сестринские хроматидные обмены, хромосомные aberrации. В культуре клеток человека ММС индуцировал одноцепочечные разрывы и внеплановый синтез ДНК, генные мутации, микроядра и сестринские хроматидные обмены. ММС показывал токсическую и мутагенную активность на различных растительных тест-системах. ММС индуцировал хромосомные нарушения в корневой меристеме *Hordeum vulgare*, *Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana*. Все выше приведенные примеры, свидетельствующие о чрезвычайно широком спектре генетической активности ММС в различных тест-системах, обосновали выбор ММС в качестве положительного контроля в наших экспериментальных исследованиях [16, 17].

Токсичность изучаемых растительных экстрактов определяли по всхожести семян ячменя через 24 часа после последней обработки. Всхожесть семян – число проросших семян, выраженное в процентах от общего количества семян [18]. Мутагенную активность исследуемых растительных экстрактов определяли с помощью теста по учету хромосомных aberrаций. Цитогенетический тест информирует о частоте и типах структурных перестроек

(аббераций) хромосом и об изменениях в их числе. Для изучения соматических хромосом на стадии митоза, кариотипирования и учета хромосомных перестроек была использована меристематическая ткань кончика корня [19]. За 4 часа до первой фиксации семена переносили на 0,01% раствор колхицина для накопления метафазных пластинок. В качестве фиксатора использовали раствор этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1, по объему). Во всех вариантах проводили по 4 фиксации с интервалом в 3 часа. В качестве красителя использовали 0,54% раствор фуксинсернистой кислоты. Окрашенные корешки промывали в трех порциях свежеприготовленной сернистой воды, после чего проводили ферментативную мацерацию цитазой в течение 40-60 минут для разрушения межклеточного вещества и клеточной стенки. Полученные препараты помещали в морозильную камеру с температурой $-74\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 24 часа. Затем освобождали замороженный препарат от покровного стекла и пропускали через батарею спиртов для обезвоживания и получения постоянных цитологических препаратов.

Учет структурных нарушений хромосом проводили с помощью метафазного метода на микроскопе серии Olympus BX 43F (Olympus, Япония). В каждом варианте опыта просматривали от 400 до 500 метафаз. При анализе структурных нарушений хромосом учитывали не только общее количество нарушений, но и все типы хромосомных аббераций. Во всех вариантах опыта негативным контролем служил естественный мутационный процесс, протекающий в клетках корневой зародышевой меристемы семян ячменя, а позитивным контролем – уровень хромосомных аббераций, индуцированных ММС. Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами с использованием критерия Стьюдента. Во всех случаях определяли средние значения и стандартные ошибки среднего [20].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований были определены показатели доброкачественности сырья растений вида *I. britannica* из естественных условий произрастания. Исходя из данных таблицы 1, влажность соответствует показателю «не более 10%», общая зола – «не более 2%», что отвечает требованиям нормативно-технической документации [15].

Таблица 1 – Показатели доброкачественности растения вида *I. britannica*

Показатели доброкачественности	Содержание, %	
	подземная часть	надземная часть
Влажность	8,06	8,93
Общая зола	0,93	1,00

Для оптимального выделения биологически активных веществ из изучаемых видов растений был проведен подбор экстрагентов (вода, 70% и 90% водно-этиловый, хлороформ, ацетон), результаты которого представлены в таблице 2. Количественное содержание экстрактивных веществ для всех 3-х образцов доминировало в 50% водно-ацетоновом и 70% водно-этиловом спирте.

Из опробованных растворителей по качественному набору БАВ и количественному содержанию экстрактивных веществ оптимальными экстрагентами для всех органов растений девясила явились 70% этиловый спирт и 50% водный ацетон. В связи с тем, что 50% ацетон является токсичным, нами был использован 70% водно-этиловый спирт. Оценка состава основных групп биологически активных соединений проведена на основе качественных реакций, специфичных для каждой группы БАВ. В растениях были обнаружены: флавоноиды, аминокислоты, полисахариды, витамины С и В₂, органические кислоты, дубильные вещества и сапонины.

Таблица 2 – Содержание экстрактивных веществ в различных органах растения *I. britannica* в процентах (%) в перерасчете на абсолютно сухое сырье

Экстрагент	Содержание, %	
	подземная часть	надземная часть
90% этиловый спирт	10,00	1,00
70% этиловый спирт	36,48	41,85
Хлороформ	13,48	12,56
50% ацетон	32,44	40,95
Ацетон	30,67	28,16
Вода	25,12	22,69

Был определен качественный состав аминокислот и установлено, что в изученном виде растения *I. britannica* по количественному содержанию доминируют глутамин, аланин, пролин, аспарагин, серин, лейцин, аргинин и тирозин (таблица 3).

Таблица 3 - Аминокислотный состав *I. britannica*

Аминокислоты	Содержание, мг/100 г		Аминокислоты	Содержание, мг/100 г	
	надземная часть	подземная часть		надземная часть	подземная часть
Глутамин	2604	2285	Валин	386	320
Аланин	1210	1198	Треонин	380	305
Пролин	946	733	Метионин	350	112
Аспарагин	942	1162	Изолейцин	302	286
Серин	651	562	Триптофан	296	176
Лейцин	602	342	Лизин	270	210
Аргинин	512	448	Гистидин	185	130
Тирозин	509	342	Цистеин	75	53
Глицин	492	310	Оксипролин	17	5
Фенилаланин	402	330	Орнитин	14	3

Методом газожидкостной хроматографии проведен сравнительный компонентный анализ и определено количественное содержание жирных кислот для растения *I. britannica*. Идентифицировано 12 жирных кислот (линолевая, олеиновая, стеариновая, пальмитиновая, пентадециловая, арахионовая, пальмитолеиновая, эйкозотриеновая, миристиновая, эйкозендиеновая, линоленовая, арахиновая). По количественному содержанию из жирных кислот в *I. britannica* доминируют линолевая, олеиновая, стеариновая, пальмитиновая и пентадециловая кислоты (рисунок 1). Появление жирных кислот в растительном экстракте связано с гидролизом липидов в растениях. Глицериды жирных кислот являются физиологически активными, особенно глицериды некоторых жирных ненасыщенных кислот. К ним относятся линоленовая, олеиновая, линолевая и арахионовая кислоты, которые необходимы для нормальной жизнедеятельности живого организма (фактор витамина F) [21].

Количественное содержание основных групп БАВ в надземной и подземной частях *I. britannica* представлено в таблице 4. Исходя из полученных результатов, в сравнительном аспекте в подземной части доминируют сапонины, дубильные вещества, полисахариды, флавоноиды, витамины В₂ и С, а в надземной части – amino- и органические кислоты.

В результате экстракции надземной и подземной частей растений девясила британского и последующей лиофильной сушки были получены условные фитопрепараты, состоящие из биологически активных веществ, и проверены на токсическую и мутагенную активность.

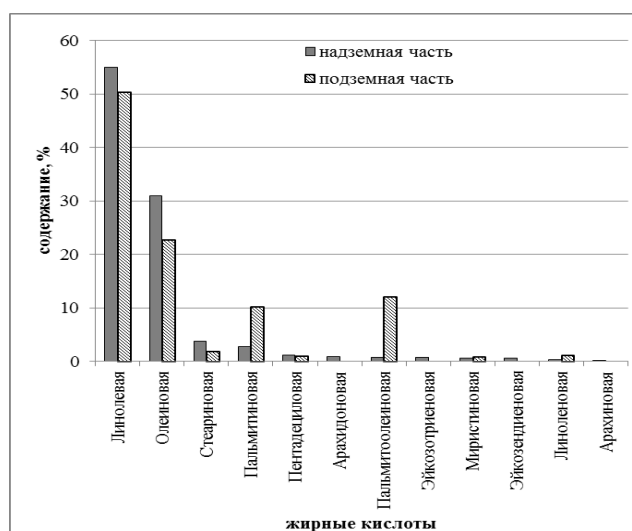


Рисунок 1 – Жирнокислотный состав *I. britannica*

Таблица 4 - Содержание биологически активных веществ в *I. britannica*, %

Группа БАВ		Надземная часть	Подземная часть
Сапонины		14,90	35,40
Дубильные вещества	Перманганатометрия	4,30	4,79
	Комплексонометрия	7,48	10,11
Флавоноиды		1,31	1,41
Полисахариды		1,29	3,67
Аминокислоты		3,50	3,24
Органические кислоты		0,14	0,072
Витамины:	С,	0,04	0,05
	В ₂	5,47	8,11

Фитотоксичность экстрактов из подземной и надземной частей растений *I. britannica*, содержащих комплекс биологически активных веществ, определялась по всхожести обработанных ими семян (таблица 5).

Таблица 5 - Всхожесть семян ячменя, отдельно обработанных водными растворами биологически активных веществ из растений *I. britannica* и метилметансульфонатом

Вариант	Всхожесть семян, %		
	25 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
БАВ (подземная часть)	94,67±3,18	92,67±3,69	95,33±2,98
БАВ (надземная часть)	93,67±3,44	93,67±3,44	95,33±2,98
ММС, 5,0 мг/л	74,33± 6,18*		
Контроль (вода)	93,67±3,44		

Примечание: * - $p < 0,01$ в сравнении с контролем

Всхожесть семян, выдержанных в дистиллированной воде, составила 93,67±3,44%. В результате обработки ММС в концентрации 5,0 мг/л всхожесть снизилась в 1,26 раза ($p < 0,01$). Всхожесть семян, обработанных БАВ из подземной части *I. britannica* в концентрациях 25,0; 50,0 и 100,0 мг/л, была на уровне контроля и составила соответственно 94,67; 92,67 и 95,33%. Аналогичные результаты были получены и при обработке семян ячменя экстрактами из надземной части изучаемого растения в тех же концентрациях

(соответственно 93,67; 93,67 и 95,33 %). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии токсических эффектов у экстрактов как из надземной, так и подземной частей девясила британского в использованных концентрациях в тесте на всхожесть семян.

Нами также была изучена мутагенная активность изучаемых экстрактов в тесте по учету хромосомных aberrаций. Результаты цитогенетического исследования мутагенных эффектов ММС и БАВ, содержащихся в экстракте девясила британского, в клетках корневой зародышевой меристемы семян ячменя представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Частота и спектр структурных нарушений хромосом, индуцированных экстрактами из подземной и надземной частей *I. britannica* в корнях проростков ячменя

Вариант опыта	Всего изучено клеток	Частота клеток с aberrациями (M ± m%)	Число хромосомных aberrаций на 100 метафазных клеток		
			всего aberrаций	хромосомного типа	хроматидного типа
Вода (негативный контроль)	470	1,49 ± 0,56	1,49 ± 0,56	0,85 ± 0,42	0,64 ± 0,37
ММС, 5,0 мг/л (положительный контроль)	518	6,18 ± 1,06*	7,92 ± 1,19**	4,83 ± 0,94**	3,09 ± 0,76*
экстракт из подземной части					
25,0 мг/л	486	1,23 ± 0,50	1,23 ± 0,50	0,82 ± 0,41	0,41 ± 0,29
50,0 мг/л	499	1,20 ± 0,49	1,20 ± 0,49	0,80 ± 0,40	0,40 ± 0,28
100,0 мг/л	507	1,38 ± 0,52	1,38 ± 0,52	0,79 ± 0,39	0,59 ± 0,34
экстракт из надземной части					
25,0 мг/л	497	1,41 ± 0,53	1,41 ± 0,53	0,80 ± 0,40	0,60 ± 0,35
50,0 мг/л	541	1,29 ± 0,49	1,29 ± 0,49	0,74 ± 0,37	0,55 ± 0,32
100,0 мг/л	516	0,97 ± 0,43	0,97 ± 0,43	0,58 ± 0,33	0,39 ± 0,27
Примечание: * - p<0,01; ** - p<0,001 в сравнении с негативным контролем					

Частота aberrантных клеток в негативном контроле (спонтанный уровень мутирования) составила 1,49%. Метилметансульфонат в использованной концентрации проявил высокую мутагенную активность. Так, частота aberrантных клеток в корневой зародышевой меристеме составила 6,18%, что в 4,15 раза выше по сравнению с негативным контролем (p<0,01). Число хромосомных перестроек на 100 просмотренных метафаз уже составило 7,92, что выше по сравнению с контролем в 5,3 раза (p<0,001). Сравнительный анализ частоты aberrантных клеток и числа хромосомных aberrаций на 100 метафаз в контроле не выявил достоверных различий с аналогичными показателями в семенах ячменя, обработанных растворами различных концентраций БАВ из подземной и надземной частей растений. Так, водные растворы экстракта из подземной части в концентрациях 25,0; 50,0 и 100,0 мг/л индуцировали структурные мутации с частотой, равной соответственно 1,23%; 1,20% и 1,38%. В клетках корневой меристемы семян, обработанных растворами БАВ из надземной части в концентрациях 25,0; 50,0 и 100,0 мг/л, частота структурных мутаций составила соответственно 1,41%; 1,29% и 0,97%. Эти показатели несколько ниже по сравнению с негативным контролем, но разница не достоверна. Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности у экстрактов девясила с биологически активными веществами как из подземной, так и надземной частей растений при всех использованных концентрациях.

Спектр хромосомных aberrаций в клетках корневой меристемы семян, обработанных водой и экстрактами из девясила, в равной степени был представлен единичными нарушениями хромосомного и хроматидного типов. Спектр структурных перестроек

хромосом, индуцированных ММС, был достаточно широким, в числе которых нарушения как хромосомного, так и хроматидного типов. Нарушения хромосомного типа были представлены в основном парными концевыми фрагментами (концевые делеции) и парными точечными фрагментами. Встречались единичные центрические кольца, хромосомные конфигурации, возникающие в результате симметричных хромосомных транслокаций. В спектре нарушений хроматидного типа - одиночные концевые и интерстициальные хроматидные делеции с образованием ацентрического кольца, а также точечные фрагменты (рисунок 2). Наряду со структурными перестройками хромосом, выявляемых в метафазных клетках, с высокой частотой были отмечены анафазы с мостами, отставанием хромосом и одиночными и парными фрагментами (рисунок 3). Кроме того, встречались клетки с множественными структурными нарушениями, идентификация которых была затруднена (рисунок 4).

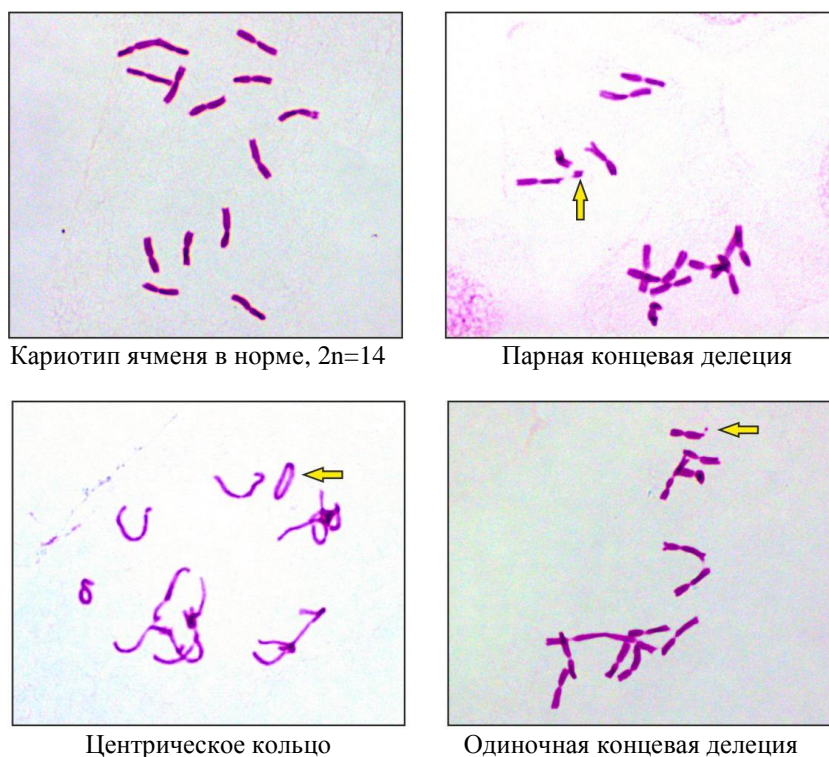


Рисунок 2 – Хромосомные aberrации, индуцированные метилметансульфонатом в клетках корневой зародышевой меристемы ячменя, $\times 1000$

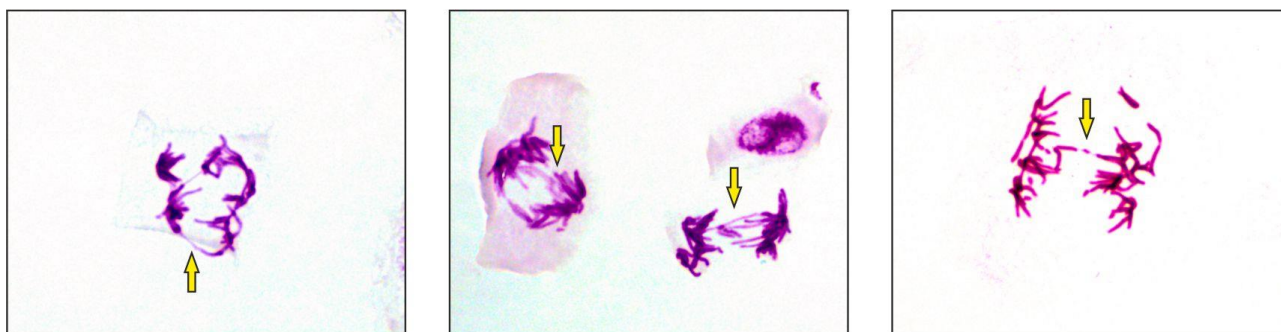


Рисунок 3 – Структурные нарушения хромосом в анафазе митоза, индуцируемые ММС в клетках корневой зародышевой меристемы ячменя, $\times 600$

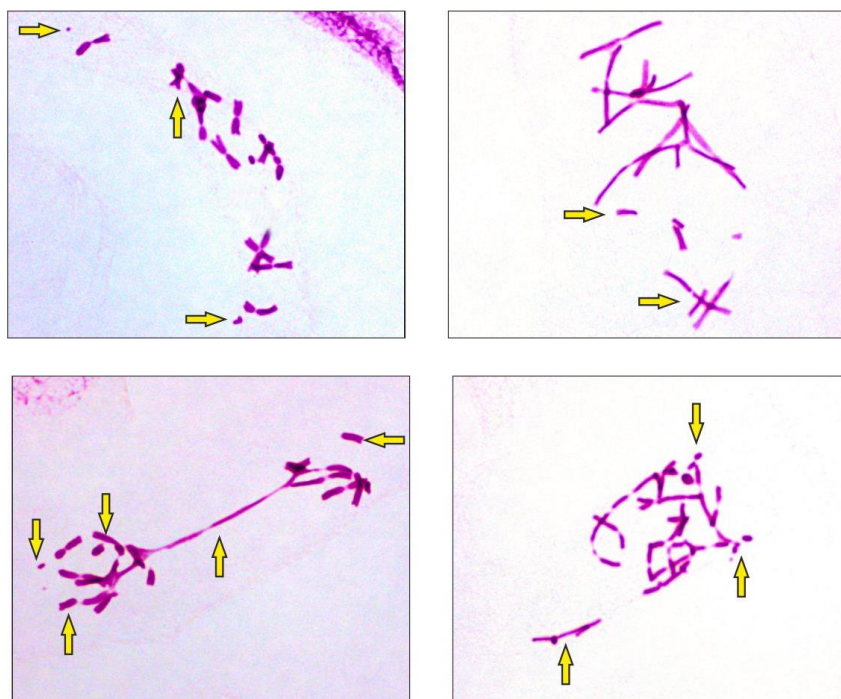


Рисунок 4 – Множественные поражения хромосом в корневой меристеме ячменя, обработанных ММС в концентрации 5,0 мг/л, x1000

Проведенные исследования показали, что обработка семян ячменя водным раствором комплекса БАВ, выделенных из подземной и надземной частей *I. britannica*, при использованных концентрациях не подавляла всхожести семян. Установлено, что частота структурных нарушений хромосом в корневой меристеме семян, обработанных растительными экстрактами, была на уровне контроля, что свидетельствует об отсутствии мутагенной активности у изучаемых комплексов БАВ в использованных концентрациях.

Изучение лекарственных растений в качестве перспективных источников биологически активных веществ, обладающих антимутагенной и антиоксидантной активностью, значительно активизировалось и возросло в последние годы. Природные антимутагены и антиоксиданты лекарственных растений имеют особое значение в связи с возможностью профилактики ряда заболеваний (атеросклероз, болезнь Альцгеймера, диабет, инсульт и др.), а также могут выступать в качестве протекторов при воздействии ксенобиотиков на живые организмы [22, 23].

Как показано выше, для *I. britannica* характерно высокое содержание сапонинов, дубильных веществ, полисахаридов, аминокислот, витаминов, флавоноидов. Данные БАВ являются антиоксидантами. Известно, что многие антиоксиданты обладают антимутагенной активностью. Так, добавление в пищевой рацион флавоноидов кверцетина и лютионина снижало образование микроядер и хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, принимавших экстракты жаркого из рыбы и баранины, содержащих пищевые мутагены [24]. Глутатион – трипептид, образованный аминокислотами цистеином, глутатионовой кислотой и глицином, может связываться с мутагенными метаболитами и способствовать выведению их из организма [24]. Большинство дубильных веществ способны связывать в организме токсины и соли тяжелых металлов, снижая индуцированную мутабельность [25].

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что экстракты из подземной и надземной частей *I. britannica* в использованных концентрациях не обладают токсической и мутагенной активностью. Учитывая высокое содержание БАВ в данных экстрактах, представляется перспективным изучение антимутагенного потенциала *I. britannica*.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК 0587/ГФ4, ГР № 0115РК00378 (2015-2017).
Руководитель - Колумбаева С.Ж.

Литература

- 1 Дружинин В.Г. Количественные характеристики частоты хромосомных aberrаций в группе жителей крупного промышленного региона Западной Сибири // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 10. – С. 1373-1380.
- 2 Гончарова Р.И., Кужир Т.Д. Молекулярные основы применения антимуагенов в качестве антиканцерогенов // Экологическая генетика. – 2005. – Т. 3, № 3. – С. 19-32.
- 3 Uzun F., Kalender S., Durak D., Demir F., Kalender Y. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E // Food and Chemical Toxicology. – 2007. – Vol. 47, No. 8. – P. 1903-1908. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.001.
- 4 Seca A.M.L., Grigore A., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses // Journal of Ethnopharmacology. – 2014. - Vol. 154, № 2. – P. 286-310. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.010
- 5 de Souza P., Gasparotto A.Jr., Crestani S., Stefanello M.E.A., Marques M.C.A., da Silva-Santos J.E., Kassuya C.A.L. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats // Phytomedicine. - 2011. - Vol. 18. - P. 819– 825. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.02.005
- 6 Shaikh T., Rub R.A., Sasikumar S. Antimicrobial screening of *Cichorium intybus* seed extracts // Arabian Journal of Chemistry. - 2012. - DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.04.012
- 7 Fishedick J.T., Pesic M., Podolski-Renic A., Bankovic J., de Vos R.C.H., Perić M., Todorović S., Tanic N. Cytotoxic activity of sesquiterpene lactones from *Inula britannica* on human cancer cell lines // Phytochemistry Letters. - 2013. - Vol. 6, № 2. - P. 246–252. DOI:10.1016/j.phytol.2013.02.006
- 8 Radulović N.S., Dekić M.S., Randelović P.J., Stojanović N.M., Zarubica A.R., Stojanović-Radić Z.Z. Toxic essential oils: Anxiolytic, antinociceptive and antimicrobial properties of the yarrow *Achillea umbellata* Sibth. et Sm. (Asteraceae) volatiles // Food and Chemical Toxicology. - 2012. - Vol. 50, № 6. - P. 2016-2026. DOI: 10.1016/j.fct.2012.03.047
- 9 Liu W., Di Giorgio C., Lamidi M., Elias R., Ollivier E., De Meo M.P. Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells // Journal of Ethnopharmacology. – 2011. - Vol. 137. – P. 176 – 183. DOI: 10.1016/j.jep.2011.05.005.
- 10 Kalantari H., Galehdari H., Zaree Z., Gesztelyi R., Varga B., Haines D., Bombicz M., Tosaki A., Juhasz B. Toxicological and mutagenic analysis of *Artemisia dracuncululus* (tarragon) extract // Food and Chemical Toxicology. – 2013. - Vol. 51. – P. 26–32. DOI: 10.1016/j.fct.2012.07.052.
- 11 Saraç N., Şen B. Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *Orientalis* // Industrial Crops and Products. – 2014. - Vol. 53. – P. 60–64. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.12.015
- 12 Агабейли Р.А. Антимуагенная активность масла плодов *Fagus Orientalis* (Fagaceae) // Растительные ресурсы. – 2012. – Т. 48, № 2. – С. 267-273.
- 13 Гераськин С.А., Сарапульцева Е.А. Биологический контроль окружающей среды. Генетический мониторинг. – М.: Академия, 2010. – 208 с. ISBN: 978-5-7695-6536-6.
- 14 ГОСТ 24027.2-80 Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла, Лекарственное растительное сырье. Часть 2. Корни, плоды, сырье. – М.: Изд-во стандартов, 1999. - С. 119-126.
- 15 Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т 1. – Алматы: Жибек жолы, 2008. – 592 с.
- 16 Худoley В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. – СПб.: НИИ Химии СПбГУ, 1999. – С. 374–375. ISBN: 5-7997-0170-4.
- 17 Natarajan A.T. Chemical mutagenesis: From plants to human // Current science. – 2005. – Vol. 89, No. 2. – P. 312-317.
- 18 Чеснокова С.М. Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды. В 2 ч. Ч.2. Методы биотестирования. - Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2008. – 92 с. ISBN: 978-5-89368-829-0.
- 19 Немцева Л.С. Метафазный метод учета перестроек хромосом. – М.: Наука, 1970. - 126 с.
- 20 Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высшая школа, 1990. - 352 с. - ISBN 5-06-000471-6.
- 21 Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с. ISBN: 789-5-876965-002-86789.
- 22 Zahin M., Aqil F., Ahmad I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extract // Mutat. Res. – 2010. - Vol. 703, No. 2. – P. 99–107. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.08.001
- 23 Devasagayam T.P., Tilak J.C., Bolor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects // J. Assoc. Physicians India. - 2004. - Vol. 52. – P. 794-804.
- 24 Абилев С.К., Сартаев А. Избранные лекции по генетике (мутация и генотоксикология). – Алматы, 2012. – 208 с. ISBN: 978-601-224-371-0.
- 25 Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tanninlike compounds: nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. // J. Sci. Food Agric. - 2000. - Vol. 80. - P. 1094–1117.

References

- 1 Druzhinin VG (2003) Quantitative characteristics of chromosome aberration frequency in the human population of a large Western Siberian industrial region, Russian Journal of Genetics, 10 (39): 1161-1167.

- 2 Goncharova RI, Kuzhir TD (2005) Molecular basis of applying antimutagens as anticarcinogens. Ecological genetics [Molekuliarnye osnovy primeneniia antimutagenov v kachestve antikantserogenov. Ekologicheskaiia genetika] 3 (3): 19-32. (In Russian)
- 3 Uzun F, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y (2007) Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E, Food and Chemical Toxicology, 47 (8): 1903-1908. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.001.
- 4 Seca AML, Grigore A, Pinto DCGA, Silva AMS (2014) The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses, Journal of Ethnopharmacology, 154(2): 286-310. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.010
- 5 de Souza P, Gasparotto AJr, Crestani S, Stefanello MEA, Marques MCA, da Silva-Santos JE, Kassuya CAL (2011) Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats, Phytomedicine, 18: 819–825. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.02.005
- 6 Shaikh T, Rub RA, Sasikumar S (2012) Antimicrobial screening of *Cichorium intybus* seed extracts, Arabian Journal of Chemistry. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.04.012
- 7 Fishedick JT, Pesic M, Podolski-Renic A, Bankovic J, de Vos RCH, Perić M, Todorović S, Tanic N (2013) Cytotoxic activity of sesquiterpene lactones from *Inula britannica* on human cancer cell lines, Phytochemistry Letters, 6 (2): 246–252. DOI:10.1016/j.phyto.2013.02.006
- 8 Radulović NS, Dekić MS, Randelović PJ, Stojanović NM, Zarubica AR, Stojanović-Radić ZZ (2012) Toxic essential oils: Anxiolytic, antinociceptive and antimicrobial properties of the yarrow *Achillea umbellata* Sibth. et Sm. (Asteraceae) volatiles, Food and Chemical Toxicology, 50 (6): 2016-2026. DOI: 10.1016/j.fct.2012.03.047
- 9 Liu W, Di Giorgio C, Lamidi M, Elias R, Ollivier E, De Meo MP (2011) Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from Nauclea bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells, Journal of Ethnopharmacology, 137: 176 – 183. DOI: 10.1016/j.jep.2011.05.005.
- 10 Kalantari H, Galehdari H, Zaree Z, Gesztelyi R, Varga B, Haines D, Bombicz M, Tosaki A, Juhasz B (2013) Toxicological and mutagenic analysis of Artemisia dracunculus (tarragon) extract, Food and Chemical Toxicology, 51: 26–32. DOI: 10.1016/j.fct.2012.07.052.
- 11 Saraç N, Şen B (2014) Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *Orientalis*, Industrial Crops and Products, 53: 60– 64. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.12.015
- 12 Agabeili RA (2012) Antimutagenic activity of oil fruits Fagus Orientalis (Fagaceae). Plant Resources [Antimutagennaia aktivnost' masla plodov Fagus Orientalis (Fagaceae). Rastitel'nye resursy]. 2 (48): 267-273. (In Russian)
- 13 Geras'kin SA, Sarapul'tseva EA (2010) Biological control of environment. Genetic monitoring [Biologicheskii kontrol' okruzhaiushchei sredy. Geneticheskii monitoring]. Akademiia, Moscow, Russia, pp. 208. ISBN: 978-5-7695-6536-6. (In Russian).
- 14 SS 24027.2-80 Medicinal plant raw. Methods for determination of moisture, ash, extractives and tannins, essential oil, medicinal plant raw materials. Part 2: The roots, fruits, raw. [Syr'e lekarstvennoe rastitel'noe. Metody opredeleniia vlazhnosti, sodержaniia zoly, ekstraktivnykh i dubil'nykh veshchestv, efirnogo masla, Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. Chast' 2. Korn'i, plody, syr'e]. Moscow, Russia, 1999. (In Russian).
- 15 State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. V. 1 [Gosudarstvennaia farmakopeia Respubliki Kazakhstan. T 1]. Zhibek zholy, Almaty, Kazakhstan, 2008. – 592 p. (In Russian).
- 16 Khudolei VV (1999) Carcinogens: Characteristics, patterns, mechanisms of action [Kantserogeny: kharakteristiki, zakonomernosti, mekhanizmy deistviia]. NII Khimii SPbGU, St. Petersburg, Russia, P. 374–375. ISBN: 5-7997-0170-4. (In Russian).
- 17 Natarajan AT (2005) Chemical mutagenesis: From plants to human, Current science, 2(89): 312-317.
- 18 Chesnokova SM (2008) Biological methods for Environmental Quality Assessment. Methods of bioassay [Biologicheskii metody ocenki kachestva ob'ektov okruzhajushhej sredy. Metody biotestirovaniia]. Izd-vo Vladim. gos. Un-ta, Vladimir, Russia, pp. 92. ISBN: 978-5-89368-829-0. (In Russian)
- 19 Nemtseva LS (1970) Metaphase method of accounting for chromosome rearrangements [Metafaznyi metod ucheta perestroek khromosom]. Nauka, Moscow, Russia, pp 126 (In Russian).
- 20 Lakin GF (1990) Biometrics [Biometriia]. Vysshiaia shkola, Moscow, Russia, pp. 352. ISBN 5-06-000471-6. (In Russian).
- 21 Chirkin AA, Danchenko EO (2010) Biochemistry [Biohimija]. Medicinskaja literatura, Moscow, Russia, pp. 624. ISBN: 789-5-876965-002-86789. (In Russian)
- 22 Zahin M, Aqil F, Ahmad I (2010) Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extract, Mutat. Res, 2 (703): 99–107. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.08.001
- 23 Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004) Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects, J Assoc Physicians India, 52: 794-804.
- 24 Abilev SK, Sartaev A (2012) Selected lectures on genetics (mutagenesis and genotoxicology) [Izbrannye lektsii po genetike (mutagenez i genotoksikologija)]. Almaty, Kazakhstan, pp. 208 c. ISBN: 978-601-224-371-0. (In Russian).
- 25 Santos-Buelga C, Scalbert A (2000) Proantocyanidins and tanninlike compounds: nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health, J. Sci. Food Agric., 80: 1094–1117.

COMPOSITAE ТУЫСЫ *INULA BRITANNICA* L. ӨСІМДІГІНЕН АЛЫНҒАН БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІ ЗАТТАРДЫҢ ТОКСИКАЛЫҚ ЖӘНЕ МУТАГЕНДІ БЕЛСЕНДІЛІГІ

Колумбаева С.Ж., Ловинская А.В., Ахтаева Н.З., Литвиненко Ю.А., Воронова Н., Илиясова А.И., Әликул А. әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университеті, Қазақстан Республикасы, Алматы қ.

Британдық андыз (*Inula britannica* L., туысы. Compositae) өсімдігінің жер асты және жер үсті бөліктерінен биологиялық белсенді заттар (ББЗ) бөлініп алынды. Андыздың сапалық көрсеткіштері (ылғалдылығы, жалпы күлі); сығынды заттардың көрсеткіштері, аминқышқылды және майқышқылды құрамы анықталды. Биологиялық белсенді заттардың негізгі топтарының сәйкестігі жүргізілді. *Inula britannica* өсімдігінің жер асты және жер үсті бөліктерінен алынған биологиялық белсенді заттардың токсикалық және мутагенді әсері дәндердің өнгіштігі және ұрық тамыр меристемасы клеткаларындағы хромосомалық аберрациялар саны бойынша арпа дәндеріне жүргізілген тестте зерттелді. ББЗ кешені қолданылған концентрацияда (25,0; 50,0 и 100,0 мг/л) фитотоксикалық және мутагенді әсер көрсетпейтіндігі бекітілді. Арпа дәндерін сығындылардың сулы ерітіндісінің барлық концентрациясы мен бақылау өсімдіктерімен салыстырғанда олардың өнгіштігін төмендетпеді. ББЗ сулы ерітінділерімен өңделген арпа дәндерінің ұрық тамыр меристема клеткаларында қарастырылған 100 метафазаларда хромосомалардың құрылымдық бұзылыстар жиілігі және хромосомалық аберрациялар саны өңделмеген өсімдіктердің көрсеткіштерінен айтарлықтай ерекшеленбеді. Ал оң бақылау ретінде алынған классикалық мутаген метилметансульфонат (ММС) бақылау нұсқасы және ББЗ өңделген дәндер нұсқасымен салыстырғанда зерттелінетін көрсеткіштерді бірнеше есеге көтерді.

Түйін сөздер: биологиялық белсенді заттар, мутаген, тұқымның өнуі, хромосомалық аберрациялар, *Inula britannica*.

TOXIC AND MUTAGENIC EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM *INULA BRITANNICA* L. (FAMILY COMPOSITAE)

Kolumbayeva S.Zh., Lovinskaya A.V., Akhtaeva N.Z., Litvinenko Iu.A., Voronova N., Iliiasova A.I., Alikul A. Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Biologically active substances (BAS) from the shoot and root parts of *Inula britannica* L. (Compositae family) have been obtained. Purity indicators (moisture, total ash); indicators of extractive substances, amino acid and fatty acid compositions have been determined. Identification of main groups of BAS was carried out. Toxic and mutagenic effects of BAS from the shoot and root parts of *I. britannica* have been studied using barley seed germination test and chromosomal aberration analysis of barley root tip assay. It is found that the BAS in the studied concentrations (25.0, 50.0 and 100.0 mg/l) had no phytotoxic and mutagenic action. The barley seeds treated with aqueous solutions of elecampane extracts at all concentrations had shown no reduction in germination as compared with control plants. The frequency of structural chromosome aberrations and the number of chromosomal aberrations per 100 metaphases in root tip cells of barley treated with aqueous solutions of BAS had not significantly differed from the same parameters in untreated seeds. The methyl methanesulfonate, used as a positive control, caused significant increase of the studied parameters not only compared with the control, but also the seeds treated with aquatic solutions of the BAS.

Key words: biologically active substances, mutagen, seed germination, chromosome aberrations, *Inula britannica*.

Biologically active substances (BAS) from the shoot and root parts of *Inula britannica* L. (Compositae family) have been obtained. Purity indicators (moisture, total ash); indicators of extractive substances, amino acid and fatty acid compositions have been determined. The main groups of biologically active substances were identified using one- and two dimensional paper chromatography, thin layer chromatography on fixed layer of sorbent. Comparative analysis of the quantitative content of BAS from the shoot and root parts of the *Inula britannica* showed that the root part is dominated by saponins, tanning substances, polysaccharides, flavonoids, and B₂ and C vitamins, and the shoot part is dominated by amino- and organic acids. As a result of the extraction of the shoot and root parts of *Inula britannica* followed by freeze-drying contingent phytoproducts consisting of BAS were obtained and tested for toxic and mutagenic activity. Toxic and mutagenic effects of BAS from the shoot and root parts of *I. britannica* have been studied using barley seed germination test and chromosome aberration assay of the germ cells from the root tip of barley. It is found that the BAS in the studied concentrations (25.0, 50.0 and 100.0 mg/l) had no phytotoxic and mutagenic action. The barley seeds treated with aqueous solutions of elecampane extracts at all concentrations had shown no reduction in germination as compared with control plants. Germination of seeds treated with aqueous solutions of methyl methanesulfonate (MMS, classical mutagen) at concentrations of 5.0 mg / L was 74.33%. Comparative analysis showed that the germination of seeds treated with the concentrations of MMS fell 1,26 (p<0.01) times as compared with the control. The frequency of structural chromosome aberrations and the number of chromosomal aberrations per 100 metaphases in root tip cells of barley seeds treated with aqueous solutions of BAS had not significantly differed from the same parameters in untreated seeds. At the same time, the classical mutagen methyl methanesulfonate, used as a positive control, caused significant increase of the studied parameters not only compared with the control, but also the seeds treated with aquatic solutions of the BAS. Thus, extracts from the shoot and root parts of *Inula britannica* had no toxic and mutagenic activity. Given the high content of biologically active substances in these extracts investigation of antimutagenic potential of *I. britannica* is a promising study.

Key words: biologically active substances, mutagenic, seed germination, chromosome aberrations, *Inula britannica*.