

Р.А. АГАБЕЙЛИ

Институт ботаники НАН Азербайджанской Республики, Баку
E-mail: renaagabeyli@rambler.ru

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТА ИЗ КОРНЕЙ *GLYCYRRHIZA GLABRA L.* В РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ



*Установлена антимуtagenная и геропротекторная активность экстракта из корня солодки (*Glycyrrhiza glabra*), в клетках растительных тест-систем *Allium fistulosum L.*, *Allium cepa L.*, *Vicia faba L.* и лабораторных животных — крыс линии Вистар. Обсуждаются перспективы практического применения экстракта из корня солодки голой *Glycyrrhiza glabra* в качестве антимуtagenных средств.*

© Р.А. АГАБЕЙЛИ, 2012

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2012. № 5

Введение. Проблема антимуtagenеза как подхода, способного влиять на процессы сохранения биоразнообразия путем прогноза и профилактики процессов исчезновения или снижения концентрации генофонда, а также метода защиты генетического аппарата в изменяющихся условиях окружающей среды, становится все более актуальной [1, 2]. В этой проблеме особо важной задачей является поддержание структурно-функциональной целостности генома как основы здоровья и долголетия людей. Эта задача предполагает актуальность изучения генетических эффектов природных соединений и комплексов, а также представляется важной как для определения функциональной роли метаболитов, так и для выявления нового класса биологически активных препаратов с генозащитными свойствами. Накоплена обширная информация о способности индивидуальных соединений и суммы экстрактивных веществ, полученных из различных видов растений, снижать частоту мутаций, индуцированных действием отдельных генотоксикантов или их комплексов [1–3]. Многочисленные метаболиты, содержащиеся в тканях и клетках различных видов растений, способны снижать уровень спонтанных и индуцированных мутаций, являясь антагонистами как экзогенных, так и эндогенных мутагенов, что свидетельствует о наличии и многообразии эндогенных антимуtagenенов [4–13]. Перспективы использования биоконплексов из растительных источников являются важными также с точки зрения их доступности, экономичности, возможности широкого внедрения в практику [13].

Целью исследования явилось проведение комплексной оценки антимуtagenных свойств экстракта из корней солодки *Glycyrrhiza glabra*. Выбор этого объекта был обоснован тем, что корни солодки содержат тритерпеновые [14] и фенольные [15] соединения, а также аминокислоты, сапонины, для которых ранее показана антимуtagenная активность [13]. Широкое распространение и наличие значительных сырьевых запасов солодки в Азербайджане предопределили интерес к изучению антимуtagenных свойств экстракта как средства, способствующего уменьшению риска от воздействия средовых мутагенов и канцерогенов.

Материал и методы. Объектом исследования являлся водный экстракт, полученный

из корней солодки голой *Glycyrrhiza glabra* (ЭКС). Исследуемый препарат экстрагирован в Отделе растительных ресурсов Института ботаники НАН Азербайджана из местного растительного сырья. Тест-объекты: 1) растительные – лук-батун *Allium fistulosum* L., лук репчатый *Allium cepa* L., конские бобы *Vicia faba*, семена разных сроков хранения с низким и высоким уровнем естественного мутирования; 2) животные – лабораторные крысы линии Вистар в возрасте 28 нед, самцы с массой тела 180–200 г по пять на каждый вариант эксперимента. Для оценки уровня генетической изменчивости применяли метод анализа частоты аберраций хромосом (АХ) в анафазных клетках: меристемы первичных проростков растительных объектов и клеток костного мозга крыс в первом поколении [16]. В качестве индукторов мутаций использовали естественное старение (хранение семян 3 года), химический мутаген алкилирующего типа действия N-нитрозо-N-метилмочевину (НММ, 0,02 %), рН 7 фирмы «Serva» (Чехия) на растениях и ионизирующие излучения – гамма-лучи (ГЛ) в опытах с млекопитающими. В этих опытах крыс подвергали облучению на радиоизотопной установке К-25 мощностью 1 Мрад/ч, источник Co^{60} , в дозе 6,5 Гр. В качестве модификатора мутационного процесса использовали экстракт из корня солодки *Glycyrrhiza glabra* в широком диапазоне концентраций.

Семена лука и конских бобов проращивали в термостате при $t = 25 \pm 1$ °С, в растворах ЭКС при рН 5,4. Семена бобов, подвергнутые трехчасовой обработке НММ, после промывания от мутагена в течение 30 мин переводили в растворы ЭКС (0,001–100 мг/мл) для последующего инкубирования в термостате. Фиксацию растительных объектов осуществляли в количестве 25–30 корешков на вариант, а костного мозга бедренных костей крыс – по 5 животных на вариант. Приготовление давленных временных препаратов для анализа АХ проводили по стандартной методике [16]. В экспериментах с облучением животные были разделены на три группы: 1) контрольная, содержащаяся на общеживарном рационе и при свободном доступе к воде; 2) группа, подвергнутая облучению в дозе

6,5 Гр; 3) группа, получавшая ЭКС сразу после облучения и затем ежедневно в течение 28 дней. Экстракт вводили специальной канюлей одноразово *per os* в концентрации 10 мг/100 г массы. В каждом варианте забивали по 5 животных через 24 ч, 7, 14, 21 и 28 дней после облучения с последующей фиксацией бедренных костей. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методики Лакина [17].

Результаты исследований и их обсуждение. Оценка антимуутагенной активности экстракта из корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*, ЭКС) в клетках меристемы первичных корешков растительных тест-систем лука и бобов, а также в клетках костного мозга крыс проведена с применением цитогенетического исследования, который позволяет осуществлять экспресс-анализ мутагенности различного рода воздействий на организмы и создает возможности для модифицируемости этого процесса. Изучено влияние ЭКС на частоту спонтанной и индуцированной нитрозометилмочевинной (НММ) мутабельности хромосом в клетках *Allium fistulosum*. Результаты исследования выявили высокую антимуутагенную эффективность экстракта в диапазоне концентраций 0,1–100 мкг/мл. При этом антимуутагенная эффективность превышала в этих экспериментах 60%-ный уровень (рисунок). Способность ЭКС снижать частоту аберраций хромосом в клетках *A. cepa* и *V. faba* установлена и при его действии на частоту индуцированной старением нестабильности хромосом (табл. 1). Проявление антимуутагенной активности по отношению к мутациям, индуцированным процессом естественного старения, может рассматриваться как проявление геропротекторных свойств исследуемого экстракта.

Изучено влияние ЭКС как для выявления дозовой зависимости, так и для оценки его эффективности в зависимости от продолжительности воздействия. В экспериментах оценивали частоту аберраций хромосом в условиях индукции этого процесса НММ в клетках *A. cepa* (табл. 2). Выбор в качестве индуктора НММ определялся тем, что это химический мутаген прямого типа, действующий без метаболической активации, механизм ко-

Таблица 1

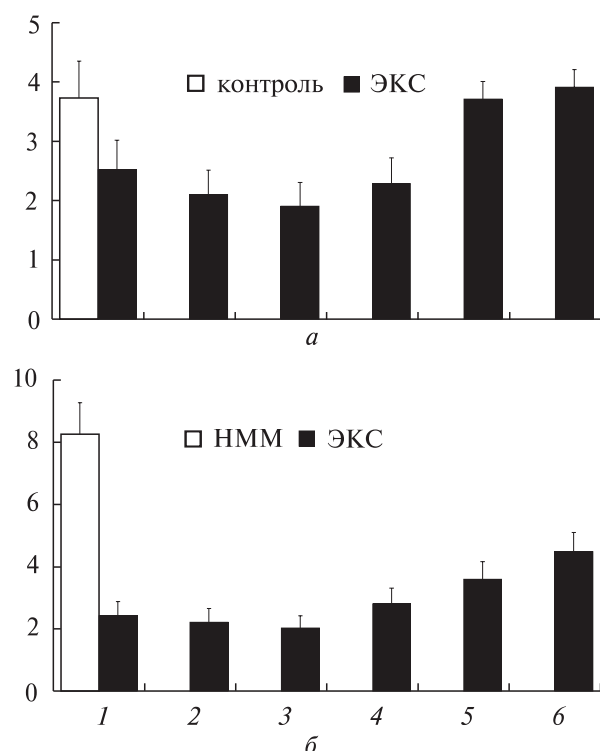
Влияние экстракта из корня солодки *Glycyrrhiza glabra* на индуцированную старением частоту aberrаций хромосом в клетках лука репчатого *Allium cepa* L. и конских бобов *Vicia faba* L.

Варианты эксперимента и концентрация, мкг/кг	Количество корешков	Изучено клеток	Клетки с aberrациями хромосом, %		td (контроль – ЭКС)	Антимутагенная эффективность, %
			<i>n</i>	<i>M ± m</i>		
<i>Allium cepa</i>						
Контроль ЭКС	30	1010	54	5,34 ± 0,70	–	–
100	30	964	20	2,07 ± 0,45	3,3	61
10	28	1153	19	1,64 ± 0,37	4,6	69
1	25	1120	18	1,60 ± 0,37	4,7	70
0,1	28	1013	15	1,29 ± 0,44	4,8	75
0,01	25	1021	17	1,66 ± 0,39	4,6	64
0,001	30	1094	21	1,91 ± 0,41	4,2	64
<i>Vicia faba</i>						
Контроль ЭКС	27	1030	81	7,86 ± 0,70	–	–
100	28	1025	35	3,42 ± 0,32	5,7	56
10	30	1055	40	3,79 ± 0,34	5,2	51
1	30	1038	42	3,02 ± 0,29	6,3	59
0,1	27	740	22	2,97 ± 0,27	5,6	62
0,01	28	1013	28	2,76 ± 0,26	5,8	64
0,001	30	959	36	3,75 ± 0,37	5,9	52

Таблица 2

Влияние экстракта из корня солодки *Glycyrrhiza glabra* в зависимости от способов его обработки на частоту aberrаций хромосом, индуцированную нитрозометилмочевинной в клетках лука репчатого (*Allium cepa* L.)

Варианты эксперимента и концентрация, мкг/кг	Количество корешков	Изучено клеток	Клетки с aberrациями хромосом, %		td (контроль – ЭКС)	Антимутагенная эффективность, %
			<i>n</i>	<i>M ± m</i>		
Контроль НММ	27	910	34	3,73 ± 0,62	–	–
0,02	30	726	60	8,26 ± 0,30	–	–
3 ч НММ → ЭКС						
0,001	28	1135	51	4,49 ± 0,61	3,1	45
0,01	25	1030	37	3,59 ± 0,30	3,9	56
0,1	28	997	28	2,80 ± 0,52	4,7	66
1	25	1231	25	2,03 ± 0,40	5,5	75
10	30	1038	23	2,21 ± 0,45	5,4	73
100	30	1149	28	2,43 ± 0,60	5,2	70
3 ч НММ → 3 ч ЭКС → H ₂ O						
0,01	30	995	38	3,81 ± 0,60	6,6	53
0,1	30	844	36	4,26 ± 0,69	5,2	48
1	28	930	39	4,19 ± 0,65	5,6	49
10	27	935	25	3,20 ± 0,57	7,8	60
100	26	759	26	3,42 ± 0,65	5,6	58



Влияние экстракта из корней солодки голой *Glycyrrhiza glabra* L. в различных концентрациях на частоту спонтанной (а) и индуцированной (б) нитрозометилмочевинной (НММ, 0,02 %) мутабельности хромосом в клетках *Allium fistulosum* L.: по вертикали – абберации хромосом, %; по горизонтали – варианты опыта (1 – 100 мкг/мл; 2 – 10 мкг/мл; 3 – 1 мкг/мл; 4 – 0,1 мкг/мл; 5 – 0,01 мкг/мл; 6 – 0,001 мкг/мл)

торого связан с повреждением структуры ДНК [18]. Результаты исследования показали, что индуцированная НММ частота АХ статистически достоверно модифицировалась ЭКС независимо от продолжительности обработки исследуемым экстрактом. Однако антимутагенная эффективность была выше в условиях более продолжительного воздействия ЭКС (табл. 2).

Способность экстракта из корней *Glycyrrhiza glabra* модифицировать индуцированную НММ и циклофосамидом мутабельность в клетках костного мозга мышей линии СВА и крыс линии Вистар была установлена ранее [19]. Для оценки универсальности антимутагенного действия ЭКС в качестве мутагенного фактора в экспериментах использо-

вали ионизирующее облучение. В этой серии экспериментов изучена способность ЭКС при его длительном применении ингибировать мутагенный эффект гамма-лучей в сублетальной дозе (6,5 Гр) и нейтрализовать генетическую нестабильность в динамике. Результаты исследования выявили антимутагенную, радиопротекторную активность ЭКС. Характеристика антимутагенной эффективности при пролонгированном применении экстракта представлена в табл. 3, из которой видно, что через 24 ч и 7 дней после облучения уровень частоты АХ в миелокариоцитах крыс резко возрос по отношению к контрольным значениям и составил соответственно $31,67 \pm 1,77$ и $30,31 \pm 2,28$ % против $2,29 \pm 0,46$ % в контроле. Через 21 и 28 дней после облучения зарегистрирован второй пик роста частоты АХ. На эти сроки анализа относительное число их увеличилось до $23,05 \pm 2,07$ и $25,23 \pm 2,43$ %. Реализация индуцированных повреждений в истинные разрывы хромосом имела маятниковый характер, что свидетельствовало о волновой кинетике образования аббераций хромосом в течение 28 дней наблюдения после воздействия ионизирующего облучения крыс. Дополнительное введение ЭКС в рацион питания животных сразу после облучения и ежедневно через каждые 24 ч в течение 28 дней модифицировало мутационный процесс, индуцированный ГЛ в клетках костного мозга крыс и способствовало предотвращению его развития. При введении животным ЭКС через 24 ч после их облучения антимутагенная эффективность составила 29 %, однако на все последующие сроки анализа материала АЭ экстракта увеличивалась до 62–74 % (табл. 3).

Известно, что при многих патологических процессах и действии различных физико-химических факторов отмечается ускорение процессов перекисного окисления липидов и накопление токсических перекисных продуктов, которые могут приводить к повреждению генетических структур, в том числе и с отдаленными последствиями [20]. Влияние радиации привело к нарушению метаболических процессов, протекающих в клетке, которые, как известно, поддаются коррекции при помощи антиоксидантов, способных взаимо-

действовать с ферментами, структурными белками, нуклеопротеидами, липидами биомембран [2, 13, 20]. Радиопротекторы, способные избирательно реагировать со свободными радикалами и заменять активные радикалы на неактивные, обладают противолучевым действием не только до воздействия летальных доз радиации, но и после него, увеличивая как процент выживших животных, так и среднее время их жизни после облучения [20].

Результаты настоящего исследования выявили антимутагенную, радиопротекторную активность ЭКС, особенности эффективности защитного действия при его пролонгированном применении. Показаны динамические особенности нейтрализации генетической нестабильности, индуцированной острым ионизирующим облучением в сублетальной дозе.

Исследуемый экстракт наряду с выявленной антимутагенной активностью проявляет также противоопухолевую активность *in vivo* и *in vitro*. При этом наибольшую роль в этом процессе играют содержащиеся в ЭКС такие компоненты, как флавоноиды и тритерпеновые соединения, а также глицирризиновая кислота (ГК).

По результатам ³H-тимидинового теста ЭКС в концентрации 0,2–200 мкг/мл в расчете на ГК дозозависимо подавлял пролиферацию опухолевых клеток линии P388 почти до полного угнетения (95 %) в максимальной концентрации [21].

На проявление антимутагенной активности ЭКС определенное влияние может оказывать и наличие в их составе сапонинов, для которых показана антимутагенная активность [21–25], в частности, антимутагенная активность 10 сапонинов, выделенных из *Calendula officinalis* и *Calendula arvensis* [23]. Установлены антимутагенная и противолучевая активность суммы сапонинов, выделенных из листьев *Yucca gloriosa* L. и корней *Gypsophila paniculata*, а также их способность снижать индуцированную гамма-лучами и старением семян нестабильность хромосом в клетках *Allium cepa* L., *Triticum durum* L. и миелокариоцитах крыс линии Вистар [24, 25]. Комплексная оценка генетической активности ЭКС выявила его антимутагенную активность по отношению к генотоксикантам с различным механизмом действия. Одновременно с определением теоретических возможностей эф-

Таблица 3

Влияние гамма-лучей (Гл, 6,5 Гр) на частоту аберраций хромосом в клетках костного мозга крыс в динамике и ее модификация ЭКС *Glycyrrhiza glabra*

Время фиксации, дни и варианты эксперимента	Количество крыс	Изучено клеток	Клетки с аберрациями хромосом, %		td (контроль – ЭКС)	Антимутагенная эффективность, %
			n	M ± m		
1 день						
контроль	5	1048	24	2,29 ± 0,46	–	–
Гл	5	685	217	31,67 ± 1,77	–	–
Гл + ЭКС	5	542	121	22,32 ± 1,78	3,7	29
7 дней						
Гл	5	431	131	30,31 ± 2,28	–	–
Гл + ЭКС	5	665	76	11,42 ± 1,23	4,5	62
14 дней						
Гл	5	929	130	13,99 ± 1,13	–	–
Гл + ЭКС	5	418	34	8,13 ± 1,89	2,6	41
21 день						
Гл	5	425	98	23,05 ± 2,07	–	–
Гл + ЭКС	5	1232	89	7,22 ± 0,54	7,5	68
28 дней						
Гл	5	317	80	25,23 ± 2,43	–	–
Гл + ЭКС	5	535	25	6,54 ± 2,39	5,4	74

фективной экспериментальной регуляции мутационного процесса полученные данные имеют практическую перспективу. Результаты проведенной комплексной оценки антимутагенной активности ЭКС в различных тест-системах выявили новые возможности мобилизации исследуемого объекта в качестве источника получения перспективных биоантимутагенов.

Эксперименты, проведенные как со средовыми генотоксикантами, так и в условиях естественного старения, показали, что экстракт из корня солодки является перспективным для разработки профилактических средств, в том числе пищевых продуктов и пищевых добавок нового поколения, перспективных для снижения текущих и отдаленных негативных результатов у групп высокого профессионального, экологического и возрастного риска.

R.A. Agabeyli

GENETIC EFFECTS OF ROOT EXTRACTS OF *GLYCYRRHIZA GLABRA* L. ON DIFFERENT TEST-SYSTEMS

The antimutagenic and geroprotective activities of root extracts of *Glycyrrhiza glabra* have been demonstrated both on plant test systems – *Allium fistulosum* L., *Allium cepa* L., *Vicia faba* L. and on animals – *Vistar* rats. The possibilities of the mobilization of *Glycyrrhiza glabra* root extracts as antimutagenic agents are discussed.

P.A. Агабейли

ГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ ЕКСТРАКТУ З КОРЕНІВ *GLYCYRRHIZA GLABRA* L. В РІЗНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

Встановлено антимутагенну і геропротекторну активність екстракту з кореня солодки (*Glycyrrhiza glabra*) у клітинах рослинних тест-систем *Allium fistulosum* L., *Allium cepa* L., *Vicia faba* L. та лабораторних тварин – щурів лінії Вістар. Обговорюються перспективи практичного застосування екстракту з кореня солодки голої *Glycyrrhiza glabra* як антимутагенного засобу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hodis H.N., Mack W.J., Sevanian A. Antioxidant vitamins and atherosclerosis // Primary and secondary preventive nutrition. – Totowa, NJ : Humana Press, 2001. – P. 91–115.
2. Alakbarov U.K. Plant antimutagens and their mixtures in inhibition of genotoxic effects of xenobio-

tics and aging processes // Eur. J. Cancer Preven. – 2002. – **11**, Suppl 2. – S8–S11.

3. Weisburger J.H. Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms // Eur. J. Cancer Preven. – 2002. – **11**, Suppl. 2. – S1–S7.
4. Бариляк И.Р., Исаева А.В. Антимутагенные, генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения // Цитология и генетика. – 1994. – **28**, № 3. – С. 3–17.
5. Даливеля О.В., Савина Н.В., Кужир Т.Д., Гончарова Р.И. Модуляция процессов репарации ДНК на примере действия производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты // Цитология и генетика. – 2005. – **39**, № 5. – С. 62–72.
6. Дворник А.С., Перерва Т.П., Кунах В.А. Антимутагенез як система захисту організму від ушкоджуючих факторів ендогенного та екзогенного походження // Цитология и генетика. – 2004. – **38**, № 5. – С. 62–71.
7. Williams G.M., Iatropoulos M.J., Jeffrey A.M. Anticarcinogenicity of monocyclic phenolic compounds // Eur. J. Cancer Preven. – 2002. – **11**, Suppl. 2. – S. 101–107.
8. Dmitriyev A.P. Induction of systemic resistance in plants // Цитология и генетика. – 2004. – **38**, № 5. – С. 72–81.
9. De Mejia E.G., Castano-Tostado E., Loarca-Pina G. Antimutagenic effect of natural phenolic compounds in beans // J. Mutat. Res. – 1999. – **441**, № 1. – P. 1–9.
10. Chung S. Yang, Prabhu S., Landau J. Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols // Drug Metab. Rew. – 2001. – **33**, № 3/4. – P. 237–253.
11. Cardador-Martinez A., Castano-Tostado E., Loarca-Pina G. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B₁ // Food Addit. Contam. – 2002. – **19**. – P. 62–69.
12. Farrukh A., Ahmad I., Mehmood Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants // Turk. J. Biol. – 2006. – **30**, № 3. – P. 177–183.
13. Агабейли Р.А. Биоантиоксиданты: роль в генетической устойчивости и охране биоразнообразия – Баку : Элм, 2008. – 256 с.
14. Аммосов А.С., Литвиненко В.И. Тритерпеноиды растений родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey (обзор) // Хим.-фарм. журн. – 2003. – **37**, № 2. – С. 31–42.
15. Аммосов А.С., Литвиненко В.И. Фенольные соединения родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. et Mey // Фармаком. – 2003. – № 2. – С. 34–80.
16. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.

17. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 350 с.
18. Тарасов В.А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. — М.: Наука, 1982. — 228 с.
19. Alekperov U.K., Gulieva R., Zeinalova F.R., Agabeyli R.A. et al. The inhibition of xenobiotics genotoxicity by multicomponent antimutagens // ISSX Proc. — San Diego, USA. — 1996. — **10**. — P. 110.
20. Prilor R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage // Amer. J. Clin. Nutr. — 2003. — **78**. — P. 570S–578S.
21. Барабанова Л.В., Дукельская А.В., Тагиев Е.В. Использование цитогенетических методов в биоиндикации состояния водоемов Северо-Запада // Изб. докл. Международ. конф. — СПб, 2007. — С. 67–72.
22. Павлова С.И., Сергеев А.В., Дмитриева Н.Б., Дибирова Г.О., Козлов И.Г. Изучение противоопухолевой активности ЭКС экстракта корня солодки *in vivo* и *in vitro* // Вопр. гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2005. — **5**, № 4. — С. 17–18.
23. De Meo M.P., Ollivier E., Laget M., Balansard G., Dumenil G. Antimutagenic activity of 10 saponins from *Calendula officinalis* and *Calendula arvensis* // EEMS XVIII Ann. Meet.: Abstr. — Varna, 1988. — P. 233.
24. Агабейли Р.А., Керимова А.И. Генетические эффекты водных экстрактов и суммы сапонинов из листьев юкки славной (*Yucca gloriosa* L.) и корней качима (*Gypsophila paniculata* L.) // РАСН ВИЛАР Сб. науч. тр. Химия, технология, медицина : Материалы Международ. конф. — М., 2006. — **17**. — С. 519–522.
25. Агабейли Р.А., Керимова А.И. Стероидные сапонины в предотвращении генетической нестабильности // Изв. биол. науки. — Баку : Элм, 2009. — **64**, № 3/4. — С. 40–46.

Поступила 09.06.11