

Р.А. АГАБЕЙЛИ, Г.Г. МИРЗАЗАДЕ
Институт ботаники НАН Азербайджанской Республики, Баку
E-mail: renaagabey1@rambler.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ МАСЕЛ ИЗ ПЛОДОВ И ЛИСТЬЕВ *FAGUS ORIENTALIS* LIPSKY



Установлена антимуtagenная активность масел, полученных из плодов и листьев бука восточного *Fagus orientalis*, их способность предотвращать спонтанные и индуцированные химическими мутагенами и старением аберрации хромосом в клетках *Allium cepa* L., *Triticum aestivum* L., *Vicia faba* L., крыс линии Вистар, а также генные мутации у *Arabidopsis thaliana*.

© Р.А. АГАБЕЙЛИ, Г.Г. МИРЗАЗАДЕ, 2011

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2011. № 4

Введение. Одним из новых направлений мобилизации растительных ресурсов является выявление биологически активных веществ, обладающих генозащитными свойствами, с целью их использования в фармацевтической и пищевой промышленности. Эти исследования, с одной стороны, позволяют оценить роль различных метаболитов в регуляции генетической устойчивости растений, с другой – выявить перспективные виды растений, являющихся ценными источниками получения лекарственных средств и пищевых добавок с генозащитными, антиоксидантными, антиканцерогенными и геропротекторными свойствами [1–9]. Антимутагенная активность выявлена у ряда растительных масел – физалисового, кукурузного, подсолнечного, облепихового, рисового, букового, оливкового, розового, из зародышей пшеницы, семян тыквы и др. [9]. Впервые антимуtagenное действие масел, полученных из плодов и листьев бука восточного, было показано на растениях и млекопитающих в условиях спонтанного и индуцированного ионизирующей радиацией мутационного процесса [4]. Изучены радиозащитные свойства масел из плодов и листьев бука в зависимости от способа их применения, проявления эффективности действия во времени, особенностей возникновения и развития реакций свободно-радикального окисления в тканях мозга, печени, селезенки, надпочечников и кишечника крыс, подвергнутых общему острому воздействию гамма-лучей, и установлена их антиоксидантная и антимуtagenная активность [7, 9]. Целью настоящего исследования являлось проведение комплексной оценки генопротекторных свойств масел, полученных из листьев и плодов бука, в условиях индукции мутаций химическими мутагенами, выявление механизмов их действия и возможности их практического применения.

Материал и методы. Объекты исследования – *Allium cepa* L., *Triticum aestivum* L., *Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana* раса En, крысы линии Вистар в возрасте 28 недель массой 180–200 г. Методы исследования: 1) анафазный метод цитогенетического анализа частоты аберраций хромосом (АХ) в проростках растений и миелокариоцитах крыс, а также митотической активности (МА) по стандартной методике [10]; 2) анализ ядерных доминантных эмбриональных хлорофильных мутаций в недо-

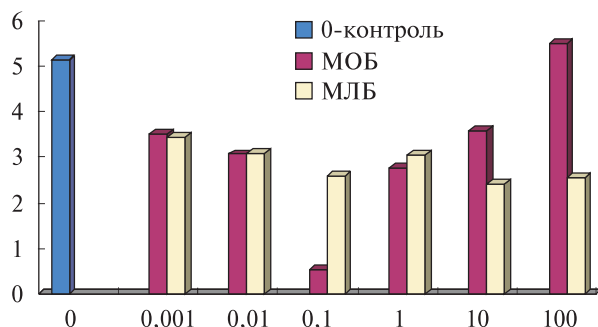


Рис. 1. Влияние масел из плодов (МОБ) и листьев (МЛБ) *Fagus orientalis* Lipsky на частоту aberrаций хромосом (по вертикали, %) в клетках *Allium cepa* L. По горизонтали – концентрация масел, мкг/мл

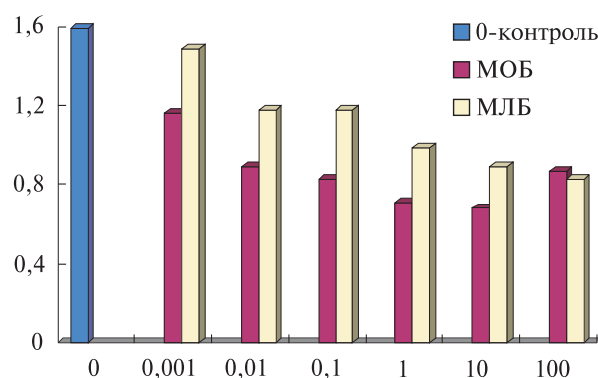


Рис. 2. Влияние масел из плодов (МОБ) и листьев (МЛБ) *Fagus orientalis* Lipsky на частоту aberrаций хромосом (по вертикали, %) в клетках *Triticum aestivum* L. По горизонтали – концентрация масел, мкг/мл

зрелых стручках верхушечного соцветия резушки Таля пробирочного асептического культивирования по эмбрион-тесту Мюллера (более 200 растений на вариант эксперимента) [11]; 3) костный мозг из бедренных костей крыс фиксировали в растворах Карнуа (6:3:1) с последующим хранением в 70%-ном этиловом спирте. Готовили давленные временные препараты путем окрашивания костного мозга в 2%-ном растворе ацетоорсеина. В каждом варианте опыта анализировали до 1000 клеток и более. Индукторы мутаций: нитрозогуанидин (НГ) на растениях – 1 мМ, на животных – 3 мг на 100 г массы; нитрозометилмочевина (НММ) на растениях – 0,02 %. Модификаторы мутаций – масла из орешков (МОБ) и листьев (МЛБ) бука. Для получения водных растворов масел использовали солюбилизатор.

Семена проращивали в термостате при температуре 25 °С. Контролем служили семена, не подвергнутые воздействию мутагенов и проращиваемые на дистиллированной воде с добавлением солюбилизатора в эквивалентной концентрации. В опытах на животных масла вводили *per os* в дозах 10, 20, 60 мг на 100 г массы, в объеме по 0,5 мл каждой в течение 7 дней до мутагена и однократно с последующей их декапитацией через 24 ч. Масла получены в отделе растительных ресурсов Института ботаники НАН Азербайджанской Республики методом экстракции. Полученные данные статистически обработаны по методике Лакина [12].

Результаты исследований и их обсуждение. Цитогенетические эффекты МОБ и МЛБ изучены при выявлении их дозовой зависимости и в динамике. Установлена антимуtagenная активность (АА) масел в широком диапазоне концентраций, способность снижать частоту спонтанных и индуцированных старением АХ в клетках лука и пшеницы (рис. 1 и 2). Высокие концентрации масел не проявляли мутагенного и цитотоксического действия, изменения МА и спектра структурных мутаций, что свидетельствовало об отсутствии их генотоксичности. Антимуtagenная эффективность (АЭ) масел зависела от концентрации, наиболее эффективными были для МОБ – 0,1 и 1 мкг/мл, для МЛБ – 10 и 100 мкг/мл. Исследовано влияние обоих препаратов в этих концентрациях на мутационный процесс в клетках *A. cepa* в течение митотического цикла (рис. 3) и установлена их высокая АЭ на все сроки фиксации материала. АЭ препарата МЛБ возрастала и в опыте с использованием семян, имеющих высокую частоту спонтанной мутабельности. При изучении молекулярных механизмов действия биологически активных препаратов, обладающих генозащитными свойствами, используют различные методы. Один из них – оценка влияния препарата на активность конкретных ферментов организма, которая обычно проводится *in vitro*. Другой метод выявления «точек приложения» веществ основан на использовании маркеров с заранее известным механизмом действия. Изменение их эффекта при совместном введении *in vivo* с исследуемым препара-

Таблица 1

Влияние нитрозогуанидина (НГ) и нитрозометилмочевины (НММ) на частоту аберраций хромосом (АХ) в клетках *Vicia faba* L. и *Allium cepa* L. и их модификация буковым маслом из плодов (МОБ) и листьев (МЛБ) *Fagus orientalis* Lipsky

Варианты эксперимента	Изучено клеток	Клетки с АХ, %		td	ФЭА
		n	M ± m		
<i>Vicia faba</i> L.					
0-контроль	542	40	7,38 ± 1,12	—	—
НГ, 1мМ	573	102	17,80 ± 1,60	—	—
НГ + МОБ, 0,01 мкг/мл	650	48	7,39 ± 1,03	5,4	0,59
НГ + МЛБ, 0,01 мкг/мл	755	69	9,13 ± 1,04	6,8	0,51
0-контроль	893	34	3,80 ± 0,63	—	—
НММ, 0,02 %	726	60	8,26 ± 1,02	3,4	—
<i>Allium cepa</i> L.					
3 ч НММ → МОБ, мкг/мл					
100	718	28	3,89 ± 0,72	3,5	0,52
10	586	22	3,75 ± 0,78	3,5	0,54
1	886	36	4,06 ± 0,66	3,7	0,50
0,1	587	24	4,08 ± 0,81	3,2	0,50
0,01	678	29	4,27 ± 0,77	3,1	0,48
3 ч НММ → 3 ч МОБ → H ₂ O, мкг/мл					
100	820	32	4,02 ± 0,68	3,2	0,51
10	974	34	3,49 ± 0,56	4,1	0,57
1	735	28	3,80 ± 0,70	3,2	0,53
0,1	890	35	3,93 ± 0,65	3,5	0,52
0,01	843	36	4,27 ± 0,69	3,2	0,53

том позволяет предположить, за счет каких механизмов осуществляется фармакологическое действие препарата [13]. Те же критерии применяются при исследовании механизмов действия антимуагенов [1]. В связи с этим в эксперименты были вовлечены химические мутагены прямого типа действия НММ и МННГ, механизм действия которых связан с повреждением структуры ДНК [14]. Результаты исследований показали, что МОБ проявляет АА вне зависимости от способов его применения как при индукции НММ АХ в клетках *A. cepa*, так и при индукции НГ АХ в клетках *V. faba* и последующем проращивании семян в водных растворах МОБ и МЛБ (табл. 1). Используемые способы обработки МОБ не влияли на АЭ, и этот показатель препарата превышал 50%-ный уровень в обоих вариантах эксперимента [9]. В опытах на *A. thaliana* семена замачивали в 1 мМ растворе НГ, затем 30 мин отмывали под проточной водой, высе-

Таблица 2
Модификация маслом из плодов (МОБ) *Fagus orientalis* Lipsky индуцированных нитрозогуанидином (НГ) хлорофильных мутаций у *Arabidopsis thaliana*

Варианты	Количество просмотренных стручков	Хлорофильные мутации, %		td	ФЭА
		n	M ± m		
НГ, 1 мМ	315	39	12,8 ± 1,86	—	—
НГ + МОБ, 0,01 мкг/мл	279	15	5,4 ± 1,34	—	0,57

Примечание. Контроль — 0,2 ± 0,04.

вали в пробирки с минимальной агаризованной средой [15] и проращивали при t = 24 ± 1 °С. Анализ индуцированных НГ генных мутаций выявил увеличение их частоты с 0,2 ± 0,04 % в контроле до 12,8 ± 1,86 % в опыте [9]. Установлена высокая антимуагеновая эффективность МОБ, способность снижать до

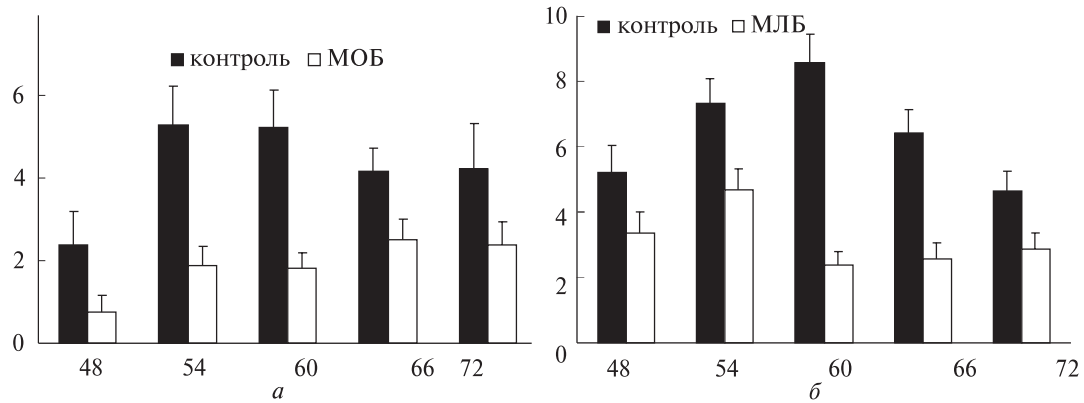


Рис. 3. Влияние масел: а – из плодов (МОБ, 0,01 мкг/мл); б – из листьев (МЛБ, 10 мкг/мл) *Fagus orientalis* Lipsky на частоту aberrаций хромосом в клетках свежих и старых семян *A. sepa* L. в динамике; по вертикали – aberrации хромосом, %; по горизонтали – время фиксации, ч

Таблица 3
Влияние МННГ (3 мг/100 г) на частоту aberrаций хромосом (АХ) в клетках костного мозга крыс и их модификация маслами из плодов (МОБ) и листьев (МЛБ) *Fagus orientalis* Lipsky в зависимости от способов введения

Варианты эксперимента и концентрация, мг/100 г	Изучено клеток	Клетки с АХ, %		td	ФЭА
		n	M ± m		
0 (контроль)	1945	38	1,95 ± 0,31	–	–
МННГ					
3	1215	128	10,53 ± 0,88	–	–
7 дней МОБ → МННГ					
10	1437	51	3,54 ± 0,48	6,9	0,66
20	1125	43	3,82 ± 0,32	7,1	0,63
60	1655	47	2,83 ± 0,40	7,9	0,73
7 дней МЛБ → МННГ					
10	1457	56	3,84 ± 0,50	6,6	0,63
20	1250	36	2,88 ± 0,47	7,6	0,72
60	1650	48	2,90 ± 0,41	7,8	0,72
МОБ + МННГ					
10	2018	87	4,31 ± 0,45	6,2	0,59
20	2314	82	3,54 ± 0,38	7,2	0,67
60	1937	56	2,89 ± 0,38	7,9	0,72
МЛБ + МННГ					
10	2038	99	4,85 ± 0,47	5,6	0,53
20	1789	74	4,13 ± 0,47	6,4	0,60
60	1345	50	3,71 ± 0,51	6,7	0,64

57 % ($5,4 \pm 1,34$ %) индуцированную НГ частоту ядерных хлорофильных мутаций почти до уровня контроля при его постмутагенном действии (табл. 2).

Изучены эффекты масел на индуцированную НГ частоту АХ в миелокариocyтах крыс в зависимости от способов применения, включающих как их предварительное ежедневное

введение *per os* в стандартный рацион питания животных в течение 7 дней до мутагена, так и одновременно с мутагеном. Действие НГ привело к увеличению частоты АХ с $1,95 \pm 0,31$ % в контроле до $10,53 \pm 0,88$ % в опыте (табл. 3). Введение в рацион животных МОБ снизило индуцированную НГ частоту АХ во всех вариантах эксперимента, и АЭ его была высока

(66–73 и 63–72 %). АЭ МЛБ (63–72 %) зависела от способов его введения и в наибольшей степени отмечена в варианте с введением масла животным до мутагена в концентрации 60 мг на 100 г массы (табл. 3). Высокая АЭ масел, очевидно, обусловлена их физико-химическими показателями, в состав которых входят токоферолы (19,02–24,00 мг%), каротиноиды (12,26–14,68,00 мг%), стеринны. Жирнокислотный состав, состоящий в основном из олеиновой (38,60–50,84 %), линолевой (26,03–37,00 %), пальмитолеиновой (6,98–9,05 %), арахидиновой (1,47–3,90 %) кислот, также может вносить вклад в их АЭ [16]. Являясь внутриклеточными компонентами защитных систем организмов, для них показаны антиоксидантные, антимутагенные и радиопротекторные свойства [1–9, 17, 18]. Оливковое и буковое масло защищают организм от летального действия при общем облучении организма, обнаруживают защиту от гибели [6, 7] и уменьшение генетических повреждений в половых клетках млекопитающих [5, 6]. Результаты комплексной оценки генозащитного действия масел из *Fagus orientalis* в различных тест-системах выявили универсальность их генопротекторных свойств, способность предотвращать частоту спонтанной и индуцированной нестабильности хромосом, генных мутаций и в отношении мутагенных факторов, которые индуцируют различные типы повреждений ДНК, различающихся механизмом формирования мутаций.

Полученные данные представляют интерес с точки зрения практического применения масел из плодов и листьев *Fagus orientalis* как потенциальных пищевых добавок и фармакологических средств, обладающих антимутагенной активностью.

R.A. Agabeyli, G.G. Mirzazadeh

GENOPROTECTIVE ACTIVITIES
OF THE OILS FROM LEAVES
AND FRUITS OF *FAGUS ORIENTALIS* LIPSKY

The antimutagenic activities of the oils obtained from leaves and fruits of *Fagus orientalis* have been shown in experiments with spontaneous and mutagen- and ageing-induced variability. The aberrations of chromosomes in the meristematic cells of the *Allium cepa* L., *Vicia faba*, *Triticum aestivum* L., and marrow cells of *Vistar* rats as well as

Arabidopsis thaliana gene mutations have been mobilized as experimental tests.

R.A. Agabeyli, G.G. Mirzazadeh

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОПРОТЕКТОРНИХ
ВЛАСТИВОСТЕЙ МАСЕЛ З ПЛОДІВ ТА ЛИСТЯ
FAGUS ORIENTALIS LIPSKY

Встановлено антимутагенну активність масел, отриманих з плодів та листя бука східного *Fagus orientalis*, їхню здатність попереджати спонтанні та індуковані хімічними мутагенами та старінням аберації хромосом в клітинах *Allium cepa* L., *Triticum aestivum* L., *Vicia faba* L., шурів лінії Вістар, а також генні мутації у *Arabidopsis thaliana*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алекперов У.К. Антимутагенез. Теоретические и практические аспекты. — М.: Наука, 1984. — 100 с.
2. Агабейли Р.А., Мамедова Н.Р. Генотоксиканты среды: риск, оценка и управление. — Баку: Элм, 2006. — 169 с.
3. Weisburger J.H. Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms // Eur. J. Cancer Preven. — 2002. — 11 (Suppl. 2). — S1–S7.
4. Agabeyli R.A. Antimutagenic effect of lipid containing compounds obtained from *Fagus orientalis* on the mutability induced by aging and x-rays // Proc. 5th Intern. Conf. on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. — Okayama, 1996. — P. 39.
5. Magsood M., Ashikawa. Fertility studies of x-irradiated male mice // Fertil. and Steril. — 1961. — 12, № 5. — P. 452–458.
6. Visioli F., Gally C. Olive oil: more than just oleic acid // Amer. J. Clin. Nutr. — 2000. — 72. — P. 853–856.
7. Агабейли Р.А., Микаилова У.Т., Нейманзаде Н. Антимутагенные, антиоксидантные и радиопротекторные свойства букового масла (*Fagus orientalis* Lipsky) на млекопитающих, подвергнутых действию ионизирующего облучения // Биоантиоксидант: Тез. докл. VI Междунар. конф. — М., 2002. — С. 13–15.
8. Alekperov U.K., Mirzazadeh G.G., Agabeyli R.A. Inhibition by compositional plant antimutagens the xenobiotics induced mutability in *Vicia faba* // J. Drug Metab. Rev. — 2002. — 34. — Suppl. 1. — P. 93–186.
9. Агабейли Р.А. Биоантиоксиданты: роль в генетической устойчивости и охране биоразнообразия. — Баку: Элм, 2008. — 251 с.
10. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
11. Müller A.J. Embryonentest zum wachweis rezersiver

- letalactofactoren bei *A. thaliana* // Biol. Zbl. — 1963. — 82. — P. 133.
12. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 350 с.
13. *Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н.* Клиническая фармакология. — М., 1993.
14. *Тарасов В.А.* Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. — М.: Наука, 1982. — 228 с.
15. *Veleminsky J., Gichner T.* Sterile culture of *Arabidopsis* on agar medium // J. Arabidopsis Inform. Serv. — 1964. — № 1. — P. 34.
16. *Сафарова Г.С.* Биоэкологические особенности исследования бука восточного (*Fagus orientalis* Lipsky) произрастающего в Азербайджане: Автореф. дис... канд. биол. наук. — Баку, 1996. — 27 с.
17. *Aikawa K., Kamatsu Y.* Antimutagenic effects of autoxidized Linoleic and oleic acids on UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* // Agr. and Biol. Chem. — 1987. — 51, № 10. — P. 2717–2720.
18. *Zhu Y.P., Su S.-W., Li C.-H.* Growth-inhibition effects of oleic acid, linoleic acid, and their methyl esters on transplanted tumors in mice // J. Nat. Cancer Inst. — 1989. — 81 — P. 1302–1306.

Поступила 14.02.10