

**RESEARCH OF GENOPROTECTIVE
EFFECTIVENESS OF EXTRACTS
FROM TEA LEAVES ON THE MUTATIONAL
PROCESS INDUCED BY THE IONIZING
RADIATION AND CHEMICAL
MUTAGENS IN CELLS OF WHEAT
AND BARLEY**

M. Quseynov, Candidate of Biological sciences, Associate Professor
Lankaran State University, Azerbaijan

The genoprotective effectiveness of the extracts of the tea leaf from different stages of technological processing has been studied. The mutations induced in the wheat and oats cell by gamma-rays and dimethyl(a)antrocene. The results of experiments demonstrated the decreasing of the antimutagenic effectiveness of extracts from the late stages of leaf processing.

Conference participant, National championship
in scientific analytics, Open European and Asian
research analytics championship

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОПРОТЕКТИВНОЙ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ
ЛИСТЬЕВ ЧАЯ НА МУТАЦИОННЫЙ
ПРОЦЕСС, ИНДУЦИРОВАННЫЙ
ИОНИЗИРУЮЩИМ ОБЛУЧЕНИЕМ
И ХИМИЧЕСКИМИ МУТАГЕНАМИ
В КЛЕТКАХ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ**

Гусейнов М.В., канд. биол. наук, доцент
Ленкоранский государственный университет, Азербайджан

Установлена антимутагенная активность экстрактов из листьев чая, полученных с различных стадий их технологической обработки при модификации мутационного процесса индуцированного гамма-лучами, нитрозометилмочевинной и диметилбенз (а) антраценом в клетках ячменя и пшеницы. Эффективность антимутагенного действия экстрактов последовательно снижается на стадиях производственного процесса. Сравнительная оценка их антимутагенной эффективности выявила высокую антимутагенную эффективность экстракта полученного из зелёных листьев чая.

Участник конференции, Национального первенства
по научной аналитике, Открытого Европейско-Азиатского
первенства по научной аналитике

Введение. Накопленные на сегодняшний день данные о роли ингибиторов мутагенеза в антиканцерогенезе свидетельствуют о перспективах практического применения многих ингибиторов мутагенеза, имеющих природное происхождение и действующих с помощью множественных и разных не исключаящих друг друга механизмов, включая воздействие, как на внеклеточном, так и на внутриклеточном уровне [1–3]. В частности, результаты исследований в области практических разработок по применению антимутагенов свидетельствуют о снижении уровня ряда заболеваний, в том числе связанных с повреждением генетических структур, а также смертности от онкологических заболеваний [1]. Об этом также свидетельствуют работы по применению практических разработок в области антимутагенеза в пищевой и фармакологической промышленности, геронтологии, профилактической медицине и для терапии осложнений, связанных с производственной и бытовой интоксикацией [1, 2]. Последние годы внимание исследователей направлено на изучение генозащитных свойств композиционных антимутагенов, результаты которых показали, что смеси антимутагенов проявляют более высокую

эффективность действия, чем его отдельные компоненты [1, 3]. Антимутагенным и антиканцерогенным свойствам зелёного чая посвящено большое число экспериментальных исследований. Также, эти исследования свидетельствуют о том, что действие зелёного чая ингибирует рак и подавляет рост опухолевых клеток в различных органах человека и в связи с полученными данными сегодня зелёный чай активно используется в профилактических целях в Японии [4].

Вышеуказанное предопределило проведение цикла исследований по изучению антимутагенных свойств чая с различных стадий его технологической обработки при модификации ими мутагенного действия ионизирующего облучения и химических мутагенов с различным механизмом действия и проведения сравнительной оценки их антимутагенной эффективности.

Материал и методы. В качестве объекта исследования использовали ячмень (*Hordeum vulgare* L.) и пшеницу (*Triticum aestivum*). Анализ аберраций хромосом проводили в анафазе митоза клеток апикальной меристемы первичных корешков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) [5]. В качестве мутагенов

использовали – гамма-лучи (ГЛ) в дозе 4.8 Гр (телегамма – терапевтическая установка РОКУС-М, ⁶⁰Co, мощность дозы 48р/мин; расстояние – 60 см), химические мутагены – алкилирующий мутаген прямого типа действия нитрозометилмочевина (НММ) в концентрации 0,02%, промутаген – диметилбенз (а) антрацен (ДМБА) фирмы «Serva» – в концентрации 10мкг/мл. В качестве модификаторов мутационного процесса изучены водно – спиртовые экстракты с содержанием сухих веществ 35–37% из листьев чая (0,01мкг/мл) полученные с различных стадий их технологической обработки (ТО), включающей стадии с: зелёных листьев → увядания → скручивания → ферментации → сушки → чёрного чая. Водно – спиртовые экстракты получены в отделе растительных ресурсов Института Ботаники Национальной Академии Наук Азербайджанской Республики.

Полученные данные обработаны общепринятыми методами математической статистики [6]. Фактор антимутагенной эффективности (ФЭА) исследуемых модификаторов рассчитывался по известной формуле [7].

Условия проведения эксперимента.

Свежие сухо – воздушные семена пшеницы и ячменя проращивали в

0,01мкг/мл растворах экстрактов чая в термостате, в чашках Петри при $t = 25^{\circ}\text{C}$. Растворы препаратов готовили на дистиллированной воде, рН воды 5,4. В экспериментах с облучением сухо-воздушные семена пшеницы и ячменя сразу после облучения проращивали в растворах чая. В экспериментах с химическими мутагенами семена в течение 6-ти часов подвергали воздействию путём их замачивания в растворах мутагенов с последующим отмыванием от мутагена под проточной водой в течение 30 минут и дальнейшим проращиванием в растворах экстрактов. Проростки пшеницы и ячменя длиной 10–15 мм фиксировали смесью (фиксатор Карнуа) абсолютного этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1) через 45–48 часов от начала замачивания семян. Готовили давлен-

ные ацетокарминовые препараты, на которых проводили анализ aberrаций хромосом (АХ).

Результаты исследований и их обсуждение. Цитогенетические эффекты экстрактов чая с различных стадий ТО изучены при индукции ГЛ частоты aberrаций хромосом в клетках меристемы корешков пшеницы и ячменя, таблица 1.

Из результатов таблицы видно, что экстракты чая полученные со стадий ТО способствуют снижению индуцированной ГЛ частоты aberrаций хромосом с неодинаковой эффективностью. Наиболее высокой антимуtagenной эффективностью отличались экстракты полученные с первых трёх стадий ТО от 54 до 45%, со стадий сушки и до получения чёрного чая антимуtagenная эффективность экстрактов чая характеризуется

значительным снижением, составив 37–29%. Так, если индуцированная ГЛ частота aberrаций хромосом модифицируется экстрактом из зелёных листьев с эффективностью действия до 54%, то ФЭА из чёрного чая снижается до 29%. Однако, необходимо также отметить и то, что изученные экстракты чая не содержат мутагенных продуктов в исходном виде, свидетельством чего является отсутствие их мутагенного действия на спонтанный мутагенез (ранее проведенные исследования) и отсутствие синергизма с генотоксическим действием радиации. В следующей серии экспериментов были изучены цитогенетические эффекты экстрактов чая при модификации ими частоты aberrаций хромосом индуцированных химическим мутагеном – НММ, таблица 2.

Таблица 1.

Влияние экстрактов чая (0,01 мкг/мл), полученного с различных стадий его технологической обработки на частоту aberrаций хромосом в клетках меристемы проростков из облучённых гамма-лучами в дозе 2,9 гр семян пшеницы и ячменя

Вариант опыта	Аберрации хромосом, %	td	P	ФЭА
	$M \pm m$			
Пшеница				
контроль	3,12±0,64	–	–	–
гамма-лучи	9,15±1,02	–	–	–
листья зелёного чая	4,17±0,68	4,0	< 0,001	0,54
увядание	4,59±0,71	3,6	< 0,001	0,50
скручивание	4,99±0,74	3,3	< 0,001	0,45
ферментация	5,72±0,80	2,6	< 0,05	0,37
сушка	6,13±0,82	2,3	< 0,05	0,33
чёрный чай	6,51±0,83	2,00	< 0,05	0,29
Ячмень				
контроль	3,63± 0,64	–	–	–
Гамма-лучи	10,46±1,04	–	–	–
листья зелёного чая	5,00±0,75	4,3	< 0,001	0,52
увядание	5,32±0,76	4,0	< 0,001	0,49
скручивание	5,96±0,80	3,4	< 0,001	0,43
ферментация	6,47±0,84	4,0	< 0,01	0,38
сушка	7,23±0,88	2,3	< 0,05	0,31
чёрный чай	7,55±0,90	2,1	< 0,05	0,28

Таблица 2.

Влияние экстрактов чая (0,01 мкг/мл) полученного с различных стадий его технологической обработки на частоту аббераций хромосом индуцированных НММ (5,5 мМol) в клетках меристемы проростков из семян пшеницы и ячменя

Вариант опыта	Абберации хромосом, %	td	P	ФЭА
	M ± m			
Пшеница				
контроль	1,85±0,82	–	–	–
НММ	9,00±0,98	–	–	–
листья зелёного чая	4,48±0,71	3,7	< 0,001	0,50
увядание	4,73±0,72	3,5	< 0,001	0,47
скручивание	5,16±0,76	3,1	< 0,001	0,43
ферментация	5,49±0,77	2,8	< 0,05	0,39
сушка	5,98±0,80	2,3	< 0,05	0,34
чёрный чай	6,31±0,82	2,1	< 0,05	0,30
Ячмень				
контроль	3,63±0,64	–	–	–
НММ	7,78±0,91	–	–	–
листья зелёного чая	4,05±0,65	3,3	< 0,001	0,48
увядание	4,35±0,70	2,9	< 0,001	0,44
скручивание	4,71±0,72	2,6	< 0,001	0,39
ферментация	4,87±0,73	2,4	< 0,01	0,37
сушка	5,13±0,74	2,2	< 0,05	0,34
чёрный чай	5,41±0,77	1,9	< 0,05	0,30

Как видно из результатов таблицы 2 и в этих экспериментах была выявлена антимуtagenная активность экстрактов чая с различных стадий ТО и их способность ингибировать индуцированную НММ частоту АХ в клетках растений, отличающихся наличием собственной системы метаболической активации. Результаты проведенной серии экспериментов подтвердили наличие тенденции снижения антимуtagenной эффективности экстрактов чая в зависимости от стадий его ТО (зелёных листьев → увядания → скручивания → ферментации → сушки → чёрного чая) до готового продукта. Так, в экспериментах на пшенице, экстракты полученные с первых трёх стадий ТО проявили антимуtagenную эффективность в пределах 50–43%, тогда как видно из таблицы эффективность действия готового чёрного

чая снизилась до 30%. В экспериментах, проведенных на ячмене, также, была выявлена тенденция снижения антимуtagenной эффективности экстрактов чая, полученных с различных стадий ТО, таблица 2. Из результатов этой серии экспериментов видно, что антимуtagenная эффективность экстрактов полученных с первых трёх стадий ТО составила 48-39%, что также значительно ниже этих показателей в экспериментах на пшенице. Одновременно повторяется и тенденция снижения эффективности антимуtagenного действия чая на последующих стадиях ТО до 30%. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о способности экстрактов из образцов чая, полученных с различных стадий ТО предотвращать мутационный процесс, связанный с повреждением структуры ДНК. НММ

мутaген прямого действия, действующий без метаболической активации, относится к классу веществ, которые реагируют с ДНК и присоединяют к основаниям углеводородные радикалы [8]. Вышеприведенные данные, позволяют предположить, что одним из механизмов генозащитного действия изученных в работе экстрактов чая, может быть предотвращение мутационного процесса связанного с заменой пар оснований. С целью выявления физиологичности, универсальности и механизма действия антимуtagenного действия исследуемых в работе экстрактов чая, характеризующихся проявлением антимуtagenной активности на всех стадиях ТО, в эксперимент был вовлечён широко распространённый в окружающей среде промутаген ДМБА. В этой серии экспериментов (таблица 3), проведенных

Таблица 3.

Влияние экстрактов чая (0,01 мкг/мл) полученного с различных стадий технологической обработки на частоту aberrаций хромосом индуцированных ДМБА (5,5 мМол) в клетках меристемы проростков из семян пшеницы и ячменя

Вариант опыта	Аберрации хромосом, %	td	P	ФЭА
	M ± m			
Пшеница				
контроль	3,12±0,64	–	–	–
ДМБА	6,36±0,82	–	–	–
листья зелёного чая	3,44±0,62	2,8	< 0,01	0,46
увядание	3,67±0,64	2,6	< 0,01	0,42
скручивание	3,85±0,66	2,3	< 0,05	0,39
ферментация	4,03±0,67	2,2	< 0,05	0,37
сушка	4,23±0,69	1,9	< 0,05	0,33
чёрный чай	4,59±0,72	1,6	< 0,05	0,28
Ячмень				
контроль	3,63±0,64	–	–	–
ДМБА	10,35±1,06	–	–	–
листья зелёного чая	4,44±0,70	4,6	< 0,001	0,57
увядание	4,73±0,72	4,3	< 0,001	0,54
скручивание	5,17±0,75	3,9	< 0,001	0,50
ферментация	6,05±0,81	3,2	< 0,01	0,42
сушка	6,52±0,84	2,8	< 0,01	0,37
чёрный чай	7,03±0,87	2,4	< 0,05	0,32

согласно вышеприведенным схемам, была установлена антимуtagenная активность экстрактов чая и по отношению к мутационному процессу, индуцированному ДМБА, эффективность действия которых снижалась, в той же последовательности, что и в вышеприведенных экспериментах – зелёные листья → увядание → скручивание → ферментация → сушка → чёрный чай. Результаты сравнительной оценки антимуtagenной эффективности экстрактов чая с различных стадий ТО (Таблицы 1–3) в предотвращении индуцированного физико-химическими факторами мутационного процесса выявили высокую эффективность экстрактов с первых трёх стадий ТО, 65–56%.

Как отмечалось выше, изучению антимуtagenной и антиканцерогенной

активности зелёного чая посвящено значительное число экспериментальных работ. Так, антимуtagenная активность водного экстракта из зелёного чая (*Camellia sinensis*) показана на культуре клеток китайского хомячка [9]; в системе *Drosophila melanogaster*; также показана антимуtagenная и антиканцерогенная активность (водного) экстракта зелёного чая в печени крыс [10]. Полифенолы зелёного чая ингибируют индуцированный N-нитрозобис-(2-оксипропил)-амином карциногенез поджелудочной железы у золотистых сирийских хомячков [9]. Результаты исследования механизма генозащитного действия отдельных метаболитов фенольной или полифенольной природы позволили выдвинуть предположение, что в основе функционирования этих механизмов

лежит адсорбция или инактивация мутагенов прямого и косвенного типа действия [9, 12, 13]; подавление процессов метаболической активации промутагенов [13], а также направленная регуляция активности ферментов пострепликативной [14] и эксцизионной [15; 16] репарации. Также, установлено, что в основе механизма генозащитного действия отдельных метаболитов и ферментов чая лежат механические поглощающие свойства к которым относят катехины, танины. Сравнение экстрактов и полифенолов зелёного и чёрного чая показали, что они имеют практически одинаково полезный эффект для здоровья [10]. Чайный лист содержит сильные антиоксидантные полифенолы, такие как эпигаллокатехин галлат (ЭГКГ) и фермент полифенолоксидазу.

В настоящей работе, в отличие от известных, впервые изучено влияние процесса технологической обработки чая на сохранение его генозащитных свойств и эффективность антимутагенного действия экстрактов с различных стадий его обработки.

Процесс стадий ТО чая от зелёного до чёрного чая способствует снижению его антимутагенной эффективности (АЭ) при модификации ими в дозе 0,01мкг/мл мутационного процесса индуцированного мутагенами в клетках меристемы первичных корешков пшеницы и ячменя в последовательности: зелёный чай > увядание > скручивание > ферментация > сушка > чёрный чай. Антимутагенная эффективность зелёного чая на этапах ТО в клетках меристемы корешков пшеницы и ячменя превысила АЭ чёрного чая при действии ГЛ соответственно на 25 и 24%; НММ на 20 и 18%; ДМБА на 18 и 25%.

Выводы:

1. Изучено влияние процесса технологической обработки чая на сохранение его генозащитных свойств и эффективность антимутагенного действия экстрактов с различных стадий его обработки в клетках пшеницы и ячменя, установлена их антимутагенная активность.

2. Сравнительная оценка антимутагенной эффективности экстрактов чая, полученных с различных стадий его технологической обработки выявила высокую эффективность экстракта из листьев зелёного чая.

3. Антимутагенное действие водно-спиртовых экстрактов чая, с образцов, полученных с различных стадий его технологической обработки установлено в отношении мутагенных факторов, индуцирующих различные типы повреждений ДНК, в том числе: гамма-лучей; нитрозометилмочевины – НММ и диметилбенз (а) антрацена (ДМБА).

4. Антимутагенная активность экстрактов чая носит неспецифический характер, проявляясь вне зависимости от типа действия химических мутагенов и свидетельствует о проявлении их генозащитных свойств на разных этапах формирования и развития мутационных событий.

References:

1. Weisburger J.H. // Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms. – European Journal of Cancer Prevention 2002, Volume 11, (Suppl 2), S1-S7.
2. Alekperov U.K. // Plant antimutagens and their mixtures in inhibition of genotoxic effects of xenobiotics and aging processes. – European Journal of Cancer Prevention 2002, 11 (suppl 2), P. 8-11.
3. Агабейли П.А. // Антиоксиданты и антиоксидантные ферменты в регуляции мутационного процесса. – Баку, Элм, 1989, с. 119.
4. Fujiki H., Sukanuma M., Okabe S., Sueoka N., et al. // Cancer inhibition by green tea. – 5th ICMAA. 1996. Okayama, Japan. – P. 7-8.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М. Колос. 1980. – С. 1-304.
6. Лакин Г.Ф. // Биометрия. М., Высшая школа, 1990. – с. 1-350.
7. Алекперов У.К. // Антимутагенез. Теоретические и практические аспекты. – М. Наука, 1984. – с. 1-102.
8. Тарасов В.А. // Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. М. «Наука», 1982. – с. 1-228.
9. Mamiko Miyajima and Yukiaki Kuroda. // Antimutagenic action of hot-water extracts of green tea (Camellia sinensis) in cultured Chinese Hamster V79 cells – 5th ICMAA. 1996. Okayama, Japan. – P. 32. p. – 113.

10. Fujie Sh., Fujikawa K. // Detection of delayed antigenotoxicity of green tea extract using a somatic mutation system of Drosophila melanogaster. – 5th ICMAA, December 2-6, 1996 Okayama, Japan. – p-101. P-20.

11. Allan H Conney, Yao-Ping Lu, You-Rong Lou, Mou-Tuan Huang. // Inhibitory effects of tea and caffeine on UV-induced carcinogenesis: relationship to enhanced apoptosis and decreased tissue fat. – European Journal of Cancer Prevention 2002, Volume 11, Suppl. 2, – S. 28-S36.

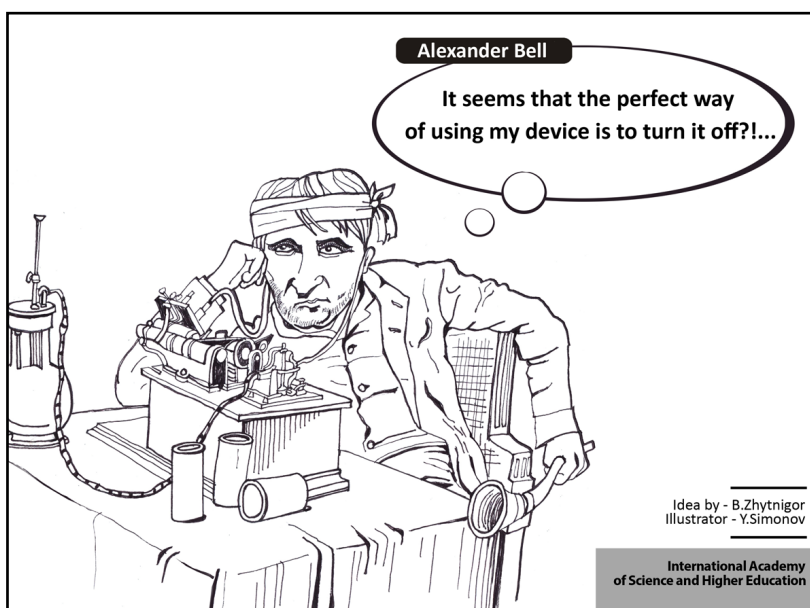
12. Nagabhusan M. Catechin as an mutagen and anticarcinogen. // Environ. And Mol Mutagens. 1989. Vol.14. Suppl. P.138.

13. Osawa T., Kumon H., Ruce C.A. // Inhibitory effect of lichen constituent on mutagenicity induced by heterocyclic amines. – Environ. and Mol. Mutagenes. 1991. Vol.18, №1. – p. 35-40.

14. Sasaki Y.F. Imanishi H., Ohna T. // Effect of antimutagenic flavourings on SCEs induced by chemical mutagens. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Test. 1987. Vol. 189. №3. – P. 313-318.

15. Hara Y. // Green tea. Marcel Dekker, New York, 2001 p. 252.

16. М.В.Гусейнов Генетическая активность биологически активных веществ представителей флоры тальша. Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası Botanika institunun elmi əsərləri. TOM XXVII Bakı-2007



Idea by - B.Zhytnigor
Illustrator - Y.Simonov

International Academy
of Science and Higher Education