

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОТЕНЦІЙНОЇ  
АНТИМУТАГЕННОЇ ДІЇ ЕЛГАЦИНУ**

*Проведено оцінку потенційної антимутагенної дії препарату "Елгацин" у трьох тест-системах: методом урахування рецесивних, зчеплених зі статтю летальних мутацій у дрозофіли, методом урахування частоти хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку щурів та методом обліку частоти домінантних летальних мутацій у статевих клітинах щурів. Показано, що на тлі використання елгацину зменшується частота летальних мутацій у мух-дрозофіл, дещо знижується відсоток сукупної кількості хромосомних порушень у клітинах кісткового мозку щурів, не змінюється мітотична активність статевих клітин щурів порівняно з інтактними тваринами. Узагальнення результатів дослідження дозволило дійти висновку про відсутність у елгацину мутагенної дії. Крім того, на тлі елгацину зменшуються або усуваються прояви генотоксичних впливів, що дозволяє обговорювати його антимутагенні властивості.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** елаготаніни, елгацин, мутагенні властивості, антимутагенна дія.

**ВСТУП.** Огляд літературних джерел останніх десятиліть показує, що одним із найбільш перспективних напрямків фармакологічного дослідження елаготанінів є з'ясування молекулярних механізмів їх антимутагенної, антиканцерогенної активності та встановлення залежності "структура-дія" серед мономерних, олігомерних, макроциклічних представників цього класу [6, 7, 9, 12]. Більшість публікацій присвячена дослідженню опосередкованого втручання елаготанінів у процеси мутагенезу та канцерогенезу через регуляцію накопичення, активації, детоксикації мутагенів і канцерогенів, а також модуляцію активності ферментів та факторів росту, відповідальних за процес клітинної трансформації і проліферації [9]. Р. W. Thulstrup et al. (1999) встановили спроможність ЕК безпосередньо взаємодіяти з молекулою ДНК. За допомогою оптичних спектроскопічних методів встановлено, що у нейтральній формі при рН 5,5 молекула ЕК приєднується до подвійної спіралі ДНК, тоді як підвищення значень рН значно лімітує взаємодію. Зазначений механізм, на думку авторів, можна вважати важливим молекулярним механізмом багатьох різновидів біологічної активності елагової кислоти [10]. Ще одним із можливих механізмів, які зумовлюють антимутагенну дію елаготанінів, вважають їх анти-

оксидантну активність. Відомо, що значна кількість мутагенів продукує активні форми кисню (АФК) як внаслідок біотрансформації, так і під час взаємодії з клітинними макромолекулами. У такому разі антиоксидантна дія елаготанінів забезпечує захист клітин від окисної трансформації [8, 9, 12]. У дослідях з опроміненням мишей (1,5–3,0 Gy) пероральне введення ЕК зменшувало чисельність клітин крові та спинномозкової рідини з ядерними і хромосомальними дефектами однаково ефективно, як і при застосуванні вітаміну Е в тій же дозі [7]. В інших дослідженнях [11] показано, що у реалізації антимутагенної дії елагової кислоти й інших фенольних сполук (галлової кислоти, кверцетину, (-)-епікатехінгалату, (-)-епігалокатехіну, таніну тощо) антиоксидантна дія не має вирішального значення.

У зв'язку із зазначеним, викликало інтерес дослідити наявність та особливості генотропної дії оригінального вітчизняного препарату "Елгацин", активна субстанція якого представлена сумою елаготанінів і який впроваджують у медичну практику як кардіопротекторний метаболітотропний засіб [5].

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Оцінку потенційної антимутагенної дії препарату "Елгацин" досліджували за повною програмою в трьох тест-системах: методом урахування рецесивних,

зчеплених зі статтю летальних мутацій у дрозофіли (РСЗЛ), методом урахування частоти хромосомних аберацій (ХА) у клітинах кісткового мозку щурів та методом обліку частоти домінантних летальних мутацій (ДЛМ) у статевих клітинах щурів [2–4]. Комплекс цих трьох тест-систем дозволяє зареєструвати весь можливий спектр генетичних порушень у соматичних і статевих клітинах еукаріот на генетичному, хромосомному та геномному рівнях, які можуть з'явитися під впливом препарату, і зробити належний висновок про його мутагенну/антимутагенну активність [2–4].

Метод РСЗЛ у *Drosophila melanogaster* (Меллер-5), який дозволяє оцінити здатність препарату індукувати генні мутації, було опрацьовано на двох лініях *D. melanogaster* – Oregon-R (дослідна) і Меллер-5 (Basc) (тестерна). У попередніх експериментах визначали LD<sub>50</sub> елгацину (LD<sub>50</sub>=3,75 мг/мл), в якій препарат додавали у поживне середовище. Личинок лінії Oregon-R третього личинкового віку відмивали від звичайного середовища і пересаджували на середовище, яке містило елгацин. Після вилуплення імаго відбирали самців, які ще не копулювали, і парували їх з віргінними самками лінії Меллер-5. Отримане потомство (F1) парували між собою. Одержане потомство другого покоління (F2) оцінювали візуально в культуральних пробірках. Пробірки, в яких були відсутні самці дикого типу, відзначали як “леталі” (тобто летальні мутації). Загальна кількість культуральних пробірок відповідала кількості проаналізованих Х-хромосом самців, які підлягали впливу препарату. Частоту летальних мутацій визначали у відсотках відносно кількості досліджених хромосом.

Для вивчення цитогенетичної активності елгацину щурам-самцям вводили препарат внутрішньошлунково в дозі 150 мг/кг одноразово згідно з методикою [2, 3]. Через 6, 24, 48 год тварин знеживлювали відповідно до вимог та принципів біоетики і вилучали стегову кістку. З кістки видаляли епіфіз, і разом з кістковим мозком фіксували її у фіксаторі Карнуа. Після проводки фіксованих кісток у батареї спиртів з кісткового мозку готували тимчасові давлені препарати, які фарбували розчином ацетокарміну. Облік частоти хромосомних аберацій проводили ана-телофазним методом, який дозволяє зареєструвати власне

ХА, в тому числі й порушення на рівні хроматид, а також злипання та відставання хромосом, які зазвичай пов'язані з порушенням структури клітинних мембран. Метод дає змогу в одному препараті оцінити рівень проліферативної активності клітин за допомогою обчислення мітотичного індексу.

Для проведення тесту ДЛМ щурам-самцям вводили препарат у дозі 15 і 150 мг/кг протягом періоду сперматогенезу, який охоплює всі стадії дозрівання сперматозоїдів – зрілі сперматозоїди, сперматиди та сперматоцити, за винятком стовбурових сперматогоній. Після закінчення введення самців парували з інтактними самками і реєстрували перший день вагітності. На 20-й день самок знеживлювали й оцінювали стандартні показники розвитку потомства: кількість жовтих тіл вагітності, рівень ембріональної смертності, кількість живих ембріонів, а також рівень ДЛМ [2]. Разом із цим, було досліджено запліднюючу здатність самців, що також є ознакою впливу препарату на геном статевих клітин.

Результати досліджень було оброблено статистично за допомогою параметричних та непараметричних критеріїв: критерію Фішера, критерію Стюдента і критерію Вілкоксона–Манна–Уїтні [1, 2].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** За допомогою методу РСЗЛ вивчено здатність елгацину індукувати у Х-хромосомі самців дикого типу рецесивні летальні мутації, які через жіночу лінію передаються самцям 2-го покоління. Результати дослідження наведено в таблиці 1.

Інтегральним показником, який дозволяє визначити мутагенні потенції досліджуваних об'єктів, є ступінь мутагенного ефекту. Як видно з таблиці 1, цей показник для елгацину дорівнював 0, що підтверджує відсутність його генотоксичної дії. Попри зазначене, вирощування личинок дрозофіл Oregon-R у живильному середовищі з додаванням елгацину позначилось виразною, хоча й невірогідно значущою, тенденцією до зменшення частоти летальних мутацій практично у 2 рази порівняно з контролем. Це дає підставу стверджувати, що при застосуванні елгацину створюються умови, за яких упереджується виникнення генних мутацій.

Більш деталізовану картину щодо впливу елгацину на генетичний апарат клітини було

Таблиця 1 – **Ступінь мутагенного ефекту субстанції елгацину**

Умови досліджу	Кількість досліджених хромосом	Частота летальних мутацій, f%±m%	Ступінь мутагенного ефекту, бали
Контроль	1020	0,392±0,20	
Субстанція елгацину	1004	0,199±0,14	0

отримано в дослідях на клітинах кісткового мозку щурів-самців, яким препарат вводили у значно більшій дозі (150 мг/кг), ніж його умовно-терапевтична (1 мг/кг). Результати вивчення цитогенетичної активності елгацину показали відсутність будь-яких негативних порушень на рівні хроматид і хромосом в усі терміни дослідження (табл. 2). Мітотична активність у тварин дослідної групи залишалася на рівні контролю, що свідчить про невтручання препарату в процес клітинної проліферації. Звертає на себе увагу й той факт, що відсоток сукупної кількості порушень на тлі елгацину мав певну тенденцію до зменшення порівняно з контролем (табл. 2).

При дослідженні елгацину в тесті ДЛМ, результати якого наведено у таблиці 3, встановлено, що відсоток усіх видів ембріональної загибелі плодів мав характер регресуючої тенденції порівняно з контрольним значенням. Підвищення частоти ДЛМ під впливом елгацину не було зареєстровано, що дозволяє говорити про відсутність у препараті мутагенних властивостей. Як видно з таблиці 3, на тлі елгацину в дозі 15 мг/кг дещо збільшувалася кількість живих плодів на одну самку, що свідчить на користь генопротекторної дії препарату. Одержані від самок ембріони дослідної групи також не відрізнялись від ембріонів контрольної ні за розмірами, ні за масою.

Таблиця 2 – Частота хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку щурів при введенні елгацину

Показник	Контроль	Елгацин, 150 мг/кг		
		6 год	24 год	48 год
Кількість тварин	6	6	6	6
Кількість проаналізованих клітин	1200	1200	1200	1200
Фрагменти, %	0,9±0,55	0,8±0,41	0,8±0,52	0,7±0,26
Хромосомні мости, %	1,0±0,55	0,7±0,52	0,6±0,20	0,8±0,40
Хроматидні мости, %	0,8±0,61	0,8±0,41	0,8±0,27	0,8±0,41
Кількість власне аберацій, %	2,8±0,52	2,3±0,41	2,2±0,41	2,3±0,41
Злипання хромосом, %	0,4±0,38	0,3±0,27	0,4±0,03	0,3±0,26
Відставання хромосом, %	0,5±0,32	0,4±0,38	0,3±0,26	0,5±0,45
Сукупна кількість порушень, %	3,7±0,52	3,0±0,63	2,9±0,66	3,2±0,75
Мітотичний індекс	1,6±0,17	1,7±0,17	1,7±0,21	1,7±0,14

Таблиця 3 – Частота домінантних летальних мутацій у щурів при введенні елгацину

Показник	Контроль	Елгацин	
		150 мг/кг	15мг/кг
Число спостережень	14	11	11
Кількість ЖТВ, ум. од.	9,8±1,48	9,4±2,32	9,5±1,29
Кількість місць імплантації, ум. од.	9,1±1,75	8,8±2,29	9,5±1,29
Загальна ембріональна смертність, %	15,1 (0÷27,3)	11,8 (0÷33)	1,1(0÷12,5)
Доімплантаційна загибель плодів, %	5,8 (0÷16,7)	9,5 (0÷41,7)	0
Постімплантаційна загибель плодів, %	6,5 (0÷20)	2,9 (0÷20)	1,1(0÷12,5)
Число живих плодів на одну самку	8,4±1,95	8,3±2,75	9,4±1,43
Частота ДЛМ, %		1,0	0
Маса плодів	2,5±0,40	2,3±0,42	2,4±0,29
Розміри плодів	3,1±0,26	2,7±9,35	3,2±0,21

**ВИСНОВКИ.** Експериментальне тестування елгацину в лабораторних умовах показало відсутність у препараті мутагенної дії. Встановлено, що на тлі елгацину зменшуються або усуваються прояви генотоксичних впливів, що дозволяє обговорювати його антимуагенні властивості. Зважаючи на факт універсаль-

ності генетичного матеріалу в різних біологічних об'єктів і відомі дані літератури щодо високого рівня збігу результатів, отриманих під час дослідження модельних об'єктів і вищих організмів, у тому числі на людині, треба думати, що елгацин чинитиме антимуагенну дію і на рівні генетичного апарату ссавців.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гублер Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е. В. Гублер, А. А. Генкин. – Ленинград : Медицина, Ленингр. отд., 1973. – 141 с.

2. Методические указания к большому практикуму по генетическому анализу. – Харьков : ХГУ, 1985. – 31 с.

3. Нарушение митоза как показатель общетокс-

сического и цитотоксического действия пестицидов : методические рекомендации. – К., 1983. – 18 с.

4. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. – Женева, 1989. – Вып. 51. – 212 с. (Серия “Гигиенические критерии состояния окружающей среды”).

5. Сахарова Т. С. Експериментальне вивчення фармакодинаміки та механізму дії нової групи природних антиоксидантів на основі еллаготанінів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра фармацевт. наук / Т. С. Сахарова. – Харків, 2008. – 36 с.

6. Chen S. C. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds / S. C. Chen, K. T. Chung // Food Chem. Toxicol. – 2000. – **38**, № 1. – P. 1–5.

7. De Mejia E. G. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans / E. G. De Mejia, E. Castano-Tostado, G. Loarca-Pina // Mutat. Res. – 1999. – **441**, № 1. – P. 1–9.

8. Feldman K. S. Recent progress in ellagitannin chemistry / K. S. Feldman // Phytochemistry. – 2005. – **66**, № 17. – P. 1984–2000.

9. Ferguson L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability / L. R. Ferguson // Mutation Research. – 2001. – № 475. – P. 89–111.

10. Interaction between ellagic acid and calf thymus DNA studied with flow linear dichroism UV-VIS spectroscopy / P. W. Thulstrup, T. Thormann, J. Spanget-Larsen [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1999. – **265**, № 2. – P. 416–421.

11. Mut-Test to detect substances suppressing spontaneous mutation due to oxidative damage / Y. Yonezawa, S. Kawamura, M. Yamato, H. Nishioka // Mutat. Res. – 2001. – **490**, № 1. – P. 21–26.

12. Yoshida T. Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights / T. Yoshida, T. Natano, H. Ito // Biofactors. – 2000. – № 13 (1–4). – P. 121–125.

**Л. В. Яковлева, Т. С. Сахарова**  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО АНТИМУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЭЛГАЦИНА

### Резюме

Проведена оценка потенциального антимутагенного действия препарата “Элгацин” в трех тест-системах: с помощью метода учета рецессивных, сопряженных с полом летальных мутаций у дрозофилы, метода учета частоты хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс и метода учета частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках крыс. Показано, что на фоне использования элгацина уменьшается частота летальных мутаций у мух-дрозофил, несколько снижается процент совокупного количества хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс, не изменяется митотическая активность половых клеток крыс в сравнении с интактными животными. Обобщение результатов исследования позволило сделать вывод об отсутствии у элгацина мутагенного действия. Кроме того, на фоне элгацина уменьшаются или устраняются проявления генотоксических влияний, что позволяет обсуждать его антимутагенные свойства.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эллаготанины, элгацин, мутагенные свойства, антимутагенное действие.

**L. V. Yakovlieva, T. S. Sakharova**  
NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

## EXPERIMENTAL RESEARCH OF POTENTIAL ANTIMUTAGENIC ACTION OF ELGACIN

### Summary

There was conducted the evaluation of potential antimutagenic action of the drug “Elgacin” in three test-systems: by the method of taking into account the recessive, coupling with the sex of lethal mutations in fruit-fly, by the method of taking into account the frequency of chromosome aberrations, in the cells of rats’ bone marrow and the method of calculation of frequency of dominant lethal mutations in rats’ sex cells. There was shown that on the background of the Elgacin use it is decreased the frequency of lethal mutation in fruit-flies, it is reduced the percent of total quantity of chromosome disorders in the cells of rats’ bone marrow, it isn’t changed the mitosis activity of rats’ sex cells in comparing with inactive animals. Generalization of the research results allowed to make a conclusion about an absence of mutagenic action in Elgacin. Besides, on the background of Elgacin there are decreased or removed the manifestations of genotoxic influences, that allows to discuss its antimutagenic properties.

**KEY WORDS:** ellagotannines, Elgacin, mutagenic properties, antimutagenic action.

Отримано 13.02.12

Адреса для листування: Л. В. Яковлева, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.