

УДК: 577.21. 575.224.6. 581.143.6

БАКТЕРИАЛЬНА ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ПЕРВИЧНОГО СКРИНІНГА ПРЕПАРАТОВ НА АНТИКАНЦЕРОГЕННУЮ І АНТИМУТАГЕННУЮ АКТИВНІСТЬ

Т.П. ПЕРЕРВА, А.Ю. МИРЮТА, Л.П. МОЖИЛЕВСКАЯ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
 Україна, 03143, г. Київ, ул. Академіка Заболотного 150,
 е-mail: lunakh@imbg.org.ua

На основі MS2-індуцированого нестабільного мутанта E.coli 3000-1 розроблена бактеріальна тест-система, призначена для тестування антиканцерогенних і антимутагенних властивостей сполучень природного походження. Реакція цієї системи на присутність препаратів з уже відомими властивостями відповідає даним, описаним в літературі і отриманим нами раніше. Предлагает тест-система може вважатися придатною для виявлення антиканцерогенної і антимутагенної активності речовин, реалізуючої не на організмі, а на клітинному рівні.

Ключові слова: тест-система, E.coli, антиканцерогени, антимутагени, рослинні екстракти.

ВВЕДЕНИЕ. Важным направлением в борьбе с онкологическими заболеваниями является профилактика на стадиях инициации и пролиферации начиная от нормальной и инициированной клетки до появления неопластических вариантов [1]. Основной предупредительной мерой, направленной на здоровых индивидуумов, считается сведение к минимуму контакта с канцерогенами, принесенными в организм извне: загрязнения окружающей среды или в результате определенного образа жизни. То же самое относится и к другим хронико-дегенеративным болезням, связанным с возникновением мутаций, и характеризующихся мультифакторным происхождением, многостадийным патогенезом и длительным латентным периодом. Наличие латентного периода, длящегося у людей годы или даже десятилетия до явного проявления таких заболеваний, в том числе и онкологических, открывает возможность усиления защитных сил организма за счет использования препаратов с антимутагенными и антиканцерогенными свойствами. Создание таких препаратов, так же как и поиск соответствующих

природных веществ является предметом усилий многих биотехнологических лабораторий и предприятий. Это направление тесно связано с необходимостью тестирования большого количества соединений на присутствие у них антимутагенной и антиканцерогенной активности и, соответственно, с поиском и созданием адекватных, простых в использовании и желателно недорогих тест-систем. Среди существующих и широко используемых тест-систем известна бактериальная тест-система Эймса, состоящая из нескольких мутантных штаммов *S. typhimurium* [2]. Предназначенная вначале для регистрации мутагенного и канцерогенного эффекта она оказалась приемлемой также для изучения антимутагенной и антиканцерогенной активности соединений самого разного происхождения. К недостаткам этой системы можно отнести то, что при ее использовании регистрируется по сути только мутагенная или антимутагенная активность веществ, вызывающих или угнетающих первичный одностадийный эффект как мутагенов так и канцерогенов [3, 4]. Угнетение канцерогенеза и сам канцерогенез как мультистадийный процесс, заканчивающийся появлением агрессивной злокачественной клетки со всеми ее характерными признаками, тест-система Эймса не регистрирует.

В работе описана бактериальная тест-система, предназначенная для первичного скрининга препаратов на антиканцерогенную и антимутагенную активность, имитирующая многоступенчатый механизм канцерогенеза от инициированной до неопластической клетки и позволяющая производить отбор веществ, способных предотвращать выщепление новых,

более агрессивных форм. Этот же процесс можно рассматривать как выщепление спонтанных мутантов, а вещества, препятствующие их появлению, как антимутагены.

Материалы и методы

Бактерии. В работе использован один из описанных нами ранее нестабильных MS2-индуцированных мутантов *E. coli* AB259Hfr3000 [5, 6].

Питательные среды. Бактерии выращивали на жидкой питательной среде LB (Luria Broth) [7]. В качестве плотной среды использовали эту же 1,8%-ную агаризованную среду.

Растительные экстракты. Использовали экстракты, полученные из биомассы культивированных клеток или из натуральных растений. Экстракты из биомассы культивированных клеток получали в виде 40%-этанольных вытяжек методом перколяции сухой биомассы. Конечное соотношение спирт:биомасса составляло 10:1. Источником биомассы служили: биомасса полисциаса папоротниколистного *Polyscias filicifolia* Bailey из семейства *Araliaceae* (штамм *Polyscias* F-2, коллекционный №6, ККК ИМБиг НАН Украины, Киев) — далее экстракт *P. filicifolia*; родиолы розовой *Rhodiola rosea* L. из семейства *Crassulaceae* (штамм ЗК-1, коллекционный №29, ВСКК-ВР, Москва, Россия) — далее экстракт *Rh. rosea*; унгереи Виктора *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko из семейства *Amaryllidaceae* (штамм UV-2, коллекционный №10, ККК ИМБиг НАН Украины, Киев) — далее экстракт *U. victoris*. Кроме экстрактов из биомассы культивированных клеток исследовали также экстракт, полученный методом перколяции 40%-ным этиловым спиртом натурального корня родиолы розовой

(место происхождения — Алтай) — далее экстракт *Rh. rosea* нат. Экстракт рододендрона желтого *Rhododendron luteum* L. был любезно предоставлен Е. И. Дзюбой (Ботанический сад НАН Украины) [8] — далее экстракт *Rhod. luteum*; остальные экстракты получены в отделе генетики клеточных популяций Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Экстракты выпаривали с помощью вакуумно-ротационного испарителя при 40 °С почти до сухого остатка и растворяли в стерильной дистиллированной воде до нужного объема экстракта.

Проведение эксперимента. Для выращивания исходного мутантного штамма *E. coli* 3000-1 отбирали типичную колонию без вторичных плотных колоний (сегрегантов), ресуспендировали в 1 мл LB-среде и разносили по пробиркам по 1,9 мл. В каждую пробирку кроме контрольной добавляли по 0,1 мл экстракта в водной форме. В контрольную пробирку вносили 0,1 мл физиологического раствора NaCl. Культуры выращивали на шуттеле 3-ое суток при комнатной температуре и медленном качании, а потом высевали на LB-агаризованную среду в разных разведениях так, чтобы получить изолированные колонии. Высчитывали общий титр культуры и количество плотных колоний (сегрегантов), которое выражали в процентах по отношению к общему титру. Поскольку при длительном выращивании процент сегрегантов повышается, высевы из одних и тех же культур проводили 2 раза — сразу после выращивания и через 3 недели после выращивания (культуры выдерживали при комнатной температуре без аэрации). Целью повторного посева было проверить, насколько антиканцерогенная-антимутагенная активность

экстрактов выражена в условиях длительного контакта с культурой без повторного добавления экстракта. Искомым эффектом считали способность исследуемого препарата угнетать выщепление сегрегантов из исходной мутантной культуры.

Результаты и обсуждение

Исходный мутантный штамм *E. coli* 3000-1, избранный нами в качестве тест-объекта, образует неплотные прозрачные колонии неправильной расплывчатой формы, окруженные более мелкими дочерними колониями, организованными в своеобразную группу. Дочерние колонии выглядят как легкие уплотнения на концах прозрачных еле заметных выростов, отходящих от основного тела мутантной колонии. Характерным признаком этой культуры есть ее способность постоянно выщеплять новые бактериальные формы с иными характеристиками роста в жидкой питательной среде и структурой колоний на агаризованной среде. Процентное содержание сегрегантов нарастает по мере старения исходной культуры.

В жидкой питательной среде исходная мутантная культура медленно накапливает биомассу проявляя тенденцию к ее снижению за счет лизиса части клеток. Культура сегрегантов при выращивании в жидкой среде существенно превышает показатели роста исходной мутантной культуры не обнаруживая никаких тенденций к лизису (рис. 1).

Колонии сегрегантов более плотные по сравнению с колониями исходной культуры, имеют четкие очертания и хорошо различимы на газоне прозрачной исходной культуры. Это свидетельствует о стабильности их оболочки,

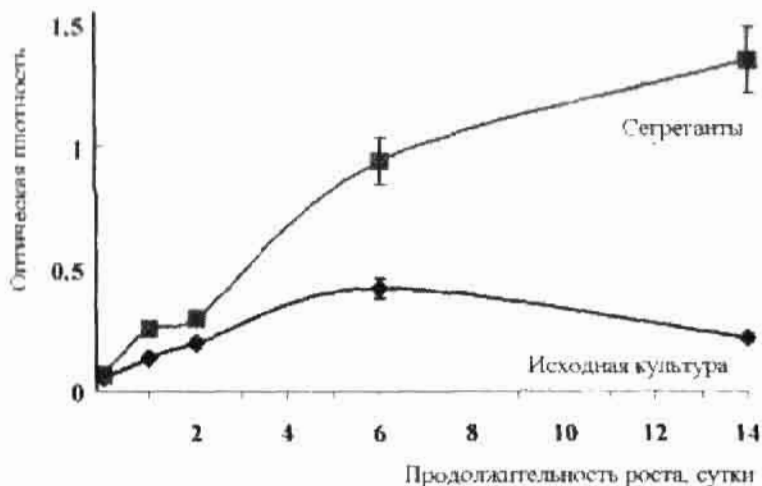


Рисунок 1. Накопление биомассы исходной культуры и сегрегантов

определяющей степень ригидности клеток, их склонность к спонтанному лизису и форму образованных ими колоний. Поскольку очертания бактериальных колоний определяются структурной организацией мембран клеточной оболочки [9–11], то спонтанное выщепление сегрегантов с новыми свойствами колоний связано, очевидно, с переорганизацией мембранных слоев оболочки в процессе роста и деления клеток исходной культуры. Это обстоятельство, а также способность сегрегантов к более активному накоплению биомассы по сравнению с исходной культурой аналогичны признакам, сопровождающим процессы канцерогенеза, что и было использовано нами для тестирования антиканцерогенных и антимуtagenных свойств испытуемых растительных экстрактов. В их числе присутствовали препараты, для которых уже была показана антиканцерогенная и противоопухолевая активность (экстракт *Rhod. luteum* [8], экстракты *Rh. rosea* и *Rh.*

rosea нат. [12, 13]) и препараты, для которых в нашей предшествующей работе была показана значительная антимуtagenная активность (экстракт *P. filicifolia*) или сильный протекторный эффект, но очень незначительная антимуtagenная активность (экстракт *U. victoris*) [14]. В конечном итоге предполагалось проанализировать, насколько данные, полученные в предлагаемой системе тестирования, сопоставимы с данными, полученными на других системах и уже описанными в литературе. Результаты исследований представлены в таблице и изображены графически на рис. 2.

Как можно видеть из данных, представленных в табл. 1, наиболее эффективным оказался экстракт *Rh. rosea* нат., который угнетал выщепление сегрегантов до 0,06% на третьи сутки выращивания и до 0,00% на 21-е сутки выращивания. Экстракт *Rhod. luteum* угнетал выщепление сегрегантов почти на таком же уровне — 0,00% на третьи сутки выращивания, но оказал

Таблица. Выщепление сегрегантов исходной мутантной культурой *E. coli* 3000-1 в присутствии растительных экстрактов по сравнению с контролем

Условия выращивания	3 суток выращивания		21 сутки выращивания	
	Число сегрегантов, % от количества исходных колоний	Число сегрегантов в опыте по сравнению с контролем, %	Число сегрегантов, % от количества исходных колоний	Число сегрегантов в опыте по сравнению с контролем, %
LB +5% физ. р-ра NaCl-контроль	6,54	100	30,23	100
LB +5% экстр. <i>U.victoris</i>	1,46	22,3	30,30	100,2
LB +5% экстр. <i>Rh.rosea</i>	0,3	4,6	14,81	49
LB +5% экстр. <i>P.filicifolia</i>	0,16	2,5	5,86	19,4
LB +5% экстр. <i>Rh.rosea</i> нат.	0,06	0,9	0	—
LB +5% экстр. <i>Rhod.luteum</i>	0	—	2,08	6,9

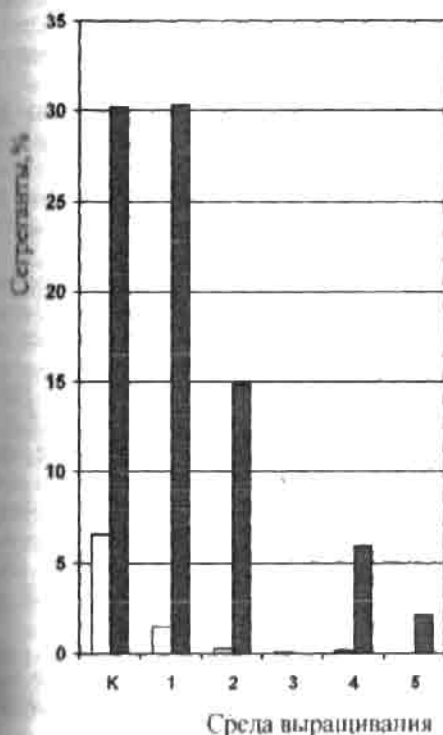


Рисунок 2. Выход сегрегантов в присутствии экстрактов *U.victoris* (1), *Rh.rosea* (культура клеток) (2), *P.filicifolia* (3), *Rh.rosea* (растение) (4), *Rhod.luteum* (5) и физиологического раствора (К) в условиях кратковременного (3 суток) — ● и длительного (21 день) — ■ выращивания. Процент сегрегантов высчитывали от количества колоний исходной культуры и сегрегантов, которые выросли в посевах

менее активным при длительном выращивании — 2,08% сегрегантов на 21 сутки. Наименее активным оказался экстракт *U.victoris*, в присутствии которого процентное содержание сегрегантов на 21 сутки выращивания было таким же, как и в контрольном варианте. Таблица и график демонстрируют также, что влияние экстрактов выражено значительно сильнее на ранних стадиях выращивания инициированной культуры по сравнению с более поздними стадиями.

Таким образом, исследованные нами препараты растительного происхождения демонстрируют избирательное действие в данной бактериальной тест-системе и в зависимости от своей способности подавлять выщепление сегрегантов могут быть расположены в последовательности

Rhod.luteum > *Rh.rosea* нат. > *P.filicifolia* > *Rh.rosea* > *U.victoris* > Контроль — для ранних стадий выращивания и

Rh.rosea нат. > *Rhod.luteum* > *P.filicifolia* > *Rh.rosea* > *U.victoris* H^o Контроль для длительного выращивания.

Это значит, что описанная в работе бактериальная тест-система реагирует на присутствие растительных препаратов с известными антиканцерогенными и антимутагенными свойствами соответственно данным, уже имеющимся в литературе и полученным нами ранее, и может считаться пригодной для тестирования соединений природного происхождения на наличие у них антиканцерогенной и антимутагенной активности, реализующейся не на организменном, а на клеточном уровне.

Выводы

Выщепление сегрегантов с признаками активного роста слаборастущей мутантной культурой *E.coli* 3000-1 сни-

жается в присутствии испытанных в работе растительных экстрактов. Наиболее сильный эффект отмечен для экстрактов, приготовленных из нативных растений с хорошо выраженными антиканцерогенными свойствами (*Rhod.luteum* и *Rh.rosea* нат.), а наиболее слабый — для экстракта культивированных *in vitro* клеток *U.victoris*, для которого ранее был показан сильный протекторный, но очень незначительный антимутагенный эффект. Экстракты культивированных *in vitro* клеток *P.filicifolia* и *Rh.rosea* культ. занимают промежуточное место соответственно описанным для них ранее антимутагенным свойствам.

Список литературы

1. De Flora S., Izzotti A., Benicelli C. Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: role in primary prevention // Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mech. III Proc. 3-rd Int. Conf. Zaccà, Italy (May 5–10, 1991). — Plenum Press, New York. — 1993. — P. 1–16.
2. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian microsome mutagenicity test // Mutat. Res. — 1975. — Vol. 31. — P. 347–364.
3. Порошенко Г.Г., Абилов С.К. Антропогенные мутанты и природные антимутагены // Под ред. В.А. Шевченко (Итоги науки и техники; Серия Общая генетика; Т. 1). — М.: ВИНТИ, 1988. — С. 207.
4. Wand Z.Y., Agarwal R., Zhou Z.C., Bickers D.R., Muktar H. Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and skin tumour initiating and tumour promoting activities in SENCAR mice by glycyrrhetic acid: Comparison of 18 α - and 18 β -stereoisomers // Carcinogenesis — 1991. — Vol. 12. — P. 187–192.
5. Перерва Т.П., Малюта С.С. Система MS2-индуцированных мутантов *E.coli* по F-фактору. — В сб.: Молекулярная биология. — 1984. — Вып. 38. — С. 81–90.

6. *Pererva T.P.* Some properties of MS2-induced bacterial mutants // Биополимеры и клетка. — 1998. — Т. 14, № 3. — С. 231-237.
7. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 460 с.
8. *Дзюба О.І., Головка Е.А.* Сапоніни рододендрона жовтого та їх біологічна активність // Физиология и биохимия культурных растений. — 2000. — Т. 32, № 6. — С. 469-473.
9. *Cadmus M.C., Rogovin S.P., Burton K.A., Pittsley J.E., Knutson C.A., Jeans A.* Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain // Can. J. Microbiol. — 1976. — Vol. 22. — P. 942-948.
10. *Prehm P., Schmidt G., Stirm S.* On the mutations responsible for the rough phenotype of *Escherichia coli* B // J. General Microbiol. — 1976. — Vol. 97. — P. 121-124.
11. *Thompson E.D., Parks L.W.* Genetic and biochemical studies on mannose-negative mutants with colonial morphological alteration // Molec. Gen. Genet. — 1976. — Vol. 149. — P. 187-193.
12. *Бочарова О.А., Серебрякова Р.В.* Испытание препаратов растительного происхождения для профилактики и нетоксической терапии онкологических заболеваний на экспериментальных моделях // Вестник РАМН. — 1994. — № 2. — С. 52-55.
13. *Бочарова О.А., Фигурин К.М., Серебрякова Р.В., Филиппова Т.Г., Барышников А.Ю.* Коррекция препаратом *Rhodola rosea* адгезии клеток уротелия и иммунного статуса у больных поверхностным раком мочевого пузыря // Иммунология. — 1994. — № 1. — С. 51-54.
14. *Дворник А.С., Перерва Т.П., Кунах В.А.* Скринінг препаратів, отриманих із культури тканин лікарських рослин, на антимутагенну активність у системі *Escherichia coli* — бактеріофаг I // Цитология и генетика. — 2002. — № 2. — С. 3-10.

Представлено Л.Л. Лукаш
Надійшла 10.10.2007

БАКТЕРІАЛЬНА ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ПЕРВИННОГО СКРИНІНГУ ПРЕПАРАТІВ НА АНТИКАНЦЕРОГЕННУ ТА АНТИМУТАГЕННУ АКТИВНІСТЬ

Т.П. Перерва, Г.Ю. Мирюта, Л.П. Можилевська

Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України,
Україна, 03143, Київ,
вул. Академіка Заболотного, 150,
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

На основі MS2-індукованого нестабільного мутанта *E.coli* 3000-1 розроблено бактеріальну тест-систему для тестування антиканцерогенних та антимутагенних властивостей сполук природного походження. Реакція цієї системи на присутність препаратів із уже відомими властивостями відповідає даним, що описані у літературних джерелах та отриманим нами раніше. Запропонована тест-система придатна для виявлення антиканцерогенних та антимутагенних активностей речовин, які реалізуються не на організмовому, а на клітинному рівні.
Ключові слова: тест-система, *E.coli*, антиканцерогени, антимутагени, рослинні екстракти.

BACTERIAL TEST SYSTEM FOR THE PRIMARY SCREENING OF PREPARATES WITH ANTICARCINOGENIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITY

T.P. Pererva, A.Yu. Miryuta, L.P. Mozhytevska

Institute of Molecular Biology and Genetics
NAS of Ukraine
Ukraine, 03143, Kiev, Acad.Zabolotnogo st., 150,
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

On the basis of MS2-induced unstable mutant *E.coli* 3000-1 bacterial test-system intended for testing of anticarcinogenic and antimutagenic properties of natural substances was developed. This system reaction on the presence of preparates with already known properties corresponds to data described in literature and obtained by us earlier. Proposed test-system may be considered as suitable one for revealing of anticarcinogenic and antimutagenic activities realising on the cell but not on the organism level.

Key words: test-system, *E.coli*, anticarcinogenic and antimutagenic activity, plant extracts.