

УДК 57.004

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТИМЬЯНА

МАРШАЛЛА МЕТОДОМ МЁЛЛЕР-5

М.Н. Курчатова, А.С. Шереметьева, Н.А. Дурнова

кафедра общей биологии, фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов, Россия

Резюме: Проведено исследование извлечений тимьяна Маршалла методом Меллер-5 на тест-объекте *Drosophila melanogaster*. Показана тенденция к снижению частоты мутаций при использовании извлечения при концентрации 50 мг/мл.

Ключевые слова: экстракт, *Thymus marschallianus* Willd., Мёллер-5, *Drosophila melanogaster*, мутация.

STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THYMUS MARSCHALLIANUS BY THE MELLER-5 METHOD

M.N. Kurchatov, A.S. Sheremetyeva, N.A. Durnova

Department of General Biology, Pharmacognosy and Botany of Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russia

Summary: A study of extract *Thymus marschallianus* by the Meller-5 method on a fruit fly was carried out. The tendency to decrease the frequency of mutations when using the extract at a dose of 50 mg/ml is shown.

Keywords: extract, *Thymus marschallianus* Willd., Meller-5, *Drosophila melanogaster*, mutation.

Введение

В современных условиях ведется поиск и изучение растений с антимуtagenными свойствами. Для тимьяна Маршалла способность влиять на частоту возникновения мутаций ранее не была изучена. С целью изучения возможных антимуtagenных свойств было проведено исследование этого растения на уровне генов с помощью метода рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофил.

Метод Мёллер-5 позволяет обнаружить возникающие летальные мутации в X-хромосоме самцов дрозофил. Частоты возникающих летальных мутаций учитывают

исходя из результатов скрещивания самцов дикого типа, обработанных мутагеном, с самками линии «Мёллер-5» [1, 3, 5]. Анализируются пробирки F2 для установления наличия в них особей, отличающихся по фенотипу. В случае отсутствия летальных мутаций в F2 получают два типа самок и два типа самцов: самки типа М-5, то есть самки с абрикосовыми глазами и желтым телом, и самки дикого типа; самцы типа М-5 и самцы дикого типа. Если в сперматозоиде самца возникла летальная мутация, в F2 получаются два типа самок и только один тип самцов. Самцы имеют глаза абрикосовой окраски и желтое тело (фенотип М-5), самцы с фенотипом дикого типа (красные глаза и серое тело) отсутствуют. Это объясняется тем, что летальная мутация здесь находится в гемизиготном состоянии и, следовательно, вызывает гибель [1, 2, 3, 5]. Если в пробирке присутствуют два типа самок и два типа самцов, то такую культуру считают нормальной, а если только один тип самцов (отсутствуют самцы дикого типа) – такую культуру следует отнести к летальной [2, 3, 5].

Цель исследования: определить антимуtagenное влияние экстракта тимьяна Маршалла на объекте *Drosophila melanogaster*.

Материалы и методы.

В эксперименте был использован водный раствор спиртового извлечения тимьяна Маршалла, предварительно выпаренного до состояния густого экстракта, полученный по методике [7].

В качестве мутагена использовали раствор формалина, который вводили в питательную среду при температуре около 40°C, в концентрации 0,025 г на 3 мл питательной среды [5].

Исследование проводилось в соответствии с материалами Фармкомитета РФ «Оценка мутагенных свойств фармакологических средств» и руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [2, 5].

Для оценки антимуtagenной активности экстракта тимьяна Маршалла была использована линия дрозофилы дикого типа с хорошо изученным фоном мутабельности d-32 (красные глаза, серое тело), в качестве тест-линии использовали линию Меллер-5. В X-хромосоме особей этой линии находятся две инверсии (sc8 и sc49), которые исключают кроссинговер между половыми хромосомами, но не нарушают жизнеспособности дрозофилы. Маркерами, проявляющимися в фенотипе, служат рецессивная мутация wa – абрикосовые глаза и доминантная мутация yellow – желтое тело [1, 2, 5].

Муши были разделены на группы:

- 1) контрольная группа, содержащаяся на стандартной питательной среде (негативный контроль);
- 2) группа, получающая с питательной средой формалин (позитивный контроль);
- 3) группа, получающая с питательной средой извлечение тимьяна Маршалла при концентрации 6,2 мг/мл;
- 4) группа, получающая с питательной средой извлечение тимьяна Маршалла при концентрации 50 мг/мл;
- 5) группа, получающая с питательной средой формалин и извлечение при концентрации 6,2 мг/мл;
- 6) группа, получающая с питательной средой формалин и извлечение тимьяна Маршалла при концентрации 50 мг/мл.

В соответствующие пробирки со стандартной дрожжевой средой и с добавлением соответствующего группе компонента, помещали по 12-14 пар мух дикого типа линии d-32 (красные глаза, серое тело). После полного завершения цикла развития скрещивали вылетевших самцов с самками линии Мёллер-5. Далее отбирали виргинных гетерозиготных самок F1 и скрещивали их с самцами линии Меллер-5 в соотношении 1 самка: 2 самца.

После вылета второго поколения (F2) каждую культуру просматривали визуально с целью обнаружения таких, в которых отсутствуют самцы дикого фенотипа (с красными глазами и серым телом). Общее количество культуральных пробирок определяет число проанализированных X-хромосом самцов, подвергшихся действию изучаемых соединений. Пробирки, в которых отсутствовали самцы дикого типа, отмечали как «летали» [4].

Частоту леталей рассчитывали как отношение числа культур с летальными к общему числу проанализированных культур во втором поколении [5]:

$$X = \frac{\text{Число культур с летальными}}{\text{общее число проанализированных культур}} \cdot 100\%;$$

где X – частота леталей.

Для проведения статистической обработки результатов использовали программу Microsoft Excel 2007. Сравнение достоверности распределения частоты мутаций в опытном и контрольных вариантах проводили с помощью точечного критерия Фишера (при $p < 0,01$).

Результаты и обсуждение

Во всех экспериментах формалин достоверно ($p < 0,01$) повышал частоту рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций дрозофилы как по сравнению с

группой мух, получающих чистую питательную среду, так и группой мух, получающих с питательной средой извлечение тимьяна Маршалла.

В группах мух, получающих только чистую питательную среду и питательную среду совместно с экстрактом в обеих концентрациях, мутаций обнаружено не было, что говорит об отсутствии мутагенного действия у среды и экстракта.

В группе положительного контроля (мухи, содержащиеся на стандартной питательной среде с добавлением формалина) мутации обнаружены у 33,3% исследованных мух. Введение в питательную среду извлечения тимьяна Маршалла (группа, содержащаяся на стандартной питательной среде с добавлением формалина и извлечения при концентрации 6,2 мг/мл) не приводило к снижению частоты леталей. А введение извлечения в питательную среду в большей концентрации (группа, содержащаяся на стандартной питательной среде с добавлением формалина и извлечения при концентрации 50 мг/мл) приводила к снижению частоты леталей до 16,7% (таблица 1).

Таблица 1 – Частота мутаций у дрозофил в зависимости от типа воздействия

Типы воздействия	Число проанализированных культур F2	Число летальных культур	Частота леталей (%)
Чистая питательная среда (негативный контроль)	6 (279 особей)	0	0
Питательная среда + формалин (положительный контроль)	6 (225 особей)	2	33,3
Питательная среда + извлечение (6,2 мг/мл)	6 (291 особь)	0	0
Питательная среда + извлечение (50 мг/мл)	6 (243 особи)	0	0
Питательная среда + формалин + извлечение (6,2 мг/мл)	6 (252 особи)	2	33,3
Питательная среда + формалин + извлечение (50 мг/мл)	6 (360 особей)	1	16,7

Таким образом, в скрининговом исследовании извлечение тимьяна Маршалла показало тенденцию к снижению частоты мутаций у дрозофил при концентрации 50 мг/мл.

Несмотря на относительную безопасность средств лекарственного растительного

происхождения, некоторые растения способны проявлять мутагенные свойства [8,10]. Так, саговник, который употребляют в пищу, содержит мутаген естественного происхождения – циказин, проводящий к развитию мутаций. Также в экспериментах на лимфоцитах человека было доказано, что кофе, помимо кофеина, содержит и другие мутагенные факторы. Кофеин в целом ряде исследований на про- и эукариотических тест-системах продемонстрировал мутагенные и мутаген-потенцирующие свойства. Поэтому для лекарственного растительного сырья в первую очередь необходимо доказать отсутствие мутагенного действия.

Антимутагенными свойствами обладает несколько видов хвоща: хвощ полевой – *Equisetum arvense* L., хвощ лесной – *E. sylvaticum* L., хвощ речной – *E. fluviatile* L., хвощ зимующий – *E. hiemale* L. и хвощ болотный – *E. palustre* L.; гинкго двулопастной – *Ginkgo biloba* L. [4, 6, 9]. Так же, как и тимьян Маршалла, способны снижать частоту возникновения мутаций некоторые растения, основной группой биологически активных соединений которых являются эфирные масла, такие как: *Lavandula angustifolia* L., *Coriandrum sativum* L., и др. Антимутагенными свойствами обладают экстракты из ряда овощных культур. Экстракты таких широко распространенных в быту растений, как капуста, редис, содержат антимутагенные агенты, способные инактивировать продукты метаболизма нитрата натрия [11].

Выводы.

Полученные результаты эксперимента позволяют предположить, что извлечение тимьяна Маршалла обладает способностью снижать количество мутаций, индуцированных воздействием химических веществ, но необходимы дополнительные исследования с расширением диапазона концентраций извлечений и увеличением количества особей в эксперименте.

Список литературы

1. Балакина, А. А. Оценка цитотоксического действия экстрактов из лекарственных растений на клеточную линию М HeLa. / А.А. Балакина, Е.А. Кузьмина, А.Н. Древова [и др.]. – Текст : непосредственный // АгроЭкоИнфо. – 2015. – №5. – С. 1-9.
2. Дурнев, А. Д. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств. / А.Д. Дурнев, Ю.А. Ревазова, О.Л. Верстакова [и др.]. – Текст : непосредственный // Материалы фармкомитета РФ. – URL: <http://www.medline.ru/public/fund/pharmcom/6.phtml> (дата обращения: 31.10.22)
3. Козак, М. Ф. Дрозофила – модельный объект генетики: учебно-методическое пособие / М.Ф. Козак ; Федеральное агентство по образованию, Астраханский государственный

университет Астраханский государственный университет. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2007. – 87 с. – Текст : непосредственный

4. Коломиец, Н. Э. Антимутагенные свойства растений рода хвощ / Н.Э. Коломиец, С.Н. Ефимов. – Текст : непосредственный // Фармакология: эксперимент и клиника. – 2005. – №2. – С. 31-32.

5. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунятин, А.Н. Васильева [и др.]. – Москва : Грифф и К, 2012. –944 с.

6. Одинцова, Т. И. Антимутагенная активность β -пуротионинаТк-АМР-ВР пшеницы / Т.И. Одинцова, И.М. Васильева, Т.В. Коростылева. – Текст : непосредственный // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 9. – С. 1267-1270

7. Патент № 2482863 Российская Федерация, МПК А61К 36/80 (2006.01), В01D 11/02 (2006.01) Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью : № 2482863 : заявл. 15.02.2012 : опубл. 27.05.2013 / Н.В. Полуконова, Н.А. Наволокин, Н.А. Дурнова [и др.]. – заявитель СГМУ. – 11 с. : ил. – Текст : непосредственный.

8. Сергеева, В. С. Антиоксидантное и антимутагенное действие на организм растительных экстрактов и их значение в профилактике мультифакториальных заболеваний / В.С. Сергеева, Л.А. Сергеева, А.Н. Сумская. – Текст : непосредственный // Сборник научных трудов SWorld. – 2011. – Т. 27, №1. – С. 68-71

9. Филипенко, Т. А. Антиоксидантное действие экстрактов лекарственных растений и фракции их фенольных соединений / Т.А. Филипенко, Н.Ю. Грибова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2012. – № 1. – С. 77-81.

10. Хабриева Р. У., Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – Москва : Медицина, 2005. – 832 с.

11. Лекарственные растения СССР (культивируемые и дикорастущие) / под общ. ред. А. А. Хотина [и др.]. – Москва : Колос, 1967. – С. 235-237.