

УДК 575.224.4+575.224.6

**УМЕНЬШЕНИЕ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА
ПРЕПАРАТОМ МЕЛАНИНА ИЗ ГРЕЧИХИ**

*В. А. БАРАБОЙ¹, А. Д. ДУРНЕВ³, А. В. ОРЕЩЕНКО², Т. Н. АЛЕКСЕЕВА²,
В. Н. ОГАРКОВ⁵, Л. В. САМУСЕНКО³, В. А. ПЕСТУНОВИЧ⁴*

¹*Институт онкологии АМН Украины, Киев;*

²*ВНИИ пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности, Москва;*

³*НИИ фармакологии РАМН, Москва;*

⁴*Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН;*

⁵*НИИ биологии Иркутского государственного университета;
e-mail: rguiberman@mail.ru*

Меланіни — пігменти рослин, тварин та мікроорганізмів поліфенольної структури з відомою антиокислювальною та протипроменевою активністю. Водорозчинний препарат меланіну з лузки гречки вивчали на наявність антимутагенної та генопротекторної активності, яку досліджували метафазним аналізом клітин кісткового мозку мишей після дії мутагену циклофосфаміду (20 мг/кг). Водорозчинний препарат меланіну (0,01 — 10 мг/кг перорально) зменшує кількість аберацій хромосом в 2 — 6 разів (найбільш ефективно за передоброблення).

К л ю ч о в і с л о в а: меланін, поліфенольні пігменти, хромосомні аберації, мутагени.

Меланины — обширная группа пигментов микробного, растительного и животного происхождения с сетчатой нерегулярной полимерной структурой, различной молекулярной массой с вариabильным характером и последовательностью связей. Различают черно-коричневые (эумеланины), красно-желтые (феомеланин) пигменты [1–4]. Для растений характерны алломеланины — “пирокатехиновые” пигменты, лишенные азота [5–9]. Растворимые формы меланина менее полимерны, чем нерастворимые.

Физиологические функции меланинов: защита от УФ-гиперинсоляции, рентгеновского и γ -излучения [10]; участие в репарации ДНК, функционировании дыхательной цепи в качестве акцептора электронов [4]; нейтрализация продуктов свободнорадикального окисления [2,3,7,8]; транспорт ряда метаболитов, в частности веществ, неспособных самостоятельно преодолеть гематоэнцефалический барьер; способность противостоять атаке литических ферментов благодаря почти универсальной ингибиторной активности [2,3]; стимуляция процессов пролиферации, повышение жизнеспособности и плодовитости растений и животных, снижение частоты спонтанных и индуцированных радиацией мутаций [10,13]; антибиотическая активность, главным образом, за счет хинонных интермедиатов [12]; в составе пищи меланины ведут себя как пищевые волокна, природные энтеросорбенты, тормозя всасывание тяжелых металлов, белков [11].

Способность хелатировать металлы делает меланины, содержащие их продукты и добавки, эффективным антидотом при острых отравлениях, пока токсикант еще находится в пищеварительном тракте. Связываясь меланином, он выводится не всосавшись [14,15]. Меланин — активный сорбент радионуклидов, урана и трансурановых элементов [14,16]. Ранее одним из авторов в эксперименте на мышах и крысах показано антиоксидантное, противолучевое и противоопухолевое действие препарата меланина из грибов *Cladosporium cladosporioides* sp., определен диапазон эффективных доз [17]. Представляло интерес изучить антимутагенное действие меланина на фоне лекарственного мутагена циклофосфамида.

Материалы и методы

Ранее мы работали с меланином, полученным из грибов. В этой работе был использован препарат водорастворимого меланина из лужки гречихи, поэтому было проведено предварительное сопоставление свойств этих препаратов. Эксперименты по изучению антимутагенного действия меланина из лужки гречихи выполнены на самцах мышей линии С57В1/6 в возрасте 8 — 12 недель, содержащихся в условиях вивария НИИ фармакологии РАМН при 12-часовом световом режиме, свободном доступе к воде и пище. Цитостатический противоопухолевый препарат циклофосфамид-(N-бис- β -хлорэтил)-N-O-триметилловый эфир диамида фосфорной кислоты, явля-

ющийся непрямой алкилирующим мутагеном, вводили внутривентриально в дозе 20 мг/кг. Водорастворимый меланиновый пигмент (МП) из лузги гречихи вводили перорально в дозах 0,01–10 мг/кг. Эксперимент выполняли в трех вариантах. В первом (острый опыт) мутаген и МП вводили одновременно. Через 24 ч животных забивали под наркозом. Во втором варианте (предобработка) МП вводили в течение пяти дней. Последнее введение сочетали с инъекцией мутагена; мышей забивали через 24 ч после введения мутагена. В третьем варианте (совместное введение) МП и мутаген вводили в течение пяти дней и забивали через 6 ч после последней инъекции.

При определении частоты хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей пользовались методом метафазного анализа; в каждом варианте эксперимента было по 6 мышей; от каждой мыши считали не менее 50 метафаз.

Исследования элементного состава МП из лузги гречихи проведены в лаборатории структурной химии Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН; изучение свойств МП методами ЭПР и ЯМР проведено в Естественнонаучном институте при Пермском государственном университете (лаборатория по изучению природных биологически активных веществ).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты, приведенные в таблице, свидетельствуют о большом сходстве грибного и гречишного меланинов. Из литературы известно, что разные образцы меланина могут различаться по структуре, строению мономерных звеньев и количеству этих звеньев в полимерных цепях. Поэтому небольшие различия в элементном составе и ИК-спектрах грибного и гречишного меланинов не должны вызывать удивления.

Имеются некоторые различия лишь в деталях спектров ЭПР и концентрации парамагнитных центров. Одной из причин некоторого ее снижения в гречишном меланине может быть более низкое содержание феноксильных радикалов по сравнению с грибным [18]. Это подтвер-

ждают данные ИК-спектрометрии: в ИК-спектре грибного меланина полоса поглощения 1565 см^{-1} , соответствующая феноксильным радикалам, видна совершенно отчетливо, тогда как в спектре гречишного меланина она представлена в виде небольшого наплыва на широкой полосе, соответствующей поглощению ароматических колец. Другой причиной различия концентраций парамагнитных центров грибного и гречишного меланинов могут быть некоторые особенности полисопряженной структуры меланинов [19].

Циклофосфамид (20 мг/кг однократно) вызывал хромосомные aberrации в $18,1 \pm 1,9 - 23,0 \pm 1,9\%$, при пятикратном введении – в $22,4 \pm 1,9\%$ исследованных метафаз. Это согласуется с известными данными, характеризующими цитогенетический эффект этого мутагена при разных режимах введения.

МП, примененный в остром эксперименте в дозе 0,1 мг/кг, статистически достоверно на 56% снижает мутагенное действие циклофосфамида, но в дозах 0,01 и 1,0 мг/кг на эффект мутагена влияет незначительно.

В следующей серии исследований было установлено, что циклофосфамид, введенный на фоне предварительного пятикратного введения МП в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг, повреждает соответственно только $6,0 \pm 1,9\%$ и $11,2 \pm 1,4\%$ метафаз против $22,4 \pm 1,0\%$ aberrантных метафаз в позитивном контроле. Таким образом, МП в указанных дозах снижает кластогенный эффект циклофосфамида в 2–4 раза. Антимутагенный эффект предобработки МП в дозе 10 мг/кг ($17,4 \pm 1,7\%$) выражен слабее – на 26% ниже эффекта одного мутагена, но статистически также значим. Анализ совокупности данных, полученных во второй серии экспериментов, позволяет заключить, что в условиях предобработки МП в диапазоне использованных доз уменьшает мутагенный эффект циклофосфамида в клетках костного мозга мышей.

В третьей серии исследований, при совместном пятидневном введении МП (в дозах 0,01; 0,1 и 1,0 мг/кг) и мутагена (по 20 мг/кг), эффект МП выразался в снижении числа aberrантных метафаз в 2,0–2,7 раза.

Результаты изучения физико-химических свойств экстрактов из лузги гречихи грибов

Показатели	Меланин грибной	Меланин гречишный
Элементный состав(%)	C40,85; H5,56; N2,40	C42,36; H5,56; N2,01
Ширина линии ЭПР	5,1 Э	5,1 Э
g-фактор	2,0047	2,0047
Форма линии ЭПР	асимметричная	асимметричная
Концентрация парамагнитных центров	$6 \cdot 10^{18}$ спин/г	$6 \cdot 10^{17}$ спин/г

Обобщая результаты, полученные в экспериментах с циклофосфамидом, можно констатировать, что МП способен весьма существенно снижать повреждающее действие циклофосфамида при различных режимах введения, но наиболее эффективно при предобработке животных. Полученные данные позволяют обоснованно говорить о перспективе дальнейшей разработки исследованного МП в качестве пищевой добавки, сочетающей свойства антимулагена и красителя, с целью создания на ее основе безалкогольных лечебно-профилактических напитков, защищающих хромосомный аппарат клеток человека от неблагоприятных воздействий мутагенов окружающей среды.

DECREASE OF MUTAGENIC ACTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE BY BUCKWHEAT MELANIN PREPARATION

*V. A. Baraboj¹, A. D. Durnev³,
A. B. Oreshchenko², T. N. Alexejeva²,
B. N. Ogarkov³, L. V. Samusenok⁵,
V. A. Pestunovich⁴*

¹Institute of Oncology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;

²All-Russian Scientific-Research Institute of Brewing, Nonalcoholic and Wine Industry, Moscow;

³Scientific-Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

⁴A.E.Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences;

⁵Scientific-Research Institute of Biology, Irkutsk State University;

e-mail: rguiberman@mail.ru

S u m m a r y

Melanins are polyphenolic pigments of plants, animals and microbes with antioxidant and antiradiation activity. Water-soluble melanin from buckwheat is experienced as antimutagenic means (0.01–10 mg/kg per os) for cyclophosphamide (20 mg/kg i.p.) in the 3 series of experiments. The frequency of chromosome aberrations in the cells of mice bone marrow after mutagene is reduced 2–6 times once under influence of melanin.

К е у w o r d s: melanins, polyphenolic pigments, cyclophosphamide, chromosome aberrations, mutagen.

1. *Nicolaus R. A.* Melanins. Paris: Herrmann. 1968. 310 p.
2. *Барабой В. А.* Биологическое действие растительных фенольных соединений. К.: Наук. думка. 1976. 260 с.
3. *Барабой В. А.* // Усп. совр. биол. 2001. **121**, № 1. С. 36–46.
4. *Бриттон Г.* Биохимия природных пигментов / Ред. М. Н. Запрометов. Мир. 1986. 422 с.
5. *Гебриель М. А., Павленко Г. А., Бронников В. А. и др.* // Микробиология. 1989. **58**, № 2. С. 334–336.
6. *Джавахи В. Г., Аверьянов А. А., Минаев В. И. и др.* // Журн. общ. биол. 1990. **51**, № 4. С. 528–531.
7. *Лях С. П.* Микробный меланиногенез и его функции. М.: Наука. 1981. 247 с.
8. *Лях С. П., Рубан Е. Л.* Микробные меланины. М.: Наука. 1972. 242 с.
9. *Феофилова Е. П.* Пигменты микроорганизмов. М.: Наука. 1974. 216 с.
10. *Моссэ И. Б., Лях И. П.* / Всесоюзная конференция “Действие малых доз ионизирующей радиации”. Севастополь. 1984. С. 20–21.
11. *Готуо Т., Миура М.* // Gekkan Fudo Kemikaru. 1992. **8**, N 8. P. 35–36.
12. *Riley P. A.* // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1977. **29**, N 11. P. 1235–1242.
13. *Островский М. А., Донцов А. Е.* // Физиол. человека. 1985. **11**, № 4. С. 670–680.
14. *Моссэ И. Б., Плотникова С. И., Лях И. П. и др.* Радиопротектор, снижающий накопление радионуклидов в организме: Заявка на а.с. 06. 12.90, № 1888566 (116992).
15. *Kemster P. A., Wahlguist M. L.* // Nutr. News. 1994. **52**, N 2. P. 51–52.
16. *Sakaguchi T., Nakajima A.* // Chem. Technol. Biotechnol. 1987. **40**, N 2. P. 133–138.
17. *Барабой В. А., Борщевська М. И., Хомчук Ю. В., Шестакова О. М.* // Укр. радіол. журн. 1999. **7**, № 4. С. 399–403.
18. *Жеребин Ю. Л., Сава В. М., Богатский А. В.* // Журн. орг. химии. 1983. **53**, вып. 2. С. 272–275.
19. *Жеребин Ю. Л., Сава В. М., Богатский А. В.* // Там же. 1984. **54**, вып. 6. С. 1340–1346.

Получено 24.01.03