

Використання системи *Escherichia coli*— бактеріофаг λ для вивчення антимутагенної дії рослинних екстрактів

А. С. Дворник, Т. П. Перерва, Л. М. Мойса¹, В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹НВК «Діапроф-Мед»
Вул. Світлицького, 35, Київ, 02250, Україна

У системі E. coli—бактеріофаг λ вивчали антимутагенну дію аптечного препарату Rhodiola rosea L. та екстрактів, одержаних з біомаси культивованих клітин Polyscias filicifolia, Rh. rosea та її натурального кореня. Екстракт із біомаси культивованих клітин вірогідно зменшував відсоток індукованих мутантів, вплив решти препаратів не є достовірним. Виявлено синхронні коливання загального титру та титру індукованих мутантів фага. Обґрунтовується дисциплінарність даної системи в умовах in vivo та доцільність її використання в умовах in vitro при вивченні антимутагенної дії речовин.

Вступ. Вивчення антимутагенезу як процесу, що запобігає виникненню мутаційних ушкоджень організмів, є однією із найактуальніших проблем сьогодення. Зростає важливість робіт, спрямованих на пошук антимутагенів, з одного боку, та на розробку тест-систем, здатних фіксувати як процеси мутагенезу, так і антимутагенезу,— з другого.

На етапі первинного скринінгу потенційних антимутагенів ефективно використовуються бактеріальні тести, зокрема, тест Еймса. У випадку застосування цього тесту для пошуку антимутагенів [1—3] вираховують кратність зменшення (чи відсоток пригнічення) досліджуваною речовиною кількості індукованих модельним мутагеном ревертантних колоній. При тестуванні мутагенів згідно з стандартною методикою токсичний вплив на бактеріальну культуру реєструється за станом фонового газону, а рівень інактивації дослідної популяції та відсоток мутантів відносно популяції, що вижила, не визначаються [4]. Це не має принципового значення в разі тестування мутагенів, але при тестуванні антимутагенів ці параметри більш широко розкривають характер дії сполуки, показуючи

її вплив ще й на рівень летальних ушкоджень. Отже, розробка нових тест-систем, які можна використовувати для вивчення як інактивуєчого та мутагенного ефектів, так і можливих антимутагенів, є важливим завданням.

У даній роботі вперше використали систему *E. coli*—бактеріофаг λ для вивчення впливу рослинних екстрактів на рівень леталей та маркерних мутацій, індукованих азотистою кислотою. Індукцію *h*-мутантів та інактивацію бактеріофага λ азотистою кислотою проведено *in vivo* повністю або з коротким етапом *in vitro*. Показано, що присутність екстрактів впливає на їхню вираженість різною мірою та в різних напрямках (стимуляція або пригнічення всієї популяції мутагенізованого фага та *h*-мутантів зокрема).

Бактеріофаг λ був вибраний нами як об'єкт досліджень насамперед тому, що мутаційні пошкодження в його ДНК ефективно репаруються ферментами клітини-господаря [5]. Це в певній мірі наближає бактеріально-вірусну систему до клітин вищих організмів, здатність яких усувати пошкодження ДНК загальновідома [6]. Фаг λ , що здавна використовувався для вивчення мутагенезу як *in vitro*, так і *in vivo* [7], має ще й інші переваги

як тест-об'єкт: його генетика добре вивчена; він може існувати у вигляді профага і слугувати своєрідним маркером на хромосомі клітини-господаря; при роботі з λ , як і з кожним бактеріофагом, легко отримати точні кількісні дані, оскільки його негативні колонії як мутантні, так і дикого типу не виявляють тенденції до додаткового підросту, що спостерігається у дослідах із сальмонелою (неопубліковані дані).

Матеріали і методи. Бактерії. У роботі використано штами *E. coli* С600 та *E. coli* CR63, отримані з Інституту біохімії та фізіології мікроорганізмів РАН (Пушчино-на-Оці).

Бактеріофаги. Як тест-фаг використовували фаг λ -4, отриманий в нашій лабораторії [8]. Завдяки делеції в сайті *att*, він, на відміну від дикої форми λ , утворює прозорі негативні колонії, завдяки чому їхній підрахунок стає зручнішим.

Поживні середовища. Бактерії та бактеріофаги вирощували на амінопептидному бульйоні (амінопептид Санкт-Петербурзького заводу медичних препаратів, розведений фізіологічним розчином NaCl у співвідношенні 1:2). У двошарових посівах за Грація [9] використовували амінопептидне агаризоване середовище (1,8 % — для нижнього шару та 0,6—0,8 % — для верхнього шару, об'єм стовпчиків 4,5 мл).

Рослинні екстракти. Досліджували 40 %-ві етанольні екстракти з натурального кореня (місце походження — Алтай) та біомаси культивованих клітин родіоли рожевої *Rhodiola rosea* L. із родини *Crassulaceae* (далі *Rh. rosea* нат. та *Rh. rosea* культ.). Методику одержання екстрактів описано в попередній роботі [10]. Вивчали також аптечний екстракт родіоли рожевої (1:1) у 40 % спирті (Львівська фармацевтична фабрика; партія № 10197; далі *Rh. rosea* апт.). Всі екстракти випаровували за допомогою вакуумно-ротаційного випаровувача при 40 °С майже до сухого залишку і розчиняли в стерильній дистильованій воді об'ємом, у 10 раз меншим, ніж вихідний об'єм екстракту.

Обробка фага азотистою кислотою та рослинними екстрактами. У першому варіанті експериментальних умов (дослід 1) клітини *E. coli* С600, вирощені при температурі 37 °С з аерацією до оптичної густини 0,4, інфікували бактеріофагом з множинністю 0,01, дозволяли адсорбуватися протягом 8 хв при 37 °С, після чого до цієї суміші клітин та бактеріофага додавали розчин NaNO₂ у 0,2 М СН₃СООН (рН 4,0) до кінцевої концентрації 0,05 М СН₃СООН і 0,0125 М NaNO₂ та витримували ще 7 хв. За таких умов фаг піддавали дії мутагену в реакційній пробірці, тобто перший етап

процесу мутагенезу проходив *in vitro*. Далі ці умови будуть називатися жорсткими. Таку мутагеновану суміш (по 0,5 мл) вносили у стовпчики розплавленого верхнього агару разом з 0,1 мл екстракту (дослідний варіант) або без екстракту (контроль). У другому варіанті експериментальних умов (досліди 2 і 3) культуру вирощували та інфікували бактеріофагом так само, як і в першому варіанті, але обробку суміші клітини—бактеріофаг *in vitro* виключали, замість чого клітини з адсорбованим на них фагом вносили безпосередньо у пробірку з напіврідким агаром, куди перед цим було додано розчин мутагену (0,1 мл при цій же кінцевій концентрації) та екстракт (0,1 мл у 1-му і 2-му досліді та 0,2 мл у 3-му досліді). Така послідовність операцій забезпечувала м'якшу обробку фага мутагеном. Застосування двох різних варіантів експериментальних умов дозволило оцінити вплив жорсткої (дослід 1) та м'якої (досліди 2 і 3) обробки об'єкта мутагеном на вихід індукованих мутацій. Крім того, оскільки у досліді 1 та 2 ми вносили рослинні екстракти у кількості 0,1 мл, а в 3-му — 0,2 мл, виникла можливість порівняти вплив однієї й тієї ж дози екстракту за різних умов обробки або різних доз екстракту за однакових умов. Через 18—24 год верхній шар знімали, ресуспендували, центрифугували і отримували препарати фагів, які далі аналізували для визначення величини загального титру, титру мутантів та відсотка індукованих мутантів. Загальну кількість фага визначали висіванням на *E. coli* С600, а кількість *h*-мутантів — висіванням на *E. coli* CR63. Спонтанний фон *h*-мутантів у препараті вихідного фага для всіх експериментів становив $(1,7 \pm 0,01) \cdot 10^{-8}$. Статистичну обробку даних здійснено за *t*-критерієм Стьюдента [11].

Результати і обговорення. Результати дослідів з отримання загального титру, титру та відсотка індукованих мутантів у контрольних (дія лише мутагену) та дослідних (дія мутагену одночасно з екстрактом) препаратах представлено в табл. 1. Як видно з наведених даних, абсолютні величини загального титру фага у контрольних препаратах коливаються від досліду до досліду, причому за умов жорсткішої обробки (дослід 1) спостерігається зниження і загального титру фага, і титру мутантів порівняно з дослідом 2 і 3 і ця різниця становить 3—4 порядки. У той же час відсоток індукованих мутантів для всіх трьох контрольних препаратів фага коливається значно менше і знаходиться в межах одного порядку в досліді 1 та 2 і зростає майже на порядок у досліді 3. Очевидно, що коливання відсотка індукованих мутантів, на відміну від коливань загального титру та титру му-

Таблиця 1

 Інактивуюча та мутагенна дія азотистої кислоти на бактеріофаг λ -4 у присутності рослинних екстрактів та без них

| Рослинний екстракт | Дослід 1 | | Дослід 2 | | Дослід 3 | |
|-------------------------|------------------------|--------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|
| | Титр загальний | | | | | |
| | $(M \pm m) \cdot 10^7$ | p | $(M \pm m) \cdot 10^{10}$ | p | $(M \pm m) \cdot 10^{10}$ | p |
| Позитивний контроль | 6,64±0,26 | — | 1,88±0,04 | — | 6,02±0,07 | — |
| <i>P. filicifolia</i> | 0,90±0,09 | < 0,01 | — | — | 3,75±0,06 | < 0,001 |
| <i>Rh. rosea</i> нат. | 6,33±0,25 | > 0,05 | 2,30±0,05 | < 0,05 | 4,40±0,06 | < 0,001 |
| <i>Rh. rosea</i> культ. | 8,52±0,29 | < 0,05 | 4,21±0,06 | < 0,01 | 4,21±0,06 | < 0,01 |
| <i>Rh. rosea</i> апт. | 15,09±0,39 | < 0,01 | 4,72±0,07 | < 0,001 | 5,01±0,07 | < 0,01 |

| Рослинний екстракт | Титр індукованих мутантів | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|------------|------------------------|-----------|------------------------|-----------|
| | M±m | p | $(M \pm m) \cdot 10^3$ | p | $(M \pm m) \cdot 10^4$ | p |
| | Позитивний контроль | 31,33±1,45 | — | 5,14±0,06 | — | 8,40±0,09 |
| <i>P. filicifolia</i> | 8,00±0,58 | < 0,001 | — | — | 8,15±0,06 | > 0,05 |
| <i>Rh. rosea</i> нат. | 30,00±1,53 | > 0,05 | 8,28±0,56 | < 0,01 | 6,40±0,07 | < 0,001 |
| <i>Rh. rosea</i> культ. | 57,67±2,60 | < 0,001 | 5,84±0,16 | < 0,05 | 10,54±0,12 | < 0,001 |
| <i>Rh. rosea</i> апт. | 99,00±5,57 | < 0,001 | 7,60±0,40 | < 0,01 | 3,24±0,07 | < 0,001 |

| Рослинний екстракт | Відсоток індукованих мутантів, $\cdot 10^{-5}$ | | | | | |
|-------------------------|--|-----------|------------------------|-----------|------------------------|------------|
| | M±m | p | $(M \pm m) \cdot 10^3$ | p | $(M \pm m) \cdot 10^4$ | p |
| | Позитивний контроль | 4,72±0,28 | — | 2,73±0,07 | — | 13,96±0,23 |
| <i>P. filicifolia</i> | 8,88±1,13 | < 0,01 | — | — | 21,74±0,38 | < 0,05 |
| <i>Rh. rosea</i> нат. | 4,74±0,31 | > 0,05 | 3,60±0,25 | < 0,01 | 14,55±0,27 | < 0,05 |
| <i>Rh. rosea</i> культ. | 6,77±0,38 | < 0,001 | 1,39±0,04 | < 0,001 | 25,03±0,46 | < 0,001 |
| <i>Rh. rosea</i> апт. | 6,56±0,41 | < 0,01 | 1,61±0,09 | < 0,001 | 6,47±0,17 | < 0,001 |

тантів, залежать не стільки від характеру мутагенної обробки, скільки є відображенням співвідношення процесів інактивації та мутагенезу у фазовій популяції.

Наведені у табл. 1 відсоткові значення загального титру та титру індукованих мутантів наочно відображають їхні коливання для різних дослідних варіантів стосовно контролю. Нижче ми детально проаналізуємо дані стосовно впливу кожного екстракту на інактивуючу та мутагенну дію азотистої кислоти на бактеріофаг λ -4.

Екстракт із *Rh. rosea* нат. за жорстких умов обробки при концентрації 0,1 мл (дослід 1) не впливає ні на загальний титр фага, ні на титр та відсоток індукованих мутантів ($p > 0,05$). Разом з

тим за м'якших умов обробки при даній концентрації цей екстракт підвищує загальний титр фага в 1,2 раза і більш суттєво — титр індукованих мутантів (в 1,6 раза), що в свою чергу призводить до підвищення відсотка індукованих мутантів в 1,3 раза. Підвищена концентрація екстракту з *Rh. rosea* нат. за аналогічних умов обробки майже в однаковій мірі зменшує і загальний титр фага, і титр індукованих мутантів, що утримує відсоток індукованих мутацій на рівні позитивного контролю.

У дослідях з екстрактом із *Rh. rosea* культ. використання нижчої концентрації за умов як жорсткої, так і м'якої обробки призводить до підвищення обох титрів, але з різним співвідношенням.

Таблиця 2

Вплив рослинних екстрактів на інактивацію та мутагенез бактеріофага λ -4 азотистою кислотою

| Варіант досліду | № досліду | Загальний титр, М±m | p | Титр індукованих мутантів, М±m | p | Відсоток індукованих мутантів · 10 ³ | p |
|-------------------------|-----------|---------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|---|-------------|
| Контроль | 1 | $(6,64 \pm 0,26) \cdot 10^7$ | — | $31,33 \pm 1,45$ | — | $4,72 \pm 0,28$ | — |
| | 2 | $(6,64 \pm 0,26) \cdot 10^{10}$ | — | $(5,14 \pm 0,06) \cdot 10^3$ | — | $2,74 \pm 0,07$ | — |
| | 3 | $(6,64 \pm 0,26) \cdot 10^{10}$ | — | $(8,39 \pm 0,09) \cdot 10^4$ | — | $13,96 \pm 0,23$ | — |
| <i>P. filicifolia</i> | 1 | $(6,64 \pm 0,26) \cdot 10^7$ | $p < 0,01$ | $6,64 \pm 0,58$ | $p < 0,001$ | $80,88 \pm 0,13$ | $p < 0,01$ |
| | 2 | — | — | — | — | — | — |
| | 3 | $(3,75 \pm 0,06) \cdot 10^{10}$ | $p < 0,001$ | $(8,15 \pm 0,06) \cdot 10^4$ | $p > 0,05$ | $21,74 \pm 0,38$ | $p < 0,05$ |
| <i>Rh. rosea</i> нат. | 1 | $(6,33 \pm 0,25) \cdot 10^7$ | $p < 0,05$ | $30,00 \pm 1,53$ | $p > 0,05$ | $4,74 \pm 0,31$ | $p > 0,05$ |
| | 2 | $(2,30 \pm 0,05) \cdot 10^{10}$ | $p < 0,05$ | $(8,28 \pm 0,56) \cdot 10^3$ | $p < 0,01$ | $3,60 \pm 0,25$ | $p < 0,01$ |
| | 3 | $(4,40 \pm 0,06) \cdot 10^{10}$ | $p < 0,001$ | $(6,40 \pm 0,07) \cdot 10^4$ | $p < 0,001$ | $14,55 \pm 0,27$ | $p > 0,05$ |
| <i>Rh. rosea</i> культ. | 1 | $(8,52 \pm 0,29) \cdot 10^7$ | $p < 0,05$ | $57,67 \pm 2,60$ | $p < 0,001$ | $6,77 \pm 0,38$ | $p < 0,001$ |
| | 2 | $(4,21 \pm 0,06) \cdot 10^{10}$ | $p < 0,01$ | $(5,84 \pm 0,16) \cdot 10^3$ | $p < 0,05$ | $1,38 \pm 0,04$ | $p < 0,001$ |
| | 3 | $(4,21 \pm 0,06) \cdot 10^{10}$ | $p < 0,01$ | $(10,54 \pm 0,12) \cdot 10^4$ | $p < 0,001$ | $25,03 \pm 0,46$ | $p < 0,001$ |
| <i>Rh. rosea</i> апт. | 1 | $(15,09 \pm 0,39) \cdot 10^7$ | $p < 0,01$ | $99,00 \pm 5,57$ | $p < 0,001$ | $6,56 \pm 0,41$ | $p < 0,01$ |
| | 2 | $(4,72 \pm 0,07) \cdot 10^{10}$ | $p < 0,001$ | $(7,60 \pm 0,40) \cdot 10^3$ | $p < 0,01$ | $1,61 \pm 0,09$ | $p < 0,001$ |
| | 3 | $(5,01 \pm 0,07) \cdot 10^{10}$ | $p < 0,01$ | $(3,24 \pm 0,07) \cdot 10^4$ | $p < 0,001$ | $6,47 \pm 0,17$ | $p < 0,001$ |

Так, за умов жорсткої обробки (дослід 1) більше підвищується титр мутантів і відповідно в 1,4 раза зростає відсоток індукованих мутацій. За умов м'якої обробки загальний титр підвищується сильніше, ніж титр мутантів, що спричинює дворазове зменшення відсотка індукованих мутацій порівняно з контролем. У таких же умовах вища концентрація екстракту веде до зниження загального титру фага, як це було у варіанті з *Rh. rosea* нат. (дослід 3), та, на відміну від останньої, до зростання титру мутантів з відповідним підвищенням їхнього відсотка.

Ситуація, що складається стосовно препарату *Rh. rosea* апт., нагадує стан при застосуванні екстракту із *Rh. rosea* культ., бо використання меншої концентрації екстракту в обох варіантах умов обробки призводить до підвищення як загального титру, так і титру мутантів, причому співвідношення такого зростання також збігається з даними щодо *Rh. rosea* культ. Так, в умовах жорсткої обробки більше підвищується титр мутантів і відповідно зростає їхній відсоток. В умовах м'якої обробки сильніше зростає загальний титр і тому відсоток мутантів знижується в 1,6 раза. В присутності вищої концентрації екстракту спостерігається, як і при застосуванні двох попередніх екстрактів, зни-

ження загального титру фага. Титр мутантів знижується, що наближає ситуацію до *Rh. rosea* нат. і відрізняє її від *Rh. rosea* культ. Відсоток індукованих мутантів також знижується в 1,6 раза, що відрізняє його від решти випробуваних у вищій концентрації екстрактів, які або не впливали на відсоток індукованих мутацій (*Rh. rosea* нат.), або підвищували його (*Rh. rosea* культ.).

На перший погляд, отримані дані справляють враження безсистемного коливання показників для різних екстрактів за різних експериментальних умов. Проте узагальнений аналіз дозволяє виявити певні закономірності впливу екстрактів на індуквані азотистою кислотою мутагенез та інактивацію. По-перше, простежується залежність ефекту від концентрації екстракту. За умов як жорсткої, так і м'якої обробки нижча концентрація екстракту стимулює виживання всієї популяції і мутантів зокрема. Підвищення концентрації екстракту вдвічі спричинює падіння рівня виживання фагової популяції і *h*-мутантів. Другою важливою особливістю є синхронність коливань загального титру і титру маркерних мутантів. Виявленням закономірностям не відповідає лише кількість *h*-мутантів у варіанті з *Rh. rosea* культ. (дослід 3). В наших дослідках падіння титру мутантів відбувалося

Таблиця 3
Співвідношення загального титру та титру індукованих азотистою кислотою мутантів між фага λ -4 контрольним (100 %) та дослідним варіантом

| Варіант досліду | № досліду | Загальний титр, % від контролю | Титр індукованих мутантів, % від контролю | Відсоток індукованих мутантів $\cdot 10^{-3}$ * | p |
|-------------------------|-----------|--------------------------------|---|---|-----------|
| Контроль | 1 | 100 | 100 | 4,72±0,28 | — |
| | 2 | 100 | 100 | 2,73±0,07 | — |
| | 3 | 100 | 100 | 13,96±0,23 | — |
| <i>P. filicifolia</i> | 1 | 13,56±1,51 | 25,53±2,19 | 8,88±1,13 | p < 0,01 |
| | 2 | — | — | — | — |
| | 3 | 62,31±1,23 | 95,05±1,28 | 21,74±0,38 | p < 0,05 |
| <i>Rh. rosea</i> нат. | 1 | 95,23±5,26 | 95,75±6,60 | 4,74±0,31 | p > 0,05 |
| | 2 | 122,16±3,63 | 160,96±11,09 | 3,60±0,25 | p < 0,01 |
| | 3 | 73,15±1,38 | 76,24±1,19 | 14,55±0,27 | p > 0,05 |
| <i>Rh. rosea</i> культ. | 1 | 128,16±6,59 | 184,07±11,91 | 6,77±0,38 | p < 0,001 |
| | 2 | 223,91±5,93 | 113,45±3,49 | 1,39±0,04 | p < 0,001 |
| | 3 | 70,01±1,34 | 125,56±1,95 | 25,03±0,46 | p < 0,01 |
| <i>Rh. rosea</i> апт. | 1 | 227,11±10,51 | 315,99±23,04 | 6,56±0,41 | p < 0,01 |
| | 2 | 250,90±6,54 | 147,70±7,99 | 1,61±0,09 | p < 0,001 |
| | 3 | 83,34±1,52 | 38,63±8,73 | 6,47±0,17 | p < 0,001 |

П р и м і т к а. *Відсотки індукованих мутантів взято з табл. 2.

на фоні падіння загального титру, що свідчить про важливість останнього показника. Ця обставина наводить на думку щодо можливості використання для первинного скринінгу потенційних антимутагенів такого параметру як коливання загального титру без використання маркерних мутантів.

Наведені дані свідчать, насамперед, про функціонування запропонованої тест-системи та придатність фага λ як тест-об'єкта, щоправда з деякими обмеженнями, зумовленими особливостями застосованих експериментальних умов. Мається на увазі, що за умов проведених експериментів реєструються не лише первинні ефекти мутагенезу чи антимутагенезу, але й наслідки розмноження всієї популяції мутагенізованого фага. Такий показник, як відсоток індукованих мутацій для даних експериментальних умов, суттєвою частиною яких є підрушування дослідної популяції, сильно коливається від досліду до досліду і може свідчити, в основному, лише про тенденції у впливах екстрактів. Зрозуміло, що цей показник матиме більше значення при проведенні дослідів *in vitro*, тобто при аналізі первинного ефекту досліджуваних компо-

нентів без наслідків розмноження всієї популяції мутагенізованого фага під час 18—24-год вирощування його на чашці.

Для порівняння активності різних екстрактів ми використали середнє значення відсотка (частоти) індукованих мутантів для кожного екстракту. Цей показник одержали, використовуючи метод об'єднаних вибірок [11] для двох експериментів, у яких доза екстрактів була однаковою (досліди 1 та 2). Було встановлено, що кожен з екстрактів виявляє певну тенденцію у впливові на відсоток індукованих мутантів (табл. 2). Так, екстракт із *Rh. rosea* нат. в цілому виявив здатність підвищувати частоту індукованих мутантів, хоча й невірогідно (p < 0,05). Навпаки, для екстракту із *Rh. rosea* культ. та аптечного препарату родіоли можна відмітити чітке зниження відсотка індукованих мутантів, але рівень вірогідності показаний лише для *Rh. rosea* культ. Таким чином, виявлені тенденції свідчать про активність екстрактів у даній системі як щодо летальних, так і генних мутацій, що говорить про безперечну перспективність подальших досліджень у цьому напрямку.

Дані, отримані для *Rh. rosea* культ. у тест-системі *E. coli*—фаг λ , узгоджуються з нашими результатами, отриманими в тесті Еймса. В попередній роботі ми показали, що цей екстракт показав значну антимутагенну активність, зменшуючи кількість колоній-ревертантів у 4—5 разів [10]. Однак, лише визначення в цих експериментах відсотка індукованих мутантів стосовно популяції бактерій, що вижили, дозволило б переконатися у справжньому запобіганні утворенню генних мутантів, тому що, враховуючи вищенаведене, існує ймовірність зниження кількості ревертантів (мутантів) за рахунок зниження загального титру.

Отже, для первинного скринінгу біологічної дії потенційних антимутагенів можна використовувати прокаріотичні тести, обмежуючись у певних випадках визначенням лише загального титру мутагенізованого об'єкта. Детальніше виявлення захисної, а отже й потенційно антимутагенної дії сполук повинно базуватися на визначенні наступних параметрів: загальний титр; титр маркерних мутантів; відсоток маркерних мутантів стосовно популяції особин, що вижили; чутливість організмів дикого типу та маркерних мутантів до досліджуваної сполуки. Найповніші результати можна одержати при поєднанні експериментів в умовах *in vitro* (вивчення процесів, що відбуваються на рівні ДНК) та *in vivo* (виявлення внеску в досліджувані процеси метаболічних та інших систем клітини).

Таким чином, нами показано придатність бактеріофага λ -4 для пошуку потенційних антимутагенів. Для первинного скринінгу антимутагенної дії можна обмежитись аналізом впливу речовини на інактивацію мутагенізованого об'єкта. Детальне вивчення антимутагенної дії досліджуваної сполуки вимагає аналізу її інактивуєної дії, визначення титру індукованих мутантів та відсотка індукованих мутантів стосовно популяції особин, що вижили, в досліді *in vitro*. На відміну від аптечного препарату та екстракту з дикоростучого кореня *Rh. rosea* екстракт з її культивованих клітин вірогідно зменшував відсоток індукованих азотистою кислотою мутантів фага λ -4. Виявлено синхронність коливань загального титру та титру маркерних мутантів у мутагенізованій фаговій популяції в присутності рослинних екстрактів.

А. С. Дворник, Т. П. Перерва, Л. М. Мойса, В. А. Кунах

Использование системы *Escherichia coli*—бактериофаг λ для изучения антимутагенного действия растительных экстрактов

Резюме

В системе *E. coli*—бактериофаг λ изучали антимутагенное действие аптечного препарата *Rhodiola rosea* L. и экстрактов, полученных из биомассы культивируемых клеток *Rh.*

rosea и ее натурального корня. Экстракт из биомассы культивируемых клеток достоверно уменьшал процент индуцированных мутантов, влияние остальных препаратов не достоверно. Обнаружены синхронные колебания общего титра и титра индуцированных мутантов фага. Обосновывается дееспособность данной системы в условиях *in vivo* и целесообразность использования ее в условиях *in vitro* при изучении антимутагенного действия веществ.

A. S. Dvornyk, T. P. Pererwa, L. M. Moysa, V. A. Kunakh

Escherichia coli — bacteriophage λ system use in studies on antimutagenic effects of plant extracts

Summary

Antimutagenic effect of *Rhodiola rosea* commercial preparation and of extracts derived from the biomass of cultured cells of *Rhodiola rosea* and its natural roots has been studied in *Escherichia coli*—bacteriophage λ system. The yield of mutants induced has been probably decreased by the extract of cultured cell biomass, the effect of other preparations being not significant. Some synchronous fluctuations of total titer and induced phage mutant titer have been detected. The authors prove the usefulness of the given system *in vivo* and *in vitro* conditions for the investigation of antimutagenic properties of some substances.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барилляк И. Р., Бердышев Г. Д., Дуган А. М. Антимутагенное действие продуктов пчеловодства // Цитология и генетика.—1996.—30, № 6.—С. 48—55.
2. Барилляк И. Р., Дуган А. М. Исследование антимутагенного действия спиртовых вытяжек из культуры тканей *Rhodiola rosea* и *Polyscias filicifolia* в опытах на *Salmonella typhimurium* // Доп. АН України.—1994.—№ 4.—С. 151—155.
3. Искандарова К. А., Ким О. Г., Симицына В. Г. Изучение антимутагенной активности растительных экстрактов в тесте Еймса // Биотехнология. Теория и практика (Алматы).—1997.—№ 3.—С. 76.
4. Ames B. N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian* microsome test // *Mutat. Res.*—1975.—31.—Р. 347—364.
5. Кривиский А. С., Кцюян Ж. А., Матвиенко Н. И. О репарации клеткой хозяина предмутационных повреждений и спасении маркера у внеклеточного УФ-облученного бактериофага лямбда // *Генетика.*—1970.—6, № 2.—С. 110—122.
6. Тарасов В. А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза.—М.: Наука, 1982.—228 с.
7. Захаров И. А., Кривиский А. С. Радиационная генетика микроорганизмов.—М.: Атомиздат, 1972.—294 с.
8. Перерва Т. П., Мирюта А. Ю., Вудмаска М. И., Алексеев И. П. Лизогения у фага MS2. Экспрессия MS2-специфической информации сегрегантами нестабильных трансдуцирующих фагов P1 i λ // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 4.—С. 73—83.
9. Адамс М. Бактериофаги.—М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1961.—527 с.
10. Дворник А. С., Дуган О. М., Кунах В. А. Антимутагенна дія екстрактів із біомаси культивованих клітин деяких лікарських рослин // Доп. НАН України.—1999.—№ 7.—С. 166—169.
11. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков.—М.: Изд-во АН СССР, 1963.—323 с.

УДК 575.2

Надійшла до редакції 30.06.99