

БОТАНИЧЕСКОЕ РЕСУРСОВЕДЕНИЕ

УДК 57.033

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТА КИРКАЗОНА ЛОМОНОСОВИДНОГО (*ARISTOLOCHIA CLEMATITIS*) ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ АКТИВНОСТИ КОЛЕЦ БАЛЬБИАНИ И ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ

Н. В. Полуконова¹, А. А. Андреева¹, Е. А. Шаркова²

¹ Саратовский государственный медицинский университет
имени В. И. Разумовского

Россия, 410012, Саратов, Б. Казачья, 112

E-mail: polukonovanv@yandex.ru

² Саратовский национальный исследовательский государственный
университет имени Н. Г. Чернышевского
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83

Поступила в редакцию 14.09.2017 г.

Исследование экстракта кирказона ломоносовидного (*Aristolochia clematidis*) по показателям активности колец бальбиани и ядрышкового организатора политенных хромосом. – Полуконова Н. В., Андреева А. А., Шаркова Е. А. – Исследованные концентрации экстракта кирказона ломоносовидного (*Aristolochia clematidis*) оказывали воздействие на функциональную активность политенных хромосом *Chironomus*. Активность всех колец Бальбиани (BR) наиболее подавлена при концентрации 1/10 от LC50, чем при 1/100 LC50. Активность ядрышкового организатора (NOR) более подавлена при концентрации 1/100 LC50. Размах варьирования показателя активности BRB в контроле значительно выше, чем при низкой концентрации. Минимальный размах наблюдается при высокой концентрации, что подчеркивает значительное влияние этой концентрации на функциональное состояние политенных хромосом. На фоне подавления функциональной активности политенных хромосом возникновение мутаций маловероятно, в связи с чем, водный раствор сухого спиртового экстракта кирказона, содержащий флавоноиды не оказывает цитотоксического эффекта в отношении

интерфазных хромосом эукариот.

Ключевые слова: кирказон ломоносовидный, флавоноиды, политенные хромосомы, ядрышковый организатор, кольца Бальбиани, *Chironomus*, цитотоксичность, LC50.

Investigation of the *Aristolochia clematitis* extract by analyzing the activity of the Balbiani rings and the nuclear organizer in polytene chromosomes. – Polukonova N. V., Andreeva A. A., Sharkova E. A. – The investigated concentrations of the Kirkozoon lomonosome extract (*Aristolochia clematitis*) affect the functional activity of *Chironomus* polytene chromosomes. The activity of all Balbiani (BR) rings is most suppressed at a concentration of 1/10 of the LC50, rather than at 1/100 LC50. The activity of the nucleolar organizer (*NOR*) is more suppressed at a concentration of 1/100 LC50. The range of variation of the *BRB* activity index in the control is much higher than at a low concentration. The minimum range is observed at a high concentration. It indicates the significant effect of this concentration on the polytene chromosomes functional state. When the functional activity of polytene chromosomes is suppressed the occurrence of mutations is unlikely, therefore, the water solution of the Kirkozoon dry alcohol extract containing flavonoids does not demonstrate cytotoxic effect on eukaryote interphase chromosomes.

Key words: *Aristolochia clematitis*, flavonoids, polytene chromosomes, nucleolar organizer, Balbiani rings, *Chironomus*, cytotoxicity, LC50.

DOI: 10.18500/1682-1637-2017-15-3-33-40

Алкалоидсодержащие ядовитые растения относятся к наиболее биологически активным, однако их можно применять только в незначительных количествах и под строгим контролем врача. К таким растениям относится Кирказон ломоносовидный (*Aristolochia clematitis*), водные извлечения которого обладают высокой токсичностью. Применение в качестве экстрагента 95% этилового спирта (Патент на изобретение RUS 2482863 15.02.2012, Navolokin et al., 2012; Полуконова и др., 2013; Polukonova et al., 2014) позволяет получить не только не токсичный экстракт, но и обладающий полезными свойствами. Так, при исследовании экстрактов лекарственных растений, полученных данным способом, в т.ч. и из ядовитых, были выявлены противовоспалительное, жаропонижающее, антимикробное, противотуберкулезное, противоопухолевое свойства (Наволокин и др., 2013, 2015; Полуконова и др., 2015). В отношении Кирказона данный метод экстракции ранее не применялся. Нами была исследована и выявлена определенная активность экстракта Кирказона в отношении клеток эмбриона свиньи

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТА КИРКАЗОНА ЛОМОНОСОВИДНОГО

(*SPEV-2*) (Андреева и др., 2016). Однако цитогенетическая активность экстракта кирказона ломоносовидного ранее не была изучена.

Цель работы – исследовать цитотоксическую активность экстракта Кирказона ломоносовидного (*Aristolochia clematitidis*) по показателям активности колец бальбиани и ядрышкового организатора политенных хромосом *Chironomus*.

Политенные хромосомы (ПХ) у личинок хирономид *Chironomus*, находящиеся постоянно в интерфазном периоде, служат удобным объектом как для анализа микроэволюционных событий, происходящих в природных популяциях этой группы насекомых (Полуконова и др., 2013; Полуконова, 2003. Полуконова, Белянина, 2002.), так и для исследования изменений функциональной активности (ФА) хромосом эукариот в целом (Полуконова, Белянина, 2006; Федорова, Полуконова, 2008; Федорова и др., 2009 а, б; Полуконова, 2015). Были определены показатели функциональной активности политенных хромосом *Chironomus* для цито- и генотоксического исследования растительных экстрактов (Андреева и др., 2016). Использование политенных хромосом *Chironomus* в качестве модельного объекта для исследования цито- и генотоксичности растительных экстрактов удобно, т.к. личинок хирономид можно также использовать и для оценки токсичности экстрактов (Полуконова и др., 2014; Курчатова и др., 2014). Так, нами был определен класс токсичности водной и хлороформной фракций экстрактов Кирказона (Андреева и др., 2015).

Материал и методы

В работе использована трава Кирказона ломоносовидного, собранная в Лысогорском районе у с. Атаевка Саратовской обл. в июне 2015 г. Сырье хранили в чистом, сухом, темном, прохладном и проветриваемом месте, не зараженном амбарными вредителями, защищенном от воздействия прямых солнечных лучей. Экстракт травы Кирказона готовили способом, заявленным в патенте (Патент № 2482863).

Использованы личинки *Ch. plumosus* из озера Сазанка Саратовской обл., собранные в марте 2016 г. Всего исследовано 1000 личинок. До начала экспериментов личинок акклиматизировали в течение суток. Эксперименты проводили в кюветах объемом 250 мл, глубиной 5 см и площадью поверхности 102 см², при комнатной температуре, в непроточных условиях, без субстрата (во избежание адсорбции препарата на

поверхности частиц ила), в отстоянной водопроводной воде при $pH = 7$. LC_{50} экстракта кирказона определяли пробит-анализом (Корозов, Калинин, 2003). Для фиксации личинок использована спиртуксусная смесь (96% этанол : ледяная уксусная кислота = 3:1). Препараты ПХ готовили по этилоорсеиновой методике. Временные препараты ПХ анализировали под световым микроскопом «Люмипам» при увеличении 7×60 .

Изменения функциональной активности (ФА) политенных хромосом (ПХ) исследовали по индексам: ядрышкового организатора (NOR) – отношение максимального диаметра к ширине интактного района 6 ПХ IV, колец Бальбиани – $BR_{1G}R$ и $BR_{2G}R$ – отношение максимального диаметра, соответственно, BR_{1G} и BR_{2G} к ширине интактного района 6 ПХ IV, BR_B – отношение максимального диаметра BR плеча B к ширине интактного района 17. Для нивелирования погрешностей (связанных со стрессовым воздействием на основе изменения температурных условий, отсутствия субстрата и пищи в период острого эксперимента) данные нормировались на контроль, т.е. значения индексов контроля принимались за единицу. При анализе цитогенетических эффектов Кирказона использовали концентрации 1/10 LC_{50} мг/мл при экспозиции 1 ч., 1/100 LC_{50} мг/мл при экспозиции 1 ч.; 1/10 LC_{50} мг/мл при экспозиции 24 часа, 1/100 LC_{50} мг/мл при экспозиции 24 часа. Статистическую обработку показателей функциональной активности политенных хромосом проводили в среде специализированных пакетов Excel, Statistica 6. Для характеристики группы использовали среднее арифметическое и стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение

Структура ПХ в контроле через 1 ч. достаточно четкая. Через 24 ч. в контроле наблюдается тенденция увеличения четкости дисковой структуры за счет снижения ФА ПХ и степени адсорбции красителя. В целом ПХ функционально активны, однако их активность снижена по сравнению с состоянием на 1 ч. ФА BR_B и $BR_{1G}R$ повышается к 24 ч. ФА $BR_{2G}R$ понижается к 24 ч. ФА NOR не меняется в течение суток (таблица).

Активность функциональных районов при концентрации 1/10 мг/мл по сравнению с контролем 1 ч. ФА BR_B и $BR_{1G}R$ не меняется. ФА $BR_{2G}R$ и NOR увеличивается. Через 24 ч. ФА всех колец Бальбиани

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТА КИРКАЗОНА ЛОМОНОСОВИДНОГО

(BRB, BR_{1G}R и BR_{2G}R) и NOR понижается. Активность функциональных районов при концентрации 1/10 мг/мл в зависимости от времени воздействия. За сутки воздействия экстракта в концентрации 1/10 мг/мл происходит подавление ФА всех участков ПХ.

Динамика функциональной активности колец Бальбиани
и ядрышкового организатора

Показатели	Контроль 1 ч.	Концентрации		Контроль 24 ч.	Концентрации	
		1/10 LC ₅₀	1/100 LC ₅₀		1/10 LC ₅₀	1/100 LC ₅₀
BRB	1.12 – 2.00 X = 1.39 ± 0.65	1.30 – 1.80 X = 1.60 ± 0.77 P = 0.00001	0.97 – 2.40 X = 1.31 ± 0.16 P = 0.027	1.60 – 3.00 X = 2.07 ± 0.38	1.54 – 2.17 X = 1.91 ± 0.77 P = 0.00002	1.20 – 2.20 X = 1.83 ± 0.42 P = 0.00001
BR1GR	1.12 – 1.80 X = 1.34 ± 0.24	1.20 – 1.80 X = 1.56 ± 0.21 P = 0.002	1.20 – 2.00 X = 1.79 ± 0.22 P = 0.00001	1.23 – 2.25 X = 1.65 ± 0.35	1.15 – 2.14 X = 1.53 ± 0.28 P = 0.0014	1.10 – 1.70 X = 1.46 ± 0.24 P = 0.00004
BR2GR	1.5 – 2.00 X = 1.69 ± 0.26	1.60 – 2.50 X = 1.97 ± 0.26 P = 0.002	2.00 – 2.5 X = 2.10 ± 0.27 P = 0.000001	1.00 – 2.20 X = 1.58 ± 0.45	0.73 – 1.70 X = 1.50 ± 0.28 P = 0.0001	1.10 – 2.16 X = 1.50 ± 0.32 P = 0.027
NOR	2.60 – 3.80 X = 3.04 ± 0.61	3.75 – 5.70 X = 4.24 ± 0.55 P = 0.002	3.3 – 5.00 X = 4.67 ± 0.16 P = 0.00001	1.7 – 5.00 X = 3.22 ± 0.92	1.25 – 4.00 X = 2.70 ± 0.31 P = 0.0009	1.70 – 3.57 X = 2.84 ± 0.75 P = 0.007

ПХ жирным шрифтом выделены значения показателей с уровнем значимости $P < 0.05$

Активность функциональных районов при концентрации 1/100 мг/мл по сравнению с контролем 1 ч. ФА BRB не меняется. ФА BR_{2G}R уменьшается. ФА BR_{1G}R и NOR увеличивается. Через 24 ч. ФА колец

Бальбиани – *BRB*, *BR_{1G}R* и *NOR* понижается. ФА *BR_{2G}R* не меняется. ФА *BRB* повышается к 24 ч. *Активность функциональных районов при концентрации 1/100 мг/мл в зависимости от времени воздействия.* За сутки воздействия экстракта в концентрации 1/100 мг/мл происходит подавление ФА всех участков ПХ.

В результате обе исследованные концентрации экстракта оказывали воздействие на ФА ПХ. При этом ФА всех КБ наиболее подавлена при концентрации 1/10 мг/мл, чем при 1/100 мг/мл. В то время, как ФА *NOR* более подавлена при концентрации 1/100 мг/мл. Размах варьирования показателя ФА *BRB* в контроле значительно выше, чем при низкой концентрации. Минимальный размах наблюдается при высокой концентрации, что подчеркивает значительное влияние этой концентрации на функциональное состояние ПХ.

На фоне подавления функциональной активности ПХ возникновение мутаций маловероятно, в связи с чем, водный раствор сухого спиртового экстракта Кирказона, полученный указанным в патенте способом, не оказывает цитотоксического эффекта в отношении инترفазных хромосом эукариот.

Список литературы

Андреева А. А., Гелевера Н. И., Шаркова Е. А., Полуконова А. В., Прилепский А. Ю., Полуконова Н. В. Сравнение активности экстрактов кирказона ломоносovidного (*Aristolochia clematitidis*) и кипрея узколистного (*Chamerion angustifolium*) на культуру клеток SPEV-2 // Саратов. науч.-мед. журн. 2016. Т. 12, № 2. С. 226.

Андреева А. А., Шаркова Е. А., Полуконова Н. В. Сравнительный токсикологический анализ водной и хлороформной фракций экстрактов кирказона ломоносovidного // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: матер. II Междунар. науч. конф. Новосибирск: Изд-во Новосиб. гос. аграр. ун-та. 2015. С. 179 – 181.

Андреева А. А., Шаркова Е. А., Полуконова Н. В. Показатели функциональной активности полигенных хромосом *Chironomus* для цито- и генотоксического исследования растительных экстрактов // Неделя науки – 2016: матер. Всерос. молодёжн. форума с междунар. участием. СПб.: Изд-во Петербург. гос. ун-та путей сообщений, 2016. С. 372 – 375.

Коросов А. В., Калинин Н. М. Количественные методы экологической токсикологии: учеб.-метод. пособие. Петрозаводск: Изд-во Петр. гос. ун-та, 2003. 56 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТА КИРКАЗОНА ЛОМОНОСОВИДНОГО

Курчатова М. Н., Полуконова Н. В., Дурнова Н. А. Определение класса токсичности экстракта *Gratiola officinalis* L. с использованием нового тест-объекта – личинок *Chironomus riparius* // Токсикологический вестн. 2014. № 6. С. 40 – 43.

Наволокин Н. А., Полуконова Н. В., Маслякова Г. Н., Скворцова В. В., Байтман Т. П., Бучарская А. Б., Дурнова Н. А. Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12, № 2. С. 59 – 59а.

Наволокин Н. А., Скворцова В. В., Полуконова Н. В., Манаенкова Е. В., Панкратова Л. Э., Курчатова М. Н., Маслякова Г. Н., Дурнова Н. А. Противотуберкулезная активность экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) *in vitro* // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, № 4. С. 10 – 13.

Полуконова Н. В., Наволокин Н. А., Райкова С. В., Маслякова Г. Н., Бучарская А. Б., Дурнова Н. А., Шуб Г. М. Противовоспалительная, жаропонижающая и антимикробная активность флаваноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, № 1. С. 34 – 38.

Полуконова Н. В. Реконструкция этапов формирования кардиологической структуры популяций *Chironomus plumosus* и *C. usenicus* (Diptera, Chironomidae) субаридных территорий Прикаспийской низменности // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. 2003. № 2. С. 29.

Полуконова Н. В. Теоретические и прикладные аспекты исследования функциональной активности политенных хромосом под влиянием разных факторов // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2015. Т. 5, № 6. С. 929 – 939.

Полуконова Н. В., Белянина С. И. О возможности гибридогенеза в видообразовании комара-звонца *Chironomus usenicus* Loginova et Beljanina (Chironomidae, Diptera) // Генетика. 2002. Т. 38, №12. С. 1635 – 1640.

Полуконова Н. В., Белянина С. И. Цитогенетические эффекты ксенобиотиков у *Chironomus riparius* (Chironomidae, Diptera) // Саратов. научн.-мед. журн. 2006. Т. 2, № 3. С. 33 – 39.

Полуконова Н. В., Дурнова Н. А., Курчатова М. Н., Наволокин Н. А., Голиков А. Г. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // Химия растительного сырья. 2013. № 4. С. 165 – 173.

Полуконова Н. В., Кармоков М. X. Микроэволюционные изменения в популяциях *Chironomus nuditaris* Str. (Keyl, 1962) (Chironomidae, Diptera) Центрального Кавказа // Генетика. 2013. Т. 49, № 2. С. 175 – 181.

Н. В. Полуконова, А. А. Андреева, Е. А. Шаркова

Полуконова Н. В., Курчатова М. Н., Дурнова Н. А. Применение нового тест-объекта личинок *Chironomus riparius* для оценки токсичности на примере экстракта *Gratiola officinalis* // Токсикологический вестник. 2014. С. 334.

Полуконова Н. В., Наволокин Н. А., Дурнова Н. А., Маслякова Г. Н., Бучарская А. Б. Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью // Патент на изобретение RU 2482863 15.02.2012

Федорова И. А., Полуконова Н. В. Цитогенетические эффекты полулетальной концентрации (1с50) пилокарпина при воздействии на личинок *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) // Энтмологические и паразитологические исследования в Поволжье. 2008. № 7. С. 76 – 79.

Федорова И. А., Полуконова Н. В., Петрова Н. В. Цитогенетические эффекты холинотропных препаратов при комбинированном действии на личинок *Chironomus plumosus* (Diptera) in vivo // Цитология. 2009 а. Т. 51, № 10. С. 849.

Фёдорова И. А., Полуконова Н. В., Дворецкий К. Н., Богословская С. И. Функциональная активность политенных хромосом *chironomus* (Diptera) под влиянием холинотропных препаратов и пилокарпина // Экологическая генетика. 2009 б. Т. VII, № 3. С. 44 – 52.

Navolokin N. A., Polukonova N. V., Maslyakova G. N., Bucharskaya A. B., Durnova N. A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with trasplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012. Т. 1, № 2. С. 203.

Polukonova N. V., Kurchatova M. N., Navolokin N. A., Bucharskaya A. B., Durnova N. A., Maslyakova G. N. A new extraction method of bioflavanoids from poisonous plant (*Gratiola officinalis* L.) // Russian Open Medical Journal. 2014. Т. 3, № 3. С. 304.