

<https://doi.org/10.17816/ecogen17293-100>

## СПОСОБНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ *TEUCRIUM POLIUM* И *RUMEX CRISPUS* ЗАЩИЩАТЬ ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА ОТ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ЦИКЛОФОСФАНОМ

© С. Юксел<sup>1</sup>, С. Сежер<sup>1</sup>, Е. Куртоглу<sup>2</sup>, Х. Бэг<sup>1</sup><sup>1</sup> Университет Ишмета Инону, Малатья, Турция;<sup>2</sup> Университет Локмана Хекима, Анкара, Турция

Для цитирования: Юксел С., Сежер С., Куртоглу Е., Бэг Х. Способность экстрактов *Teucrium polium* и *Rumex crispus* защищать лимфоциты человека от генотоксических повреждений, вызываемых циклофосфаном // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 93–100. <https://doi.org/10.17816/ecogen17293-100>.

Поступила: 07.11.2018

Одобрена: 05.04.2019

Принята: 17.06.2019

✿ Растения видов *Teucrium polium* (*T. polium*) и *Rumex crispus* (*R. crispus*) широко распространены в Анатолии и считается, что они обладают целебным действием в отношении многих заболеваний. В этом исследовании растительные экстракты предложены в качестве возможных средств для восстановления поврежденных клеток путем учета сестринских хроматидных обменов (СХО), микроядер (МЯ), митотического индекса (МИ), индекса репликации (ИР) и ядерных аномалий (ЯА), в отношении генотоксичности циклофосфана (ЦФ) в лимфоцитах человека. В ходе исследования было сформировано 8 экспериментальных групп. В среду для культивирования клеток было добавлено 0,16 мкг/мл ЦФ, и клетки обрабатывали экстрактами *T. polium* и *R. crispus* в дозировке 50, 100 и 250 мкМ в присутствии ЦФ и в условиях его отсутствия. В результате ЦФ значительно снижал частоту МИ, при этом увеличивая в клетках частоту СХО, МЯ и ЯА. 100 мкМ *T. polium* в сочетании с ЦФ снижали частоту СХО по сравнению с использованием одного только ЦФ. Кроме того, частота МЯ была значительно снижена в комбинированных группах 100 мкМ *T. polium* в сочетании с ЦФ и 250 мкМ *R. crispus* с ЦФ. Наши результаты показывают, что эти растительные экстракты не являются генотоксичными и оказывают нормализующее действие при использовании в этих дозах.

✿ **Ключевые слова:** *Teucrium Polium*; *Rumex crispus*; циклофосфамид; генотоксичность; лимфоциты человека.

## PROTECTIVE EFFECT OF EXTRACTS OF *TEUCRIUM POLIUM* AND *RUMEX CRISPUS* AGAINST CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED GENOTOXIC DAMAGE IN HUMAN LYMPHOCYTES

© S. Yuksel<sup>1</sup>, S.K. Sezer<sup>1</sup>, E.L. Kurtoglu<sup>2</sup>, H.G. Bag<sup>1</sup><sup>1</sup> Inonu University, Malatya, Turkey;<sup>2</sup> Lokman Hekim University, Ankara, Turkey;

For citation: Yuksel S, Sezer SK, Kurtoglu EL, Bag HG.

Protective effect of extracts of *Teucrium polium* and *Rumex crispus* against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes.

*Ecological genetics*. 2019;17(2):93-100. <https://doi.org/10.17816/ecogen17293-100>.

Received: 07.11.2018

Revised: 05.04.2019

Accepted: 17.06.2019

✿ *Teucrium polium* (*T. polium*) and *Rumex crispus* (*R. crispus*) are plant species that grow widely in Anatolia and are thought to have healing effects for many diseases. In this study plant extracts are suggested as alternative agents in repairing cellular damage by using sister chromatid exchange (SCE), micronucleus (MN), mitotic index (MI), replication index (RI) and nuclear abnormalities (NAs), against the genotoxicity of cyclophosphamide (CP) in the human lymphocyte cells. 8 experimental groups were formed in the study. The cell culture medium was supplemented with 0.16 µg/ml CP and the cells were treated with 50, 100 and 250 µM *T. polium* and *R. crispus* extracts in the presence and absence of CP. As a result, CP significantly decreased MI frequency while increasing SCE, MN and NAs frequencies in cells. 100 µM *T. polium* plus CP decreased SCEs when compared with CP alone. In addition, MN frequency was significantly decreased in 100 µM *T. polium* plus CP and 250 µM *R. crispus* plus CP combine groups. Our results suggest that these plant extracts are not genetically damaging and have improving effects at these doses.

✿ **Keywords:** *Teucrium polium*; *Rumex crispus*; cyclophosphamide; genotoxicity; human lymphocytes.

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Растения являются наиболее важным источником натуральных лекарств, используемых в традиционных методах лечения. С точки зрения лекарственных и аро-

матических растений Турция является одной из самых богатых стран мира. Многие растения обладают фитохимическими, антиоксидантными и флавоноидными свойствами. В настоящее время экстракты расте-

ний предлагаются в качестве альтернативных средств для устранения клеточных и генетических повреждений [1–4].

Считается, что растения видов *Teucrium polium* (*T. polium*) и *Rumex crispus* (*R. crispus*) обладают целебным действием при лечении многих заболеваний у населения Анатолии [5]. Виды рода *Teucrium* принадлежат к семейству *Lamiaceae*, в котором насчитывается более 340 видов. В течение 2000 лет в северо-западной Азии и Средиземноморском регионе их использовали для лечения диабета, судорог и воспаления желудочно-кишечного тракта [6–8]. Milosevic-Djordjevic et al. [9] обнаружили методом ВЭЖХ, что полифенол в составе *T. polium* содержит фенольные кислоты (галлиевую, ванилиновую, кофейную, хлорогеновую, р-кумаровую, синаповую) и флавоноиды (катехин, рутин, мирицетин, лютеолин, кверцетин и апигенин). Сообщалось, что виды *Teucrium* способны восстанавливать повреждения ДНК путем стимуляции ферментов детоксикации и обладают антиоксидантным, противоопухолевым, гепатопротекторным, гипополипидемическим, гипогликемическим и антимикробным действием [6, 10, 11].

*Rumex* относится к семейству *Polygonaceae* и широко распространен в Западной и Северной Азии и Европе. Отмечалось, что виды *Rumex* обладают антиоксидантными и антимикробными свойствами [12, 13]. Корень, цветы, листья и стебли *R. crispus* использовали в медицине Азии для лечения боли, отеков, кровоизлияний, гельминтов, ран, внутренних кровотечений, заболеваний сосудов и дерматозов [14]. Недавние исследования показали, что фармацевтически *R. crispus* способен ингибировать пролиферацию, индуцировать апоптоз раковых клеток, поглощать свободные радикалы, подавлять рост микробов [15, 16].

Циклофосфан (ЦФ), который мы использовали в данном исследовании в качестве положительного контроля, алкилирующее химиотерапевтическое средство, широко используется в клинической практике в качестве химиотерапевтического средства и иммунодепрессанта благодаря его способности связываться с ДНК, вызывая разрывы хромосом и хроматид, сестринские хроматидные обмены. Эти одно- и двухцепочечные разрывы впоследствии преобразуются в фрагменты хромосом и, в итоге, в хромосомные аномалии, микроядра (МЯ) или сестринские хроматидные обмены (СХО) после одного деления клетки [17, 18]. СХО относится к обмену ДНК между продуктами репликации. Во время метафазно-анафазного перехода в митозе посредством различных механизмов образуется МЯ. Частоты ядерных аномалий (ЯА), отличных от микроядер, таких как двухъядерные клетки (ДЯ), пикноз (ПК), кариорексис (КР) и кариолиз (КЛ), указывают на очень позднюю стадию процесса гибели клеток [19]. Частота СХО и МЯ широко используют для цитогенетического исследования периферических лимфоцитов при опреде-

лении мутагенного действия лекарств и ксенобиотиков. Эти меры являются показателями воздействия генотоксических химических веществ и маркерами нестабильности генома и статуса пролиферации клеток.

Лекарственные растения традиционно использовались при лечении различных заболеваний, при этом не было знаний о воздействии на клетки человека и генетический материал. Благодаря естественному содержанию растительных экстрактов они считаются менее токсичными, чем синтетические аналоги [1]. Однако, многие исследования показали, что растительные экстракты, используемые в традиционной терапии, могут быть потенциально токсичными и мутагенными. Растительные экстракты могут быть потенциально токсичными, мутагенными и канцерогенными в зависимости от концентрации и продолжительности воздействия [1, 20]. Было проведено много исследований генотоксического или антигенотоксического действия других видов *Teucrium*. Но в настоящее время не опубликовано данных об индукции СХО, МЯ и кинетики клеточного цикла экстрактами *T. polium* и *R. crispus* при различных концентрациях. По этой причине мы протестировали экстракты *T. polium* и *R. crispus* в отношении ЦФ-индуцированной генотоксичности в культурах лимфоцитов человека. Мы также исследовали, обладают ли различные концентрации этих растительных лекарственных средств возможным генотоксическим/цитотоксическим потенциалом в соответствии с различными предельными значениями генотоксичности: СХО, МЯ, АЯ, кинетики роста клеток, в частности, МИ и ИР.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Химические вещества

Циклофосфамид (номер в реестре CAS6055-19-2), 5-бром-2-дезоксигуанидин (номер в реестре CAS59-14-3) и колхицин (номер в реестре CAS477-30-5) были приобретены у компании «Сигма Кемикалс» (Sigma Chemicals). Среда для кариотипирования периферической крови (01-201-1В) была приобретена у компании «Байолоджиал индастрис» (Biological Industries). Раствор красителя Гимза был приобретен у компании «Мерк» (Merck) (Индия).

### 2.2. Растительный материал

В мае–июне 2017 года в природных популяциях в восточной и юго-восточной Анатолии были собраны надземные части *T. Polium* и *R. crispus*. Специалиста по лечебным травам посоветовала местная администрация, а растения были идентифицированы и таксономически сгруппированы на фармацевтическом факультете Университета им. Инёню, Малатья, Турция. Собранный растительный материал в течение короткого периода времени сушили на воздухе в темноте при температуре окружающей среды. Высушенные растительные мате-

риалы разрезали и хранили в темных цветных контейнерах, как это требовалось для эксперимента.

### 2.3. Экстракция из растений

В настоящем исследовании нами были подготовлены неочищенные экстракты листьев *T. polium* и *R. crispus* в соответствии с традициями применения, поскольку традиционные лекарственные растения обычно используют в виде неочищенных экстрактов. Образцы *T. polium* и *R. crispus* были экстрагированы метанолом, поскольку он менее канцерогенный, чем другие растворители, а также благодаря широкому спектру фитохимических соединений, которые легко растворимы в метаноле. Высушенные надземные части 10 г листьев *T. polium* и *R. crispus* были приняты за метанольный экстракт. Метанольный экстракт мацерировали 100 мл растворителя в течение 24 часов. Мацерацию проводили 3 раза. Экстракты фильтровали через бумажный фильтр (Whatman № 1) и затем упаривали досуха в вакууме с применением роторного испарителя. Экстракты хранили в стерильных флаконах для образцов.

### 2.4. Протоколы проведения опытов

У двух здоровых мужчин и двух женщин-доноров, не курящих, в возрасте 20–25 лет, венопункцией была взята периферическая кровь. В исследовании было сформировано восемь экспериментальных групп. Образцы крови добавляли в 5 мл хромосомной среды В. В группе клетки обрабатывали 0,16 мкг/мл ЦФ в качестве положительного контроля.

Метанольный экстракт и *T. polium* и *R. crispus* добавляли в одинаковых трех концентрациях (50, 100 и 250 мкМ) по отдельности и совместно с ЦФ, обработанным культурами лимфоцитов за 72 ч до начала инкубации. Эти нетоксичные концентрации экстрактов определяли в ходе предварительного исследования цитотоксичности в отношении верхнего предела концентрации, что приводило к приблизительно 50 % ( $LD_{50}$ ) снижению МИ (250 мкМ). Для каждого эксперимента также был установлен необработанный контроль.

#### 2.4.1. Анализ СХО

Вкратце, 0,5 мл образцов гепаринизированной цельной крови доноров добавляли к 5 мл хромосомной среды В, дополненной 10 мкг/мл BrdUrd. Затем культуральные пробирки инкубировали при 37 °С в течение 72 часов с последующей обработкой 0,06 мкг/мл колхицином за 1 ч до прекращения культивирования для задержки митоза. Лимфоциты обрабатывали гипотонически в 0,075 М КС1 и фиксировали в смеси метанола и уксусной кислоты (3:1). Окрашивание высушенных на воздухе предметных стекол было модифицировано методом флуоресценции с применением метода Гимзы [21]. Предметные стекла облучали 30 Вт, 254 нм УФ-лампой

на расстоянии 15 см в буфере Соренсена, затем инкубировали 1 раз в SSC при 60 °С в течение 45–60 минут и окрашивали 5 % красителем Гимзы, приготовленным с буфером Соренсена. Предметные стекла были закодированы до оценки. Для оценки СХО были проанализированы 25 метафаз второго деления для каждого донора при 1000-кратном увеличении с использованием масляной иммерсионной линзы Olympus BH2. Учитывали частоту СХО на клетку.

#### 2.4.2. Микроядерный тест с блокировкой цитокинеза (МЯ) *in vitro* и анализ ядерных аномалий (ЯА)

Для учета МЯ использовали 0,5 мл свежей гепаринизированной крови для создания культур. Клетки обрабатывали 50, 100 и 250 мкМ экстрактов *T. polium* и *R. crispus* при 37 °С в течение 72 ч. В культуры добавляли цитохалазин В (6 мкг/мл) через 44 ч после начала инкубации для блокирования цитокинеза. Клетки собирали центрифугированием. Клетки обрабатывали холодным гипотоническим раствором (0,56 % КСЛ) и трижды раствором метанола и уксусной кислоты (3 : 1) для фиксации. Затем клетки помещали на предметные стекла и окрашивали 5 % красителем Гимзы.

Для анализа МЯ использовали световой микроскоп Olympus BH2 с 400-кратным увеличением на кодированных стеклах. У всех субъектов от каждого донора учитывали 1000 двухъядерных лимфоцитов (4000 двухъядерных клеток определяли в расчете на концентрацию). Дегенеративные ядерные изменения, такие как ДЯ (двухъядерные клетки), ПК (конденсация ядерного материала), КЛ (растворение ядра) и КР (ядерный распад), анализировали в двухъядерных лимфоцитах на стеклах. МЯ и другие ядерные аномалии были классифицированы в соответствии с Tolbert et al. [19] МЯ должны удовлетворять следующим условиям: а) состоять из ядерного материала; б) быть полностью отделенным от материнского ядра; в) быть менее  $1/3$  диаметра соответствующих ядер; г) иметь гладкую овальную или круглую форму; д) находиться в той же плоскости фокуса и е) быть того же цвета, текстуры и преломления, что и основное ядро.

#### 2.4.3. Кинетика клеточного цикла

МИ объясняет влияние химических веществ на стадию G2 клеточного цикла, а ИР отражает влияние химических веществ на стадии циклов S и G2. Клетки, подвергшиеся первому ( $M_1$ ), второму ( $M_2$ ) и третьему ( $M_3$ ) метафазному делению, были выявлены методом BrdU-Harlequin для дифференциального окрашивания метафазных хромосом. ИР рассчитывали по следующей формуле:

$$ИР = (1 \cdot M_1) + (2 \cdot M_2) + (3 \cdot M_3) / \text{общее количество клеток.}$$

$M_1$ ,  $M_2$  и  $M_3$  представляют собой первый, второй и третий митоз в период культивирования клеток.

Для определения ИР оценивалось в общей сложности 100 клеток на донора. МИ также определяли путем подсчета 3000 клеток от каждого донора.

### 2.5. Статистический анализ

Нормальность данных оценивалась посредством теста Шапиро – Уилка. Для нормально распределенных данных оценивали среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Однородность дисперсий групп проверялась по критерию Левина. Поскольку дисперсии групп оказались неоднородными, для сравнения групп использовался поправка Уэлча и апостериорный критерий Тамхана T2. Когда наблюдений в группах были меньше 10, в качестве описательной статистики использовались медиана, минимальное и максимальное значения. Сравнения по этим переменным проводились с использованием критерия Крускала – Уоллиса и метода парного сравнения Коновера. Во всех анализах уровень значимости принимался равным 0,05.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение частоты обработки различными концентрациями СХО, МИ и ИР в группах представлено в табл. 1. В данном эксперименте ЦФ значительно снижал частоту ИР и МИ при увеличении СХО на лимфоцитах здорового человека. Экстракты *T. polium* и *R. crispus* не изменяли средние значения СХО (за исключением концентрации *R. crispus* 250 мкМ), МИ (за исключением концентрации *T. polium* 250 мкМ) и ИР для всех концентраций по сравнению с необработанным контролем. Однако экстракты *T. polium* и *R. crispus* и ЦФ в виде смеси продемонстрировали синергетический эффект при увеличении СХО, за исключением концентрации 100 мкМ *T. polium* в сочетании с ЦФ. Кроме того, при концентрации 100 мкМ *T. polium* и *R. crispus* в сочетании с ЦФ частота МИ была выше, чем в группе только ЦФ. Аналогичным образом, концентрация 50 мкМ и 100 мкМ объединенных групп *R. crispus* с ЦФ продемонстрировала защитное действие для ИР (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение частот СХО, МИ и ИР в культивируемых лимфоцитах человека обработанных различными концентрациями, *T. polium*, *R. crispus* и циклофосфамидом

Группа	СХО (Mean $\pm$ SD)	МИ Медиана (Min–Max)	ИР Медиана (Min–Max)
А Контроль	6,79 $\pm$ 2,15 <sup>B, F, G, H, K, L, M, N</sup>	3,33 (3,17–3,99) <sup>B, E, F, G, H, L, N</sup>	2,45 (2,32–2,51) <sup>B, F, G, H, L, M, N</sup>
В Циклофосфамид (ЦФ)	42,74 $\pm$ 10,33 <sup>A, C, D, E, G, I, J, K</sup>	1,75 (1,72–1,86) <sup>A, C, D, E, G, I, J, K, M</sup>	1,59 (1,54–1,78) <sup>A, C, D, E, I, J, K, L, M</sup>
<i>T. polium</i>			
С 50 мкМ	6,68 $\pm$ 1,77 <sup>B, F</sup>	3,49 (2,93–3,68) <sup>B, E, F</sup>	2,38 (2,26–2,58) <sup>B, F</sup>
Д 100 мкМ	8,53 $\pm$ 1,98 <sup>B, G</sup>	3,39 (2,96–3,48) <sup>B, E, G</sup>	2,32 (2,17–2,45) <sup>B, G</sup>
Е 250 мкМ	9,53 $\pm$ 2,76 <sup>B, H</sup>	2,88 (2,85–2,93) <sup>A, B, C, D</sup>	2,23 (2,09–2,41) <sup>B, H</sup>
<i>T. polium</i> + CP			
Ф 50 мкМ	35,58 $\pm$ 4,31 <sup>A, C, G</sup>	2,54 (2,39–2,66) <sup>A, C</sup>	1,94 (1,58–2,25) <sup>A, C</sup>
Г 100 мкМ	27,58 $\pm$ 7,80 <sup>A, B, D, F</sup>	2,58 (2,06–3,05) <sup>A, B, D</sup>	1,92 (1,64–2,15) <sup>A, D</sup>
Н 250 мкМ	33,21 $\pm$ 4,57 <sup>A, E</sup>	2,42 (2,18–2,71) <sup>A</sup>	1,94 (1,71–2,14) <sup>A, E</sup>
<i>R. crispus</i>			
И 50 мкМ	7,63 $\pm$ 2,50 <sup>B, L</sup>	3,34 (2,82–3,53) <sup>B, L</sup>	2,34 (2,25–2,44) <sup>B, L</sup>
Ж 100 мкМ	8,53 $\pm$ 2,46 <sup>B, M</sup>	3,1 (2,74–3,48) <sup>B</sup>	2,37 (1,97–2,57) <sup>B, M</sup>
К 250 мкМ	9,84 $\pm$ 2,54 <sup>A, B, M, N</sup>	3,08 (2,96–3,62) <sup>B, N</sup>	2,26 (1,97–2,57) <sup>B</sup>
<i>R. crispus</i> + CP			
Л 50 мкМ	35,32 $\pm$ 6,00 <sup>A, I</sup>	2,38 (1,85–3,02) <sup>A, I</sup>	2,06 (1,77–2,26) <sup>A, B, I</sup>
М 100 мкМ	33,53 $\pm$ 4,99 <sup>A, J, K</sup>	2,65 (1,85–3,17) <sup>B</sup>	2,02 (1,87–2,27) <sup>A, B, J</sup>
Н 250 мкМ	34,32 $\pm$ 4,82 <sup>A, K</sup>	2,36 (1,65–3,12) <sup>A, K</sup>	1,86 (1,67–2,29) <sup>A</sup>
<i>p</i> , значение	<0,001	<0,001	0,001

Примечание. Буквы в столбце обозначают группы для парных сравнений. Надстрочные буквы представляют статистически значимое различие между группами. Всего для анализа СХО было оценено 50 клеток; для ИР оценивалось 200 клеток, а для МИ — 3000 клеток.

Таблица 2

Сравнение частоты МЯ и ядерных аномалий при различных концентрациях обработки в культивируемых лимфоцитах человека, обработанных *T. polium*, *R. crispus* и циклофосфамидом

Группы	МЯ Медиана (Min–Max)	ДЯ клетки Медиана (Min–Max)	МЯ клетки Медиана (Min–Max)	Пикноз Медиана (Min–Max)	Кариолиз Медиана (Min–Max)	Кариорексис Медиана (Min–Max)
А Контроль	4 (2–6) <sup>B,G,H,L,M,N</sup>	21 (18–25) <sup>F,G,H,L</sup>	979 (975–982) <sup>F,G,H,L</sup>	2 (0–4) <sup>B</sup>	1,5 (0–4) <sup>B,G,H</sup>	0,5 (0–1) <sup>B,F,G,H,L</sup>
В Циклофосфамид (ЦФ)	15 (11–16) <sup>A,C,D,E,F,G,I,J,K,N</sup>	22,5 (10–37) <sup>C,F</sup>	977,5 (963–990) <sup>C,F</sup>	4,5 (3–6) <sup>A,C,D,E,F,I,J,K,M,N</sup>	4 (2–5) <sup>A,C,D,I,J,K,M</sup>	2,5 (1–5) <sup>A,C,K,M</sup>
<i>T. polium</i>						
С 50 мкМ	4 (2–5) <sup>B</sup>	15 (12–21) <sup>B,D,E,F</sup>	985 (979–988) <sup>B,D,E,F</sup>	2 (1–3) <sup>B</sup>	1,5 (0–4) <sup>B</sup>	1 (0–2) <sup>B,F</sup>
Д 100 мкМ	4,5 (2–9) <sup>B</sup>	24 (16–31) <sup>C</sup>	976 (969–984) <sup>C</sup>	0,5 (0–2) <sup>B,G</sup>	1 (1–1) <sup>B,G</sup>	1 (0–3) <sup>G</sup>
Е 250 мкМ	5 (2–8) <sup>B,H</sup>	26 (24–29) <sup>C,K</sup>	974 (971–976) <sup>C,K</sup>	2 (1–3) <sup>B</sup>	2 (1–3) <sup>H</sup>	1,5 (1–2) <sup>H</sup>
<i>T. polium</i> + CP						
Ф 50 мкМ	4 (3–7) <sup>B,G,H,L</sup>	30,0 (28–32) <sup>A,B,C</sup>	970 (968–972) <sup>A,B,C</sup>	2 (2–3) <sup>B</sup>	3 (1–5)	3 (2–5) <sup>A,C</sup>
Г 100 мкМ	7,5 (6–9) <sup>A,B,F</sup>	28,5 (27–31) <sup>A</sup>	971,5 (969–973) <sup>A</sup>	2 (2–4) <sup>D</sup>	4 (3–7) <sup>A,D,M</sup>	3 (2–3) <sup>A,D,M</sup>
Н 250 мкМ	10,0 (8–11) <sup>A,E,F</sup>	29,5 (26–34) <sup>A,N</sup>	970,5 (966–974) <sup>A,N</sup>	2,5 (2–3)	4 (3–6) <sup>A,E,N</sup>	4,5 (4–5) <sup>A,E,N</sup>
<i>R. crispus</i>						
И 50 мкМ	5,5 (4–8) <sup>B</sup>	24 (21–26) <sup>L</sup>	976 (974–979) <sup>L</sup>	2 (1–2) <sup>B</sup>	1 (0–1) <sup>B,L</sup>	1 (0–3)
Ж 100 мкМ	6,5 (4–9) <sup>B</sup>	24,5 (23–26)	975,5 (974–977)	1 (0–2) <sup>B,M</sup>	1 (0–2) <sup>B</sup>	1,5 (1–2)
К 250 мкМ	5,5 (4–6) <sup>B</sup>	18,5 (15–22) <sup>E</sup>	981,5 (978–985) <sup>E</sup>	1 (1–2) <sup>B</sup>	1,5 (1–3) <sup>B</sup>	1 (0–1) <sup>B</sup>
<i>R. crispus</i> + CP						
Л 50 мкМ	8 (7–9) <sup>A,F</sup>	29,5 (28–32) <sup>A,I,N</sup>	970,5 (968–972) <sup>A,N,I</sup>	2,5 (2–3)	2,5 (2–3) <sup>I</sup>	1,5 (1–3) <sup>A</sup>
М 100 мкМ	9 (6–11) <sup>A</sup>	25,5 (25–27) <sup>N</sup>	974,5 (973–975) <sup>N</sup>	2 (2–3) <sup>B,J</sup>	1,5 (1–2) <sup>B,G</sup>	1 (0–2) <sup>B,G</sup>
Н 250 мкМ	7,5 (6–9) <sup>A,B</sup>	19 (16–22) <sup>H,L,M</sup>	981 (978–984) <sup>H,L,M</sup>	2 (1–2) <sup>B</sup>	2 (0–5) <sup>H</sup>	1,5 (1–2) <sup>H</sup>
<i>p</i> , значение	0,001	0,002	0,002	0,022	0,007	0,003

Примечание. Буквы в столбце обозначают группы для парных сравнений. Надстрочные буквы демонстрируют статистически значимые различия между группами. Всего для анализа СХО учитывали 50 клеток; для ИР — 200 клеток, а для МИ — 3000 клеток.

В табл. 2 приведены различия по частоте МЯ и ядерным аномалиям между контрольной и экспериментальной группами. Когда мы сравнили МЯ и дегенеративные ядерные изменения между различными концентрациями внутри групп, были выявлены статистически значимые различия. Частота МЯ была значительно снижена в группе ЦФ и во всех объединенных группах с ЦФ (кроме 50 мкМ *T. polium* плюс ЦФ). Кроме того, частота МЯ в комбинированных группах 100 мкМ *T. polium* и 250 мкМ *R. crispus* в виде смеси снизилась по сравнению с положительным контролем ЦФ. При сравнении частоты ДЯ, КЛ и КР в различных концентрационных обработках внутри групп, было обнаружено, что; среди всех концентраций растительных экстрактов параметры аномалии ядра были в пределах нормальных значений, в объединенных группах концентрации *R. crispus* 50 мкМ и 100 мкМ был выявлен эффект снижения при данной структуре патологии.

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Большим количеством авторов было предложено использовать лекарственные растения в качестве антимутагенных средств для профилактики генотоксических эффектов различных химиотерапевтических средств [22–24].

Однако, насколько нам известно, определение защитного действия экстрактов *T. polium* и *R. crispus* в сочетании с любым известным мутагенным веществом не было изучено. Молекулярные механизмы, стоящие за геномной стабильностью этих растений, канцерогенная или антиканцерогенная роль до сих пор не совсем понятны. По этой причине мы провели данное исследование для выяснения безопасности и генотоксичности/антигенотоксичности экстрактов этих трав в культивируемых лимфоцитах периферической крови человека, определяемых посредством учета СХО, МИ, ИР, МЯ и АЯ.

Нами было выявлено, что частота СХО и МЯ была значительно увеличена в группе ЦФ. Эти результаты подтвердили ранее заявленный кластогенный и генотоксический эффект ЦФ. Химиотерапевтические средства, такие как ЦФ, токсичны, и многие из них являются мутагенными. Генотоксичность, опосредованная циклофосфамидом, может вызывать индукцию повреждений микротрубочек или ДНК-реактивных интермедиатов, либо эндогенных мутагенных агентов [23, 25]. Генотоксичные вещества вызывают повреждение в клетках посредством взаимодействия с ДНК и могут привести, в том числе к одно- и двухцепочечным разрывам, перекрестным сшивкам между

основаниями ДНК и белками и химическим включением в ДНК. Возникновение геномного повреждения, в случае если оно не репарируется, может привести к образованию аддуктов ДНК, хромосомным/хроматидным разрывам или анеуплоидии и связано с образованием микроядер (МЯ), сестринских хроматидных обменов (СХО) и общей геномной нестабильностью [17, 26]. Это может стать причиной образования СХО и МЯ в клетках лимфоцитов после лечения ЦФ. МЯ являются индикатором геномной нестабильности и цитогенетического повреждения в делирующихся клетках. Для изучения генотоксического потенциала ЦФ использовали различные экспериментальные системы и, как сообщалось, были выявлены структурные хромосомные aberrации, повышенная частота СХО и МН в культивируемых клетках [18, 27].

В данном исследовании наблюдаемая высокая частота образований МЯ, СХО и ядерных аномалий в клетках лимфоцитов подтвердила кластогенный потенциал ЦФ. Напротив, возможно, благодаря своему антиоксидантному действию, экстракты *T. polium* и *R. crispus* оказывали защитное и антигенотоксическое действие при повреждении ДНК. Экстракты *T. polium* и *R. crispus* не проявляли какого-либо генотоксического эффекта для исследуемых параметров при всех концентрациях. В объединенных группах экстракты растений проявляли частичное защитное действие. Для СХО умеренная доза *T. polium* и для МЯ умеренная доза *T. polium* и самая высокая доза *R. crispus* снижали генотоксический эффект ЦФ. Результаты нашего исследования четко указывают на защитные свойства метанольных экстрактов *T. polium* и *R. crispus* в отношении генотоксического действия ЦФ в зависимости от дозы.

Кверцетин-3-О- $\beta$ -D-глюкуронопиранозид (КГК), обладающий антиоксидантным, противоопухолевым и противовоспалительным действием *in vivo*, является наиболее важным флавоноидным гликозидом, выделенным из видов *Teucrium* и *Rumex* [7, 9, 28, 29]. Антимутагенное и противоопухолевое действие *T. polium* были протестированы в системе млекопитающих, и отмечалось, что этот растительный экстракт уменьшает частоту СХО и хромосомных аномалий [24]. В 2010 году Tere et al. изучили антиоксидантную и защитную активность *T. polium* в отношении ДНК и сообщали, что *T. polium* богат фенолом и флавоноидами и может использоваться в качестве альтернативы источникам синтетических антиоксидантов [30]. В другом исследовании говорилось, что метанольные экстракты *T. polium* применяли в сочетании с противоопухолевыми препаратами (цисплатин, винкристин, винбластин и доксорубицин) в отношении линии раковых клеток, и было показано, что для противоопухолевой терапии экстракт был потенциально безопасным и эффективным в качестве хемосенсибилизатора [10]. Что касается лечения рака, чтобы определить потенциальное противоопухолевое действие *T. polium*, в ходе всех этих исследований *in vitro* была показана важность экспериментов на животных и клинических испытаний. *T. polium* содержит пять фенольных

кислот и шесть флавоноидов, наиболее важных терапевтических полифенольных соединений [9, 31]. В нашем исследовании было выявлено, что умеренные и высокие концентрации экстрактов растений обладают защитным эффектом во многих тестах на генотоксичность. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что мутагенная/антимутагенная или прооксидантная/антиоксидантная активность в значительной степени зависят от используемой концентрации лекарственных растений [8, 9, 31, 32].

Исследования противораковых, антиоксидантных свойств *R. crispus*, а также способности утилизации свободных радикалов, интенсивно проводили на моделях *in vitro* [12, 13, 16, 33], однако информации о потенциальных генотоксических или антигенотоксических эффектах этого растения нет. Shiwani et al. в 2012 году исследовали метанольные экстракты корня *R. crispus*, способствующие выведению свободных радикалов и обладающие способностью защиты ДНК и белков. В результате было выявлено, что *R. crispus* ингибировал повреждение ДНК в клетках HT29. Однако они указали, что для того, чтобы определить точные компоненты *R. crispus*, ответственные за эту биологическую активность, для детального химического анализа следует использовать передовые технологии [16]. Yildirim et al. отмечали, что экстракты горячей воды семян и листьев *R. crispus* L. обладают наивысшей антиоксидантной активностью [12].

В настоящем исследовании чувствительность МЯ повышается при регистрации дегенеративных ядерных изменений, таких как клетки ПК, КР, КЛ и ДЯ в дополнение к МЯ. Для определения возможного цитотоксического/антицитотоксического действия ЦФ отдельно, а также в сочетании с обработкой этими растительными экстрактами, а также для контроля, мы проанализировали МИ, ИР и АЯ для каждой экспериментальной концентрации. Результаты показали, что ЦФ вызывает значительные отклонения частоты МИ, ИР, а также увеличение значений АЯ по отношению к контролю. Данные параметров кинетики клеточного цикла растительных экстрактов не были значительными по сравнению с контролем. Кроме того, при разных концентрациях смеси растительных экстрактов с ЦФ в группах наблюдали цитопротективное действие на частоту МИ, ИР и АЯ. Ядерные аномалии отражают прогрессирующую хромосомную и геномную нестабильность. Структурные ядерные аномалии или потеря ядерных материалов вызывают аномалии ядра, такие как двухъядерные клетки, ПК, КР, КЛ или МЯ [19]. В нашем исследовании умеренная концентрация *R. crispus* с ЦФ снижала частоту АЯ на фоне цитотоксичности ЦФ.

Эти ситуации ограничивали проведение данного исследования. Защитные действия метанольных экстрактов *T. polium* и *R. crispus* в отношении ЦФ-индуцированного генетического повреждения в культивируемых лимфоцитах периферической крови человека могут быть объяснены ограниченной концентрацией обработки и коротким сроком данного исследования. Известно, что длительное

использование таких растений может быть вредным из-за их цитотоксических и генотоксических составляющих.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время растительные экстракты используются в качестве альтернативных химиопрофилактических медицинских средств и получили широкое распространение во всем мире, однако, молекулярные механизмы, стоящие за генотоксическим или антигенотоксическим действием этих растений, до сих пор не до конца изучены. Насколько нам известно, это первое исследование защитных эффектов метанольных экстрактов *T. polium* и *R. crispus* в отношении ЦФ-индуцированного генетического повреждения в культивируемых лимфоцитах периферической крови человека. Вместе с полученными результатами можно сказать, что ЦФ достаточно эффективен в индукции генетического повреждения, а кинетика роста клеток и экстракты *T. polium* и *R. crispus* обладают нормализующими свойствами при генетических повреждениях при использовании данных экспериментальных дозировок. Ожидается, что этот результат будет подтвержден аналогичными или более расширенными исследованиями.

### Благодарности

Мы благодарим доктора Туран Арабачи из фармацевтического факультета университета Ишмета Инону за идентификацию растений и экстракцию из них.

### Вклад авторов:

SY — проведение исследования и написание рукописи. SY, SKS, ELK — культивирование клеток и анализ цитогенетических параметров. HBG — проведение статистического анализа.

Автор SY заявляет об отсутствии конфликта интересов. Автор SKS об отсутствии конфликта интересов. Автор ELK заявляет об отсутствии конфликта интересов. Автор HBG заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Одобрение Этического комитета: настоящая статья не включает исследования с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов.

Финансирование: данное исследование проводилось с использованием лабораторного оборудования; поддержки со стороны какого-либо фонда не было.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Celik TA. Potential Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plant Extracts. *IntechOpen*. 2012. <https://doi.org/10.5772/28488>.
2. Ozkan G, Kamiloglu S, Ozdal T, et al. Potential Use of Turkish Medicinal Plants in the Treatment of Various Diseases. *Molecules*. 2016;21(3):257. <https://doi.org/10.3390/molecules21030257>.
3. Gontijo VS, Dos Santos MH, Viegas C, Jr. Biological and Chemical Aspects of Natural Biflavonoids from Plants: A Brief Review. *Mini Rev Med Chem*. 2017;17(10):834-862. <https://doi.org/10.2174/1389557517666161104130026>.
4. Bozkurt-Guzel C, Serbetci T, Kultur S. Cytotoxic activities of some Turkish medicinal plants against HeLa cells *in vitro*. *Indian J Traditional Knowledge*. 2018;17(1):43-49.
5. Dinç M, Doğu S, Bilgili B, Duran A. Comparative anatomical and micromorphological studies on *Teucrium creticum* and *Teucrium orientale* var. *orientale* (*T. sect. Teucrium*, Lamiaceae). *Nord J Bot*. 2009;27(3):251-256. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2008.00323.x>.
6. Hasani P, Yasa N, Vosough-Ghanbari S, et al. *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to  $\alpha$ -tocopherol. *Acta Pharm*. 2007;57(1):123-129. <https://doi.org/10.2478/v10007-007-0010-z>.
7. Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*. 2009;112(4):885-888. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.064>.
8. Bahramikia S, Yazdanparast R. Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytother Res*. 2012;26(11):1581-1593. <https://doi.org/10.1002/ptr.4617>.
9. Milosevic-Djordjevic O, Radovic Jakovljevic M, Markovic A, et al. Polyphenolic contents of *Teucrium polium* L. and *Teucrium scordium* L. associated with their protective effects against MMC-induced chromosomal damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Turk J Biol*. 2018;42(2):152-62. <https://doi.org/10.3906/biy-1707-36>.
10. Rajabalian S. Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. *Exp Oncol*. 2008;30(2):133-138.
11. Sghaier MB, Ismail MB, Bouhleb I, et al. Leaf extracts from *Teucrium ramosissimum* protect against DNA damage in human lymphoblast cell K562 and enhance antioxidant, antigenotoxic and antiproliferative activity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;44:44-52. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.04.006>.
12. Yıldırım A, Mavi A, Kara AA. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J Agric Food Chem*. 2001;49(8):4083-4089. <https://doi.org/10.1021/jf10103572>.
13. Idris OA, Wintola OA, Afolayan AJ. Phytochemical and antioxidant activities of *Rumex crispus* L. in treatment of gastrointestinal helminths in Eastern Cape Province, South Africa. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2017;7(12):1071-8. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.008>.
14. Shim KS, Lee B, Ma JY. Water extract of *Rumex crispus* prevents bone loss by inhibiting osteoclastogenesis and inducing osteoblast mineralization. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):483. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1986-7>.
15. Coruh I, Gormez A, Ercisli S, Sengul M. Total Phenolic Content, Antioxidant, and Antibacte-

- rial Activity of *Rumex crispus* Grown Wild in Turkey. *Pharm Biol.* 2008;46(9):634-638. <https://doi.org/10.1080/13880200802182240>.
16. Shiwani S, Singh NK, Wang MH. Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutr Res Pract.* 2012;6(5):389-395. <https://doi.org/10.4162/nrp.2012.6.5.389>.
  17. Uren N, Yuksel S, Onal Y. Genotoxic effects of sulfur dioxide in human lymphocytes. *Toxicol Ind Health.* 2014;30(4):311-315. <https://doi.org/10.1177/0748233712457441>.
  18. Yuksel S, Tasdemir S, Korkmaz S. Protective effect of thymoquinone against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes. *Bratisl Lek Listy.* 2017;118(4):208-211. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2017\\_041](https://doi.org/10.4149/BLL_2017_041).
  19. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69-77. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90033-i](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90033-i).
  20. AL-Dulaimi, DW, Faisal SF, Baharetha HM, et al. Cytogenetic an experimental monitoring test for plant extracts. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2017;12(1):100-105.
  21. Speit G, Haupter S. On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Hum Genet.* 1985;70(2). <https://doi.org/10.1007/bf00273070>.
  22. Yuksel S, Yesilada E, Gulbay G, et al. Protective effect of myricetin against estradiol-17 $\beta$ -induced genotoxic damage in human lymphocytes. *Fresenius Environmental Bulletin.* 2012;21(4):1022-1026.
  23. Zulkupli IN, David SR, Rajabalaya R, Idris A. Medicinal Plants: A Potential Source of Compounds for Targeting Cell Division. *Drug Target Insights.* 2015;9:9-19. <https://doi.org/10.4137/DTI.S24946>.
  24. Rahmouni F, Saoudi M, Amri N, et al. Protective effect of *Teucrium polium* on carbon tetrachloride induced genotoxicity and oxidative stress in rats. *Arch Physiol Biochem.* 2018;124(1):1-9. <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1347795>.
  25. Zhang J, Tian Q, Zhou S-F. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Curr Drug Ther.* 2006;1(1): 55-84. <https://doi.org/10.2174/157488506775268515>.
  26. Kurtoglu EL, Yuksel S. Genotoxic effects of tacrolimus on human lymphocyte cells. *Russian Journal of Genetics.* 2012;48(6):651-655. <https://doi.org/10.1134/s1022795412050134>.
  27. Kocaman AY, Istifli ES, Buyukleyla M, et al. *In vitro* evaluation of the protective effects of 4-thujanol against mitomycin-C and cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human peripheral lymphocytes. *Toxicol Ind Health.* 2013;29(1):23-37. <https://doi.org/10.1177/0748233712436640>.
  28. Cho EJ, Um SI, Han JH, et al. The cytoprotective effect of *Rumex Aquaticus* Herba extract against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in AGS cells. *Arch Pharm Res.* 2016;39(12):1739-1747. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0863-0>.
  29. Wang Q, Wang Y, Xing Y, et al. Physcion 8-O-beta-glucopyranoside induces apoptosis, suppresses invasion and inhibits epithelial to mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:372-380. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.045>.
  30. Tepe B, Degerli S, Arslan S, et al. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia.* 2011;82(2):237-46. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.10.006>.
  31. Ozer Z, Kiliç T, Çarıkçı S, et al. Investigation of phenolic compounds and antioxidant activity of *Teucrium polium* L. decoction and infusion. *J BAUN Inst Sci Technol.* 2018;20(1):212-218. <https://doi.org/10.25092/baunifed.370594>.
  32. Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, et al. Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity *in vitro*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006;3(3):329-338. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel028>.
  33. Wegiera M, Smolarz HD, Bogucka-Kocka A. *Rumex* L. species induce apoptosis in 1301, EOL-1 and H-9 cell lines. *Acta Pol Pharm.* 2012;69(3):487-499.

✉ Информация об авторах

**Сенгул Юксель** — факультет медицины, кафедра медицинской биологии и генетики. Университет Ишмета Инону, Малатья, Турция. E-mail: sengul.yuksel@inonu.edu.tr.

**Сельцен Корммаз Сежер** — факультет медицины, кафедра медицинской биологии и генетики. Университет Ишмета Инону, Малатья, Турция. E-mail: selcenkorkmaz@hotmail.com.

**Ельцин Латиф Куртоглу** — факультет медицины, кафедра медицинской биологии. Университет Локмана Хекима, Анкара, Турция. E-mail: elcinkurtoglu@hotmail.com.

**Харика Гозукара Бэг** — факультет медицины, кафедра биостатистики и медицинской информатики. Университет Ишмета Инону, Малатья, Турция. E-mail: harika.gozukara@inonu.edu.tr.

✉ Information about the authors

**Sengul Yuksel** — Medical Faculty, Department of Medical Biology & Genetics. Inonu University, Malatya, Turkey. E-mail: sengul.yuksel@inonu.edu.tr.

**Selcen Korkmaz Sezer** — Medical Faculty, Department of Medical Biology & Genetics. Inonu University, Malatya, Turkey. E-mail: selcenkorkmaz@hotmail.com.

**Elcin Latife Kurtoglu** — Medical Faculty, Department of Medical Biology. Lokman Hekim University, Ankara, Turkey. E-mail: elcinkurtoglu@hotmail.com.

**Harika Gozukara Bag** — Medical Faculty, Department of Biostatistics and Medical Informatics. Inonu University, Malatya, Turkey. E-mail: harika.gozukara@inonu.edu.tr.