

БИОКОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ МЕМБРАНОАКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ БАВ

Юркова И.Н. ©

Старший научный сотрудник, кандидат технических наук,
НИЦ экспериментальной физиологии и биотехнологий, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

Аннотация

Статья посвящена исследованию тестирования мембраноактивного действия БАВ различного происхождения биокондуктометрическим методом по относительному изменению электропроводности дисперсионной среды после экспозиции в ней биомассы. Тест-метод может быть использован для экспресс-скрининга новых лекарственных препаратов и сточных вод.

Ключевые слова: биотестирование, биокондуктометрия, БАВ, мембраноактивное действие.
Keywords: biotesting, bioconductometers, BAS, membranotropic action.

Введение

В настоящее время применяется большое количество химических соединений, многие из которых попадают в окружающую среду. Все эти вещества обладают биологической активностью. Оценка действия БАВ лишь на основании результатов химических и физико-химических методов анализа не всегда достаточна. Для водных сред, содержащих токсичные вещества, это приводит к неправильной оценке экологической опасности.

В биологических методах анализа водных растворов БАВ используют различные тест-объекты [1-4]. Использование с этой целью суспензионных культур клеток (в том числе, бактерий и микроводорослей) имеет преимущества, связанные с получением интегрального результата, производимого большим количеством клеток. Большинство известных методов тестирования имеют те или иные недостатки, поэтому поиск новых тест-методов действия БАВ является актуальной задачей.

Влияние БАВ на клетку прежде всего сказывается на изменении проницаемости клеточных мембран. Это приводит к нарушению концентрационных градиентов и выходу электролитов из клетки [5]. Следствием этого является изменение электропроводности окружающей среды.

Целью работы было исследование возможности тестирования биокондуктометрическим методом мембраноактивного действия биологически-активных веществ различного происхождения.

Объекты и методы исследования

Тест-объектом для определения биологической активности водных растворов служила зеленую микроводоросль *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3. Альгологически чистую культуру выращивали в люминостате при круглосуточном освещении лампами ЛД-20 в накопительном режиме при 36-38 °С на питательной среде Тамия [6] в течение 6 суток (конец экспоненциальной фазы роста).

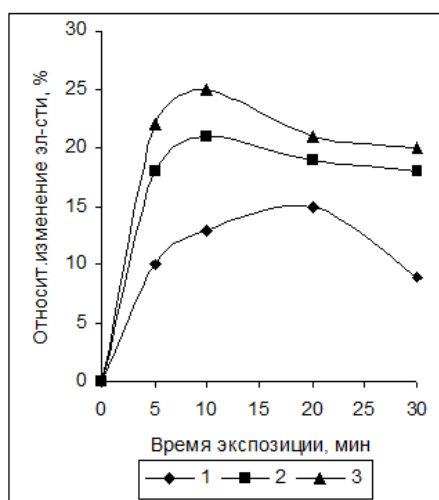
В качестве тестируемых биологически активных веществ использовали растворы фармакологических препаратов дибазола и папаверина в концентрации 10^{-6} - 10^{-3} М, а также водные экстракты лекарственных растений: цикламена Кузнецова, боярышника Поярковой и плюща обыкновенного. Концентрацию БАВ в биомассе определяли по количеству растительного материала, использованного для экстракции, в г сухого вещества на 1 дм³.

Для проведения кондуктометрического теста суспензию клеток микроводорослей отделяли от культуральной среды, экспонировали в тестируемых растворах, а затем ресуспендировали в слабо проводящей дисперсионной среды заданного состава, электропроводность K_0 которой предварительно фиксировали [7]. Концентрация биомассы составляла 1 г а.с.в./дм³. Из общего объема суспензии через определенные промежутки времени отбирали пробы и определяли в фильтрате электропроводность K_1 . Относительное изменение электропроводности среды $\Delta K/K_0$, где $\Delta K = K_1 - K_0$, после контакта с клетками соответствовало результату тестирования. Электропроводность растворов измеряли с помощью моста переменного тока Р-577 и ячейки со строго фиксированным расстоянием между электродами и фиксированным положением электродов в ячейке.

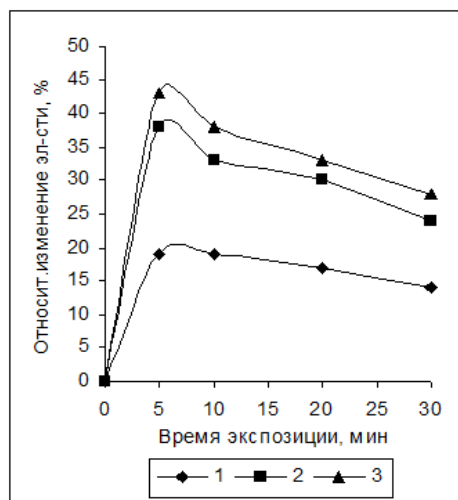
Результаты и обсуждение

Как видно из результатов, приведенных на рис. 1, исследованные нейротропные препараты дибазол и папаверин вызвали значительные изменения интегральной проницаемости клеточной мембраны тест-объекта, определяемые по относительному изменению электропроводности дисперсионной среды после экспозиции в ней биомассы, обработанной тестируемыми растворами. По сравнению с дибазолом папаверин оказывал более выраженное мембраноактивное действие.

При определении пороговых концентраций исследованных препаратов учитывалось относительное изменение электропроводности, превышающее 10% (экспериментально показано, что относительная погрешность метода составляла 4-6%). Для дибазола и папаверина пороговые концентрации соответствовали 10^{-5} М (величина эффекта 10-20%). Эти величины были на порядок ниже определенных электроальгологическим методом на клетках харовых водорослей [3]. В зависимости от времени, необходимого для достижения необратимости связывания молекул БАВ с поверхностными клеточными структурами, биологическая реакция клеток на БАВ может быть как необратимой, так и обратимой. Поэтому при исследовании действия БАВ наряду с определением величины эффекта (в данном случае мембраноактивного), пороговых концентраций и кинетики развития реакции большое значение имеет степень обратимости взаимодействия, о которой в наших экспериментах можно судить по изменению зависимости относительной электропроводности дисперсионной среды от времени экспозиции тест-объекта (кинетические кривые) после достижения максимальных значений (5-10 минут). Обратимое взаимодействие БАВ с компонентами клеточной мембраны отмечалось при низких концентрациях дибазола – 10^{-5} М (рис. 1, а, кривая 3), а у папаверина в концентрации 10^{-5} М (рис. 1, б, кривая 3) оно было менее выражено, что объясняется большим временем контакта с БАВ (30 минут), необходимым для достижения максимального эффекта.



а)



б)

Рис.1. Влияние дибазола (а) и папаверина (б) на относительное изменение электропроводности дисперсионной среды. Экспозиция биомассы в растворах дибазола – 10 минут, папаверина – 30 минут (максимальный эффект). Концентрации растворов: 1 - 10^{-5} М, 2 – 10^{-4} М, 3 – 10^{-3} М.

При всех исследованных концентрациях дибазола и папаверина максимальное мембраноактивное действие наблюдалось при экспозиции биомассы в дисперсионной среде в течение 5-10 минут. Поэтому при быстром скрининге большого количества тестируемых образцов достаточно 10-минутной экспозиции.

При сравнении зависимости мембраноактивного действия различных растительных экстрактов от концентрации биомассы видно, что максимальный эффект наблюдался после контакта биомассы тест-объекта с экстрактом, полученным из клубней цикламена Кузнезова (рис. 2, кривая 1).

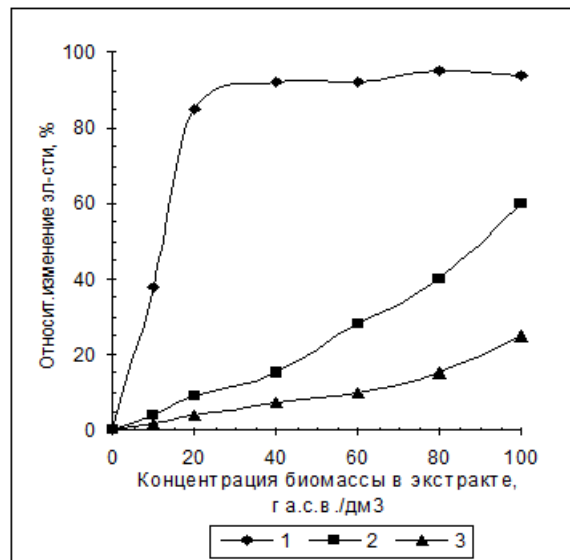


Рис. 2. Влияние концентрации биомассы экстрактов корнеплодов цикламена Кузнезова (1), листьев плюща обыкновенного (2) и плодов боярышника Поярковой (3) на относительное изменение электропроводности дисперсионной среды. Экспозиция биомассы в экстрактах – 10 минут.

Эффект был замечен уже при концентрации биомассы $0,1 \text{ г/дм}^3$, а при $0,4-0,5 \text{ г/дм}^3$ достигал максимальных значений – 80-92%. Сильное мембраноактивное действие малых концентраций экстракта клубней цикламена Кузнезова связано с высоким содержанием БАВ мембраноактивного действия – тритерпеновых гликозидов цикламина, мирабилина и цикламинорина.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности использования разработанного биокондуктометрического метода для экспресс-скрининга мембраноактивного действия БАВ.

Литература

1. С.Е. Дятлов, А.Г. Петросян – *Phaeodactylum tricornutum* Bohl. (Chrysophyta) как тест-объект. Общие положения // Альгология. – 2001. – Т.11, №1. – С. 145-155.
2. Методы биоиндикации и биотестирования природных вод / Гос. комитет СССР по гидрометеорологии и контролю природных вод. – Л.: Гидрометиздат, 1987. – 152с.
3. В.М. Юрин, А.И. Соколик, А.П. Кудряшов – Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. – Мн.: Наука і техника, 1991. – 271с.

4. В.В. Архипчук, В.В. Гончарук – Влияние обессоленной воды на жизнедеятельность организмов животных и растений и функционирование их клеток // Химия и технология воды. – 2003. – Т. 25, № 2. – С. 191-200.
5. А.Ю. Иванов, В.М. Фомченков, Л.А. Хасанова – Токсическое действие гидроксированных ионов тяжелых металлов на цитоплазматическую мембрану бактериальных клеток // Микробиология. – 1997. – Т.66, № 5. – С. 89-91.
6. М.Г. Владимирова, В.Е. Семенов – Интенсивная культура одноклеточных водорослей. – М.: МГУ, 1962. – 45с.
7. Пат. 57468 Украины. Способ контроля изменений активности микроорганизмов / И.Н. Юркова, В.Р. Эстрела-Льопис, Т.И. Бородинова. – Опубл. 16.06.2003. Бюл. № 6.