

**УДК 579.6:577.37**

## **ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА МЕМБРАНОАКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ БАВ СИНТЕТИЧЕСКОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

*Юркова И. Н.*

В настоящее время синтезируются и применяются сотни тысяч химических соединений: одни – в качестве новых лекарственных препаратов, другие попадают в окружающую среду и затем в открытые водоемы и моря со сточными водами промышленных предприятий. Все эти вещества обладают биологической активностью. Объективная оценка действия БАВ лишь на основании результатов химических и физико-химических методов анализа часто бывает затруднена. Для водных сред, содержащих токсичные вещества, это может привести к неправильной оценке экологической опасности.

Разработка и применение биологических методов анализа водных сред связаны с использованием большого спектра тест-объектов с различными тест-функциями [1-4]. Использование с этой целью суспензионных культур клеток (в том числе, бактерий и микроводорослей) имеет преимущества, связанные с тем, что при измерении тест-функций получают интегральный результат миллионов клеток. Большинство известных методов тестирования не отвечают тем или иным требованиям (экспрессность и простота, высокая чувствительность, быстрота развития реакции, автоматизация сбора и обработки результатов), поэтому поиск новых физиологических тест-функций, отражающих интегральную реакцию организма на воздействие БАВ, является весьма актуальным.

Воздействие БАВ на клетку прежде всего сказывается на изменении проницаемости мембранной системы, что приводит к нарушению концентрационных градиентов и выходу электролитов из клетки [5, 6]. Следствием этого является изменение электропроводности окружающей среды.

Разработанный биокондуктометрический способ контроля биологической активности клеточных суспензий по изменению электропроводности дисперсионной среды [7] ранее был применен при тестировании биологической активности водных сред, содержащих тяжелые металлы [8].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании возможности тестирования биокондуктометрическим методом мембраноактивного действия БАВ синтетического и растительного происхождения.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Тест-объектом служила альгологически чистая культура *Spirulina platensis* Geitl., которую выращивали в накопительном режиме в культуральных сосудах при круглосуточном освещении лампами ЛДУ-80 и непрерывном продувании суспензии

воздухом на питательной среде Заррука [9] при 30-32<sup>0</sup> С в течение 8 суток (конец экспоненциальной фазы роста).

В качестве тестируемых биологически активных веществ использовали фармакологические препараты дибазола, папаверина, строфантина G в концентрации 10<sup>-6</sup>-10<sup>-3</sup> М и водные экстракты лекарственных растений: цикламена Кузнецова, боярышника Поярковой, плюща обыкновенного. Для получения экстрактов клубни цикламена, листья плюща и плоды боярышника измельчали, растирали с кварцевым песком, заливали дистиллированной водой и затем настаивали в течение 2-3 часов, после чего суспензию фильтровали. Концентрацию БАВ определяли по количеству растительного материала, использованного для экстракции, в г сухого вещества на 1 дм<sup>3</sup>.

Выбор объектов тестирования был связан с тем, что препараты нейротропного действия, к которым относятся дибазол, папаверин и строфантин G, используют в исследованиях электрофизиологических реакций биологических мембран [3,10]. Кроме того, синтез новых препаратов подобного действия представляет большой интерес для современной фармакологии. Не менее важен для создания лекарственных препаратов и пищевых добавок поиск новых источников растительного сырья. В этом отношении выбранные растительные объекты (цикламен Кузнецова, боярышник Поярковой и плющ обыкновенный) занимают особое место, т.к. содержат ценные БАВ - тритерпеновые гликозиды, флавоноиды, алкалоиды и др. [11].

Для проведения кондуктометрического теста суспензию клеток отделяли от культуральной среды, экспонировали в тестируемых растворах, а затем ресуспендировали в концентрации 1 г а.с.в./дм<sup>3</sup> слабо проводящей дисперсионной среды заданного состава [7], электропроводность  $K_0$  которой предварительно фиксировали. Через определенные промежутки времени (5, 10, 15 и 20 минут) отбирали пробы и измеряли электропроводность дисперсионной среды  $K_1$ . Величину кондуктометрического теста определяли по относительному  $\Delta K = (K_1 - K_0) / K_0$  изменению электропроводности среды и выражали в % по отношению к контролю (без БАВ), принимаемому за 100%. Электропроводность растворов определяли с помощью моста переменного тока Р-577 и ячейки со строго фиксированными расстояниями между электродами и фиксированным положением электродов в ячейке [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из результатов, приведенных на рис. 1, исследованные нейротропные препараты: дибазол, папаверин и строфантин G вызывали значительные изменения интегральной проницаемости клеточной мембраны тест-объекта, определяемые по относительному изменению электропроводности дисперсионной среды после экспозиции биомассы, обработанной тестируемыми растворами. Максимальный эффект при равных концентрациях БАВ (10<sup>-5</sup> М) наблюдался после воздействия строфантина G (рис. 1, в, кривая 2).

По сравнению с дибазолом папаверин оказывал более выраженное мембранотропное действие, однако кинетика развития реакции была медлее (максимальный эффект наблюдался лишь после 30-минутного контакта, в то время как у дибазола и строфантина G он достигался после 30 мин). Когда речь идет о реакции объекта на присутствие биологически активных веществ, предполагается,

## ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА МЕМБРАНОАКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ БАВ СИНТЕТИЧЕСКОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

что молекулы последнего вступают во взаимодействие с некоторыми структурами клетки, сорбируясь на них. Поэтому кинетика развития реакции клетки на присутствие в растворе БАВ зависит от кинетики их сорбции.

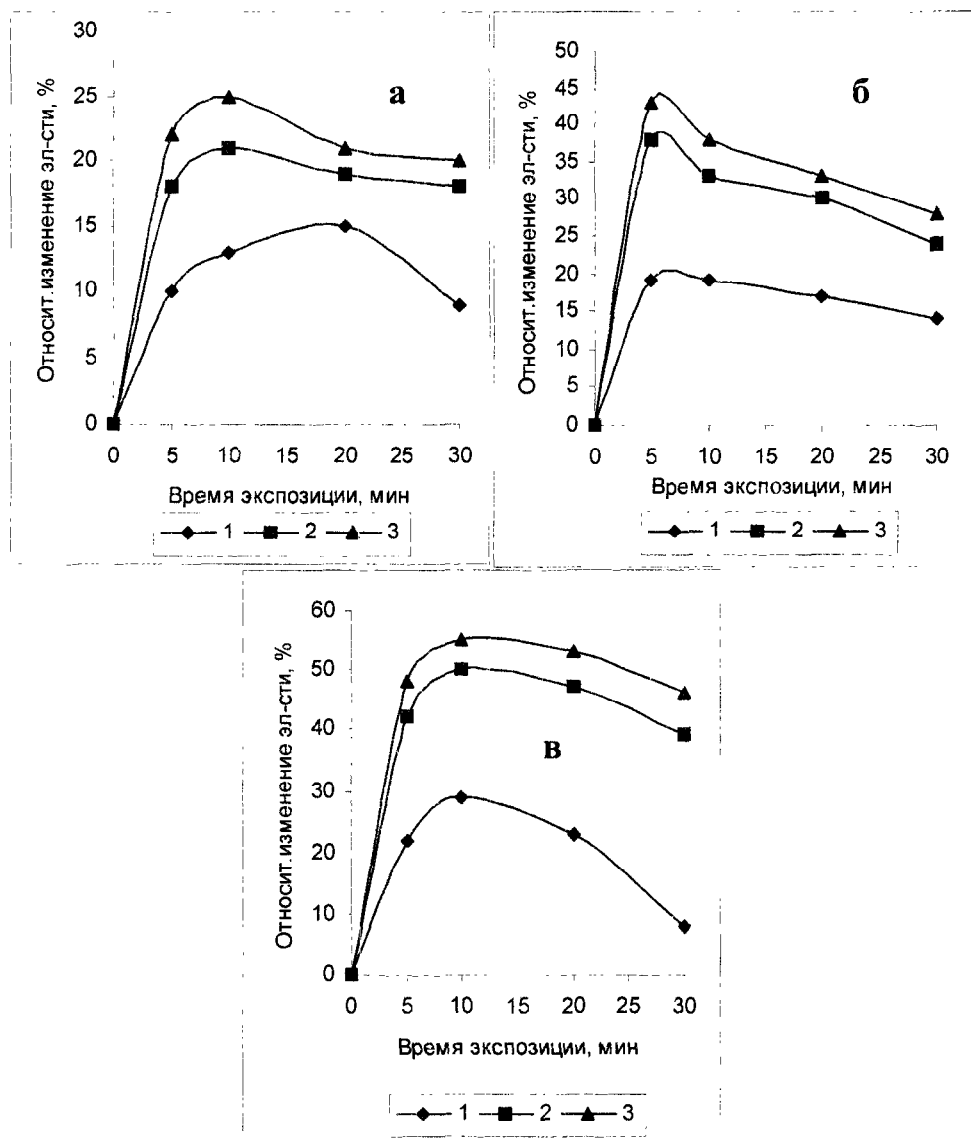


Рис. 1. Влияние дибазола (а), папаверина (б) и строфантина G (в) на относительное изменение электропроводности дисперсионной среды, % после экспозиции биомассы *Spirulina platensis*. Время контакта биомассы с растворами дибазола и строфантина G – 10 минут, папаверина – 30 минут (максимальный эффект). Дибазол и папаверин: 1 – 10<sup>-5</sup> М, 2 – 10<sup>-4</sup> М, 3 – 10<sup>-3</sup> М; строфантин G: 1 – 10<sup>-6</sup> М, 2 – 10<sup>-5</sup> М, 3 – 10<sup>-4</sup> М.

При определении пороговых концентраций исследованных препаратов учитывались относительные изменения электропроводности, превышающие 10% (экспериментально определенная относительная погрешность метода составляла 4-6%). Для дибазола и папаверина пороговые концентрации соответствовали  $10^{-5}$  М (величина эффекта 10-20%), а для строфантина G –  $10^{-6}$  М (20-30%). Эти величины были на порядок ниже определенных электроальгологическим методом на клетках харовых водорослей [3]. В случае со строфантинном G по величине эффекта можно предположить, что пороговая концентрация, определяемая биоиндуктометрическим методом, менее  $10^{-6}$  М.

В зависимости от времени, необходимого для достижения необратимости связывания молекул БАВ с поверхностными клеточными структурами, биологическая реакция клетки на БАВ может быть необратимой, как после 20-30-минутного контакта микроводорослей с ионами тяжелых металлов [8], 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 (кинетиические 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) и строфантина G –  $10^{-6}$  М (рис. 1, в, кривая 3). У папаверина в концентрации  $10^{-5}$  М (рис. 1, б, кривая 3) оно менее выражено, что объясняется большим временем контакта с БАВ (30 минут), необходимым для достижения максимального эффекта в связи с медленной кинетикой развития реакции.

При всех исследованных концентрациях дибазола, папаверина и строфантина 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 Кузнецова (рис. 2, кривая 1). Эффект был заметен уже при концентрации биомассы  $0,1$  г/дм<sup>3</sup>, а при  $0,4-0,5$  г/дм<sup>3</sup> достигал максимальных значений – 80-92%. Наибольший эффект от воздействия экстрактов плюща (58%) наблюдался при концентрации биомассы  $1,0$  г/дм<sup>3</sup> (рис.2, кривая 2), однако по ходу кривой видно, что максимальный эффект может соответствовать более высоким концентрациям экстракта. Наименьшее мембраноактивное действие установлено для экстрактов плодов боярышника (рис. 2, кривая 3). Как и в случае с плющем максимальный эффект при концентрации  $1,0$  г/дм<sup>3</sup> не достигнут, однако по сравнению с экстрактом плюща при равных концентрациях величина эффекта экстрактов боярышника в два раза ниже.

## ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА МЕМБРАНОАКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ БАВ СИНТЕТИЧЕСКОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Сильное мембраноактивное действие очень малых концентраций экстракта клубней цикламена Кузнецова можно объяснить большим содержанием БАВ мембраноактивного действия – тритерпеновых гликозидов цикламина, мирабилина, цикламинорина и др. [13]. Как видно из кинетики развития мембраноактивного действия экстрактов цикламена (рис. 3), максимальный эффект наблюдался после экспозиции биомассы в дисперсионной среде в течение 10-20 минут. При минимальной концентрации 0,05 г а.с.в./дм<sup>3</sup> было отмечено незначительное снижение эффекта после 20-минутной экспозиции, что, возможно, объясняется десорбцией молекул БАВ.

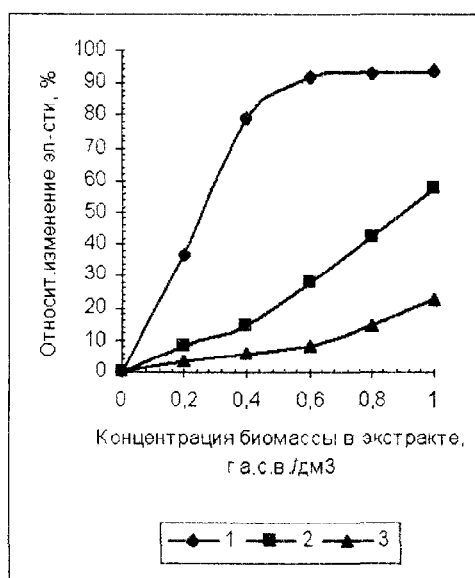


Рис. 2 Влияние концентрации биомассы в экстрактах, полученных из клубней цикламена Кузнецова (1), листьев плюща обыкновенного (2) и плодов боярышника Поярковой (3) на относительное изменение электропроводности дисперсионной среды, % после 30-и минутной экспозиции биомассы *Spirulina platensis*. Время контакта биомассы с экстрактами – 10 минут.

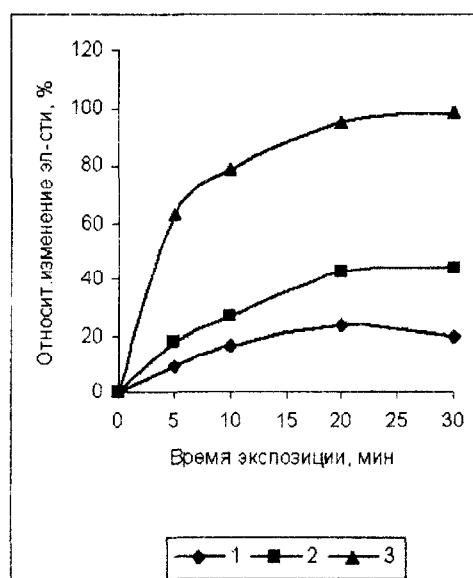


Рис. 3 Влияние концентрации экстракта клубней цикламена Кузнецова на относительное изменение электропроводности дисперсионной среды в %. После различной экспозиции биомассы *Spirulina platensis*. Время контакта биомассы с экстрактами - 10 минут. Концентрация биомассы в экстракте: 1 - 0,05 г а.с.в./дм<sup>3</sup>; 2 – 0,1 г а.с.в./дм<sup>3</sup>; 3 – 0,4 г а.с.в./дм<sup>3</sup>.

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

### Список литературы

1. Дятлов С.Е., Петросян А.Г. *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. – 152 с.
3. Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. – Мн.: Навука і техника, 1991. – 271с.
4. Архипчук В.В., Гончарук В.В. 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. Иванов А.Ю., Фомченков В.М., Хасанова Л.А. Токсическое действие гидроксированных ионов тяжелых металлов на цитоплазматическую мембрану бактериальных клеток // Микробиология. – 1997. – Т.66, № 5. – С.89-91.
6. Приходько Н.В. Изменение проницаемости клеточных мембран как общее звено механизмов неспецифической реакции растения на внешнее воздействие // Физиол. и биохимия культур. раст. – 1977. – Т.9, № 3. – С.301-309.
7. Пат. 2002108456 Украины, МКИ<sup>5</sup> С 12 М 1/36, С 12 М 1/38, С 12 Q 3/00. Способ контроля изменений активности микроорганизмов /И.Н.Юркова, В.Р.Эстрела-Льопис, Т.И.Бородинова. – Оpubл. 16.06.2003. Бюл. №6.
8. Юркова И.Н., Эстрела-Льопис В.Р. Кондуктометрический альготест качества водной среды //Ученые записки ТНУ. Серия «Биология, Химия». – 2003. - №1. – С.113-118.
9. Пиневиц В.В., Верзилин Н.Н., Михайлов А.А. Изучение *Spirulina platensis* – нового объекта для высокоинтенсивного культивирования // Физиология раст. – 1970. – Т.17., вып.5. – С.1037-1047.
- 10.Юрин В.М., Иванченко В.М., Галактионов С.Г. Регуляция функций мембран растительных клеток. – Мн.: Навука і техника, 1979. – 215с.
- 11.Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения. – С.-Петербург «Спец.Литература», 1999. – 358с.
- 12.Лопатин Б.А. Кондуктометрия. – Новосибирск:Изд-во СО АН СССР, 1964. – 112 с.
- 13.Galis T., Satana M.E., Yuruker A. Triterpene saponins from *Cyclamtn mirabile* and their biological activities // J. Nat.Prod. – 1997. – Vol.60, №3. – P. 315-318.

Поступила в редакцию 18.12.2003 г.