

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 615.32: 547.9

ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПОЗИЦИИ ИЗ СПИРТОВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ РАСТОРОПШИ, АСТРАГАЛА И ТАУРИНА

EXPRESS-ANALYSIS OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE COMPOSITION OF SPIRTOVODNAJA EXTRACT OF MILK THISTLE, ASTRAGALUS AND TAURINE

И.Н. Пузырева¹, М.А. Огай¹, А.Ю. Петров²
I.N. Puzyreva¹, M.A. Ogai¹, A.Y. Petrov²

¹⁾ Омский государственный медицинский университет
Россия, 644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

²⁾ Уральский государственный медицинский университет
Россия, 626026, г. Екатеринбург, ул. Декабристов, 32

¹⁾ Omsk State Medical University
Russia, 644099, Omsk, Lenin St., 12

²⁾ Ural State Medical University
Russia, 626026, Ekaterinburg, Dekabristov St., 32

E-mail: marinfarm@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены данные по биотестированию. Актуальность нравственности проблемы, связанной с использованием животных в экспериментах - очевидна. История взаимоотношения человека с живой природой, с дикими и домашними животными насчитывает тысячелетия. Однако, до сих пор, остро стоят вопросы связанные с возможностью оправданной замены животных в экспериментах, в частности, при подборе наиболее оптимальных композиций из лекарственного растительного сырья, индивидуальных препаратов. В этом плане очень интересны одноклеточные животные – парамеции.

Resume. The article presents data on the bioassay. The relevance of ethical issues related to the use of animals in experiments is obvious. The history of man's relationship with nature, with wild and domestic animals dates back millennia. However, so far, the issues associated with the possibility of the justified replacement of animals in experiments, particularly when selecting the most optimal compositions of medicinal plants, individual preparations. In this respect, very interesting single-celled animals – the Paramecia.

Ключевые слова: парамеции, расторопша пятнистая, астрагал серпоплодный, таурин.
Keywords: the Paramecia, milk Thistle, Astragalus secepatnya, taurine.

Введение

Биотестирование – оценка реакции тест-организмов на ту или иную субстанцию. Из всех функций простейших (тест-реакций), изменяющихся под действием тех или иных факторов, наиболее доступны для фиксации в опытах следующие: изменение подвижности, гибель организма и скорость размножения. Для получения максимума информации эти реакции можно выстроить во временную систему: изменение подвижности за время 15-30 мин; гибель отдельных клеток за время 1-4 часа; снижение скорости размножения (1-3 суток); гибель популяции (4-30суток). В качестве тест-организмов для оценки токсичности использовали парамеции. Профессор А.Н. Кудрин провел исследования по сравнительной оценке токсичности спиртовых растворов, лекарственных чаев [Кудрин, 1997]. В фармакологии парамеции как биологическую модель используют для скрининга лекарственных средств антиоксидантного и мембранстабилизирующего типов действия.

Цель

Цель исследования – выбрать наиболее оптимальное соотношение компонентов в композиции из спиртового извлечения плодов расторопши пятнистой, травы астрагала серпоплодного и таурина.

Материалы и методы

Эксперимент по определению биологической активности и токсичности веществ был проведен на парамециях - культуре *Paramecium caudatum*.

Пищей для парамеций служили живые дрожжи - *Rhodotorula gracilis*.

Оборудование: бинокулярный микроскоп Биолам, предметные стекла, пипетки автоматические градуированные с наконечником, рН-метр.

Подготовка биологического материала к проведению эксперимента (определение чувствительности парамеций) проводилась следующим образом: на предметное стекло наносили две капли среды, содержащей парамеции (число особей в каждой капле не менее 5), одна капля служила контролем, ко второй тангенциально (сбоку) прибавляли каплю соответствующего объема 0.9% раствора хлорида натрия. При добавлении раствора натрия хлорида наблюдалось заметное ускорение движения по сравнению с контролем. Этот опыт повторяли 5 раз. При этом парамеции считаются чувствительными в случае ускорения движения не более 4 особей из 5 по результатам 5 измерений. Для оценки чувствительности парамеций по параметру - замедление движений - использовали 0.5% раствор калия хлорида и проводили опыты по аналогичной методике. При этом парамеции считаются чувствительными в случае замедления движения не менее 4 особей из 5 по сравнению с контролем. Культура парамеций считается чувствительной по положительным результатам проб с 0.9% раствором натрия хлорида и 0.5% раствором калия хлорида (рис. 1).



Рис. 1. Парамеции
Fig. 1. The Paramecia

Проведение испытаний на биологическую активность и токсичность. На предметное стекло наносили три капли среды, содержащей парамеции (должно быть не менее 5 особей в капле). Одна капля служит контролем, ко второй капле прибавляли каплю раствора исследуемого вещества в наибольшем разведении (например, 1×10^{-6} г/мл), к третьей с меньшим разбавлением (например, 1×10^{-5} г/мл). Наблюдали 5-7 мин за изменением движения парамеций, отмечали характерные изменения в их движении: ускорение, замедление, круговые хаотичные движения. С целью выяснения развития эффекта во время наблюдения можно увеличить до 30 мин время от момента добавления исследуемой концентрации вещества. Затем на новом предметном стекле устанавливали концентрацию вещества, которая вызывает изменение формы парамеций или лизис. С каждой концентрацией опыты повторяют не менее 5 раз.

Информативными являются следующие показатели: наименьшая концентрация, вызывающая ускорение или замедление движения – пороговая концентрация; концентрация, вызывающая необратимую остановку – остановочная концентрация, и приводящая к лизису – лизирующая. О степени биологической активности судили по величине пороговой концентрации: чем меньше эта величина, тем выше активность.

Изучение протективной активности по отношению к клеточным ядам проводили со спиртом этиловым и водорода пероксидом, которые создают патологическую модель повреждения мембраны клетки. Этиловый спирт повреждает белковую часть биомембраны, пероксид водорода инициирует ПОЛ мембраны [Степанова и др., 2000].

Результаты и их обсуждение

В процессе наблюдения за культурой клеток фиксировали число особей в одной капле и средний (преобладающий) размер клеток. Для подсчета числа инфузорий использовали гемогиметрический способ (камера Горяева). Различие в концентрации живых парамеций в опытной и контрольной пробах, а также в их размере являлось критерием токсичности или экологически благоприятной среды для одноклеточного организма.

Таблица 1
Table. 1

Результаты определения влияния разработанных композиций на аппарат размножения и темпа роста парамеций (хронический опыт)
The results of the determination of the influence of developed compositions in the apparatus of reproduction and growth of Paramecia (chronic experience)

Объект исследования	Исходное количество парамеций в 0.05 мл	Количество парамеций спустя 3 суток	Размер парамеций и форма (мкм)	Характер движения
Контроль	5-6	50-60	90-100 удлинённые	активны
Композиция-расторопша:астрагал:таурин (1:1:1)	5-6	>150	90-100 удлинённые	очень активны
Композиция-расторопша:астрагал:таурин (2:1:2)	5-6	>150	90-100 удлинённые	активны
Композиция-расторопша:астрагал:таурин (2:1:1)	5-6	>150	90-100 удлинённые	активны
Композиция-расторопша:астрагал:таурин (8:1:4)	5-6	>150	90-100 удлинённые	очень активны

По шкале активности все экспериментальные группы относятся к активным и очень активным и к 3 суткам количество парамеций превосходит исходное количество особей в среднем в 3 раза. Анализ данных, приведенных в табл. 1 показал, что все четыре исследуемые композиции в экологическом отношении благоприятны для парамеций.

Следующим этапом наших исследований было изучение протективной активности изучаемых композиций по отношению к клеточным ядам: спирту этиловому 14% и водорода пероксиду 1%. Лизис клеточной стенки парамеций под воздействием клеточных ядов спирта этилового 14% и перекиси водорода 1% представлен на рис. 2.



Рис. 2. Лизис парамеций под воздействием клеточных ядов
Fig. 2. Lysis of a Paramecium under the influence of cellular poisons

Таблица 2
Table. 2

Изучение степени защиты парамеций от действия токсикантов по времени остановки (n=5)
A study of the extent of protection of the Paramecium from the effects of toxicants on stopping time (n=5)

Наименование объекта	Время остановки парамеций в 14% этаноле, мин	Время остановки парамеций в 1% растворе пероксида водорода, мин
Контроль	0.2±0.02	0.09±0.01
Композиция-расторопша:астрагал:таурин (1:1:1)	0.35±0.02 P≤0.05*	0.17±0.01 P≤0.05*
Композиция-расторопша:астрагал:таурин (2:1:2)	0.49±0.01 P≤0.05*	0.23±0.01 P≤0.05*
Композиция-расторопша:астрагал:таурин (2:1:1)	0.46±0.02 P≤0.05*	0.22±0.01 P≤0.05*
Композиция-расторопша:астрагал:таурин (8:1:4)	0.64±0.01 P≤0.05*	0.36±0.02 P≤0.05*

Разработанные композиции существенно удлиняли время остановки парамеций под воздействием клеточных ядов – спирта этилового и пероксида водорода.



Удлинение времени остановки движения парameций под воздействием спирта этилового 14%, характеризует мембраностабилизирующую активность разработанных композиций, компоненты, которых препятствуют повреждению белковой части биомембраны.

Реакции биологического окисления сопровождаются образованием свободных радикалов — частиц, имеющих на внешней валентной орбитали неспаренный электрон. Это обуславливает высокую химическую активность этих радикалов. Например, они вступают в реакцию с ненасыщенными жирными кислотами мембран, нарушая их структуру. Антиоксиданты предотвращают свободнорадикальное окисление. Активность разработанных комбинаций, проверена по удлинению времени движения парameций под воздействием 1% раствора перекиси водорода. Повидимому это связано со способностью компонентов разработанных композиций тормозить ПОЛ мембраны, то есть окислительную деградацию липидов, происходящую, в основном, под действием свободных радикалов.

Выводы

Учитывая все выше описанное и основываясь на проведенном эксперименте нами разработаны составы четырех композиций.

Композиция 1 включает спиртоводное извлечение из плодов расторопши пятнистой, травы астрагала серпоплодного и таурин (1:1:1), композиция 2 представлена теми же компонентами, но в соотношении (2:1:2), композиция 3 — (2:1:1), композиция 4 — (8:1:4). Наиболее оптимальной оказалась, именно последняя композиция, спиртоводное извлечение из расторопши пятнистой, астрагала серпоплодного и таурин с соотношением компонентов 8:1:4, время остановки парameций в 14% этаноле составило в среднем 0.64 мин, а в 1% растворе перекиси водорода 0.36 мин, что превосходит контроль в 3 и 4 раза соответственно.

Список литературы References

Степанова Э.Ф., Андреева И.Н., Огай М.А. 2000. Использование экспресс – методов оценки биологической активности на культуре клеток при разработке фитопрепаратов адаптогенного действия. Фармация на современном этапе – проблемы и достижения. Науч. тр. М. 39 (1): 299-302.

Stepanova Je.F., Andreeva I.N., Ogaj M.A. 2000. Ispol'zovanie jekspress – metodov ocenki biologicheskoj aktivnosti na kul'ture kletok pri razrabotke fitopreparatov adaptogenogo dejstvija. Farmacija na sovremennom jetape – problemy i dostizhenija [Use the express – methods of an assessment of biological activity on culture of cages when developing phytopreparations of adaptogeny action. Pharmacy at the present stage – problems and achievements]. Nauch. tr. M. 39 (1): 299-302. (in Russian)

Кудрин А.Н., Ананин В.В., Балабьян В.Ю. 1997. Система экспресс – методов интегральной оценки биологической активности индивидуальных и комплексных препаратов на биологических объектах. Рос. хим. журн. 41 (5): 114-123.

Kudrin A.N., Ananin V.V., Balab'jan V.Ju. 1997. Sistema jekspress – metodov integral'noj ocenki biologicheskoj aktivnosti individual'nyh i kompleksnyh preparatov na biologicheskikh ob"ektah [System the express – methods of an integrated assessment of biological activity of individual and complex preparations on biological objects]. Ros. him. zhurn. 41 (5): 114-123. (in Russian)