

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ НЕКОТОРЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ.

*Сорокина Елена Владимировна* ч

*канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. г.Москва.*

*Зарубина Алевтина Петровна*

*канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. г.Москва.*

### АННОТАЦИЯ

Выявлены повреждающие и стимулирующие концентрации биологически активных веществ на примере экзогенных нейромедиаторов (серотонина, дофамина, гистамина и норадреналина) экспрессным методом (30 мин) биотестирования на основе бактериальной люминесценции. Показано, что два нейромедиатора (норадреналин и дофамин), молекулы которых отличаются только одним радикалом, значительно отличаются индексом токсичности и биологической активностью. Выраженное токсическое действие на используемый биотест проявляется при концентрациях около 40 мкг/мл норадреналина и не менее 1 мг/мл дофамина. Обсужден возможный механизм биологического действия такого феномена. Предлагаемая модель биотестирования может быть полезна для первичной оценки действия известных и вновь синтезируемых фармакологически значимых биологически активных веществ.

### ABSTRACT

The damaging and stimulating concentrations of biologically active substances have been identified by the example of exogenous neurotransmitters (serotonin, dopamine, histamine and norepinephrine) using the rapid method (30 min) of biotesting based on bacterial luminescence. It is shown that two neurotransmitters (norepinephrine and dopamine), whose molecules differ only in one radical, significantly differ in the toxicity index and biological activity. The pronounced toxic effect on the biotest used is manifested at concentrations of about 40 µg/ml norepinephrine and at least 1 mg / ml dopamine. The possible mechanism of the biological effect of such a phenomenon is discussed. The proposed model of biotesting can be useful for a primary assessment of the effects of known and newly synthesized pharmacologically significant biologically active substances.

**Ключевые слова:** биотестирование, биолюминесценция, токсичность, нейромедиаторы, серотонин, дофамин, норадреналин, гистамин.

**Key words:** biotesting, bioluminescence, toxicity, neurotransmitters, serotonin, dopamine, noradrenaline, histamine.

В настоящее время чрезвычайно актуальна задача выбора модельного объекта для изучения биологической активности и свойств различных веществ, включая фармакологически значимые. Биотестирование таких соединений требует ряда сложных процедур и, кроме того, имеет ряд трудностей, связанных с биотехническими аспектами, например, при использовании высших организмов. В связи с этим очевидно преимущество биотестирования с использованием светящихся бактерий для первичной неспецифической количественной и качественной интегральной оценки действия различных химических веществ, их смесей и физических факторов. Тесты с использованием люминесцентных бактерий, в частности *Escherichia coli* с созданным светящимся фенотипом, нашли представительную «экологическую нишу» в аналитической химии, биотехнологии, медицинской микробиологии и токсикологии [10].

В свете новейших данных организм человека рассматривают как сложный «надорганизм» или симбиотическое сообщество многочисленных эукариотических, прокариотических клеток, вирусов и архебактерий. В особенности обильной и разнообразной является микробиота желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), которая широко представлена и бактериями *Escherichia coli*, некоторые штаммы которых используют даже как лекарственные формы (колибактерин) при дисбактериозе. К важнейшим функциям микробиоты человека относят ее участие в переваривании пищевых компонентов, метаболизме многих биологически активных веществ, регуляции кишечной моторики, резистентности к колонизации «чужой» микробиотой, в том числе патогенной [16,17].

Бактериальные светящиеся клетки тест-систем, используемые для оценки токсичности различных ксенобиотиков, содержат полный набор мультиферментных комплексов и достаточное количество необходимых субстратов и кофакторов, которые обеспечивают их нормальную жизнедеятельность. Ферменты и кофакторы клеток бактерий находятся внутри клетки

в состоянии, обеспечивающем наиболее оптимальные режимы их совместного функционирования. Механизмы широкой чувствительности многокомпонентной реакции бактериальной биолюминесценции к действию химически различных веществ и физических факторов, очевидно, неоднозначны. Эффективно ингибируют биолюминесценцию акцепторы электронов и ингибиторы дегидрогеназ. Не вызывает сомнения наличие гидрофобного участка в составе люциферазы для связывания неполярных соединений [5]. Применение тест-системы на основе бактериальной люминесценции для решения аналитических задач определяется ее несомненными преимуществами, такими, как технологическая простота, экспрессность, низкая стоимость, достоверность получаемых результатов, корреляция с данными биотестирования на высших организмах [12].

Одной из групп веществ, оценка которых с точки зрения, как микробиомной, так и интегральной токсичности весьма актуальна, являются нейромедиаторы. Это биологически активные природными веществами, которые участвуют во многих регуляторных функциях различных организмов, включая и микроорганизмы ЖКТ, тем самым значительно влияя на жизнедеятельность человека [13,1]. Биологически активные соединения, включая и нейромедиаторы, активно используемые в терапевтической практике в качестве нейротропных лекарственных средств (ацетилхолин, норадреналин, дофамин, ГАМК и др.), нуждаются в быстрых и адекватных методах первичной характеристики их свойств. Это важно для первичного отбора наиболее активных химических аналогов, оценки их действующих и токсических концентраций. Области применения таких методов включают не только производство фармацевтических препаратов, но и ряд смежных областей - контроль бытовых и промышленных изделий, оценку состояния объектов окружающей среды.

В настоящей работе приведены данные биотестирования сравнительной экспресс-оценки токсичности

нейромедиаторов в различных диапазонах концентраций. Метод основан на измерении интенсивности бактериальной люминесценции. При этом понятие «микробиомной токсичности» пересекается по содержанию с понятием «интегральная оценка токсичности». В качестве исследуемых нейромедиаторов использованы - серотонин, дофамин, норадреналин и гистамин.

#### Материалы и методы

В качестве биосенсора использовали бактерии штамма *Escherichia coli* K12 TGI с созданным светящимся фенотипом при клонировании lux-оперона из светящихся почвенных бактерий *Photobacterium luminescens* ZMI. Штамм получен и хранится на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, известен как биосенсор тест-системы «Эколом-08» [15]. В эксперименте лиофильно высушенные клетки биосенсора регидратировали холодной дистиллированной водой в течение 30 минут и использовали суспензию  $2.3 - 2.7 \cdot 10^7$  кл/мл.

Плотность бактериальных суспензий определяли ( $\lambda=670$  нм) на фотоэлектроколориметре КФ77 и выражали числом клеток в мл по калибровочной кривой. Потенциометрически определяли pH водных исследуемых образцов.

В работе использовали серотонина креатинин сульфат, дофамин-HCl, норадреналин и гистамин-2HCl (Sigma, USA) в концентрациях, рассчитанных по нейромедиатору.

Для определения индекса токсичности водных растворов нейромедиаторов в различных концентрациях от 10 мкг/мл до 5 мг/мл в опытные и контрольные пробирки объемом 1.5 мл вносили 0.1 мл суспензии бактериального биосенсора и добавляли в контрольные пробирки 0.9 мл стерильной дистиллированной воды (pH 7.0), в опытные пробирки 0.9 мл исследуемого образца.

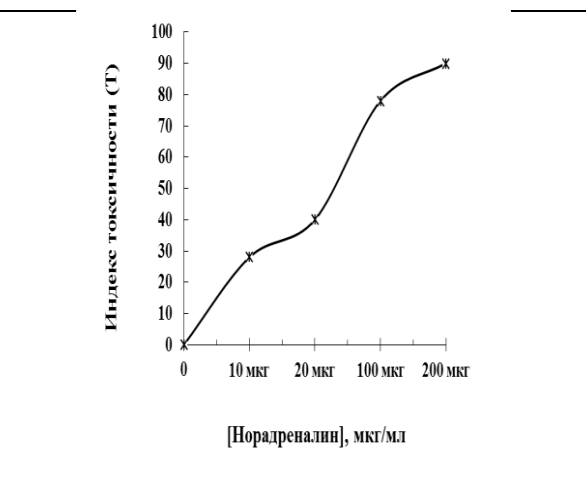
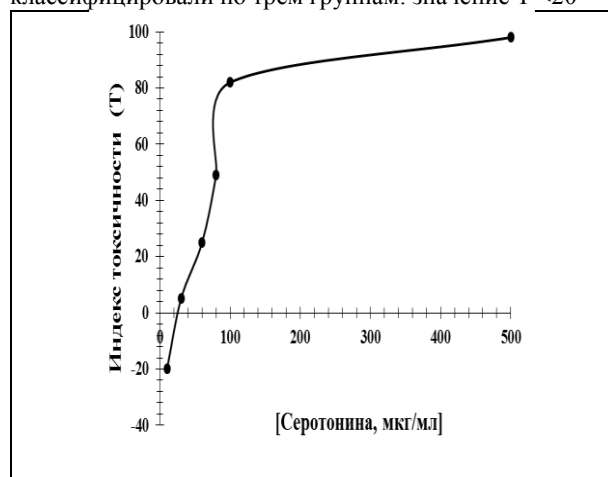
Интенсивность свечения бактерий (имп/сек) контрольного и опытного образцов в трех повторностях регистрировали одновременно с помощью люминометра «Биотокс 6МС» (Россия) при комнатной температуре 20-22°C при экспозиции биосенсора с исследуемыми образцами во времени от 5 до 60 минут. Оценивали токсичность исследуемых веществ по снижению интенсивности люминесценции клеток биосенсора, вычисляя индекс токсичности (Т). Индекс токсичности (Т) образцов определялся автоматически по программе люминометра по формуле:  $T = 100 \cdot (I_k - I) / I_k$ , где  $I_k$  и  $I$  – интенсивность свечения контрольного и опытного образцов, соответственно. Результаты исследований обрабатывали статистически. Достоверность обнаруженных различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Оценку токсичности классифицировали по трем группам: значение  $T < 20$  –

образец нетоксичен; значение  $T > 20$ , но  $< 50$  – образец токсичен; значение  $T > 50$  – образец очень токсичен [15]. Иногда при действии малых концентраций нейромедиаторов наблюдали стимуляцию свечения тест – организма (Т с отрицательным знаком). Кроме индекса токсичности, значимыми параметрами тест-систем являются величины 20%-го и 50%-го ингибирования свечения бактерий (ЕС- интенсивность свечения, которые отражают концентрации исследуемого вещества или его объем). Величину ЕС20 принято обозначать как нижнее «пороговое» значение токсичности. Величина ЕС50, как показано многочисленными исследованиями, коррелирует с ответной реакцией высших организмов, оцененной по LD50 [9].

Анализ осуществляли при фиксированном времени экспозиции каждого контрольного и опытного образца, одновременно регистрируя их интенсивность люминесценции в 3-х повторностях. Результаты исследований анализировались статистически. Надежность различий между экспериментальными и контрольными значениями оценивалась с использованием критерия t-Student.

#### Результаты и обсуждение

При использовании метода биотестирования на основе бактериальной люминесценции было выявлено действие исследуемых нейромедиаторов в зависимости от времени экспозиции с биосенсором. Серотонин и дофамин в используемых концентрациях до 10 мкг/мл, т.е. приблизительно до 50 мкМ, проявляли стимулирующий эффект. Эффект серотонина на биолюминесценцию биосенсора был аналогичен ранее наблюдавшемуся эффекту на накопление биомассы, формирование колониеобразующих единиц и агрегацию клеток у того же бактериального вида – *E. coli*: серотонин стимулировал все эти процессы при концентрации примерно до 20-50 мкМ и ингибировал их при более высоких концентрациях. Поскольку при высоких концентрациях (начиная примерно с 50 мкМ) серотонин также ингибировал образование мембранного потенциала бактериальными мембранами, был сделан вывод о разобщающем действии серотонина при указанных концентрациях [4]. Аналогичное разобщающее действие возможно и для других тестируемых соединений (дофамин, норадреналин, гистамин), также содержащих ионизируемую аминогруппу вблизи ароматического кольца. Стимуляцию свечения биосенсора гистамином наблюдали при концентрации 25 мкг/мл,  $\approx 200$  мкМ. Норадреналин при концентрациях 10 и 20 мкг/мл вызывал незначительное ингибирование свечения биосенсора, а при более высоких концентрациях индекс токсичности (Т) превышал 50.



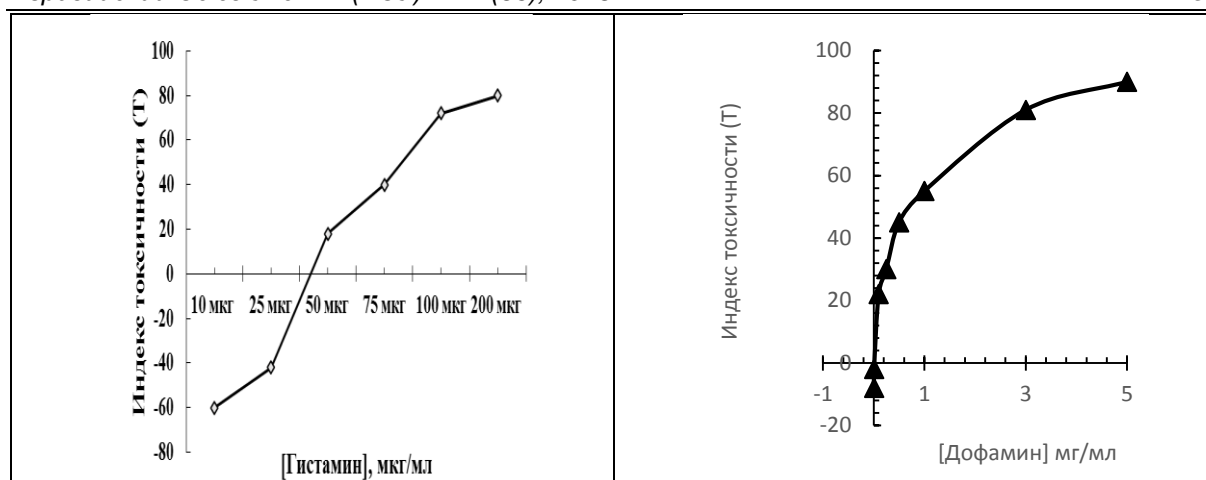


Рисунок. Индекс токсичности исследуемых различных концентраций нейромедиаторов при 30 минутной инкубации с биосенсором.

Анализируя исследуемые диапазоны активных концентраций нейромедиаторов, можно выделить интервалы, где каждый нейромедиатор был не токсичен, токсичен и очень токсичен. Серотонин и дофамин в диапазоне концентраций от 1 до 50 мкг/мл были нетоксичны, Т составлял  $\approx 20$ .

Норадреналин ингибировал интенсивность свечения при всех исследуемых концентрациях. Высокую токсичность серотонина ( $T > 50$ ) для биосенсора наблюдали при концентрации от 80 мкг/мл. Токсичность дофамина и гистамина нарастает постепенно с увеличением времени их действия на биосенсор и до-

стигает максимума к 60 мин биотестирования. Гистамин был не токсичен в концентрациях до 50 мкг/мл, а в концентрации 100 мкг/мл был высоко токсичен.

Данные об индексах токсичности исследуемых нейромедиаторов при 30 мин экспозиции с биосенсором представлены на рисунке. Они позволяют оценить активность исследуемых нейромедиаторов и сравнить их между собой. Вычисленные нами величины ЕС20 и ЕС50 в диапазоне исследуемых концентраций нейромедиаторов выявили, что наименее токсичен дофамин, а наиболее токсичен норадреналин (таблица).

Нейромедиаторы	ЕС <sub>20</sub> , мкг/мл	ЕС <sub>50</sub> , мкг/мл	LD <sub>50</sub> мг/кг
серотонин	45	80	220
дофамин	100	1000	1640
гистамин	50	85	220
норадреналин	8	40	26

Следует отметить, что многочисленными процедурами биотестирования с использованием тест-системы на основе бактериальной люминесценции было показано, что ЕС50 тушения свечения люминесцентного биосенсора по показателям токсичности различных ксенобиотиков соотносится с данными LD50 для биотестов эукариотных организмов с большим коэффициентом корреляции - от 0,8 до 0,95.

Нами при биотестировании на основе бактериальной люминесценции было обнаружено, что вычисленные величины ЕС20 и ЕС50 в диапазоне исследуемых концентраций нейромедиаторов за 30 мин экспозиции с клетками биосенсора выявили, что наименее токсичен дофамин - ЕС20  $\approx 100$  мкг/мл и ЕС50  $\approx 1$  мг/мл, а наиболее токсичен норадреналин - ЕС20  $\approx 8$  мкг/мл и ЕС50  $\approx 40$  мкг/мл, для серотонина ЕС20  $\approx 45$  мкг/мл и ЕС50  $\approx 80$  мкг/мл, для гистамина ЕС20  $\approx 50$  мкг/мл и ЕС50  $\approx 85$  мкг/мл (таблица).

Таким образом, ряд токсичности в порядке убывания выглядит следующим образом:

норадреналин < гистамин  $\approx$  серотонин < дофамин.

Для примера: по известным данным литературы для биогенных аминов LD50 норадреналина  $\approx 26$  мг/кг, гистамина  $\approx 220$  мг/кг, серотонина  $\approx 220$  мг/кг, дофамина  $\approx 1640$  мг/кг. Соответственно, ряд токсичности в порядке убывания при их пероральном введении мышам выглядит следующим образом:

норадреналин < гистамин  $\approx$  серотонин < дофамин [7, 8, 11].

Таким образом, метод биотестирования на модели бактериальной люминесценции можно рекомен-

довать для первичной оценки биологических эффектов стимулирующих и повреждающих концентраций как известных природных, так и вновь синтезируемых аналогов нейромедиаторов, что актуально в медицинской практике. Очевиден сходный характер действия биогенных нейромедиаторных аминов на интенсивность люминесценции клеток-биосенсора и на другие ростовые и физиологические параметры бактериальных клеток (исследованные в более ранних работах). Из данных литературы известно, что биогенные амины синтезируются в микробных клетках, в том числе в клетках E. coli, не содержащих эти соединения в среде культивирования. Возможно, в наших экспериментах выявленные эффекты биогенных аминов являются результатом действия суммарной концентрации экзогенно добавленных и эндогенных нейромедиаторов, содержащихся в клетках используемого биосенсора [4]. Это указывает на информативный характер биолюминесцентных данных о нейромедиаторах. в плане их физиологических эффектов, включая, в особенности их влияние на микробиоту человека, которая весьма важна для поддержания его соматического и психического здоровья.

Необходимо отметить как ингибиторные, так и стимулирующие (последнее, в основном, в низких дозах) микробные эффекты нейромедиаторов на рост бактерий. В случае стимулирующего действия нейромедиаторов на микробиоту можно было бы говорить об их отрицательной микробиотной токсичности для нано- и микромолярных концентраций дофамина, норадреналина и гистамина, в частности, к Escherichia coli [2]. При повышении концентрации, например, се-

ротонина, отрицательная токсичность сменяется положительной, т.е. высокие концентрации не стимулируют, а подавляют рост, например, у *E. coli* [4].

Нами получены данные разной токсичности структурно сходных молекул дофамина и норадреналина (последний содержит только один гидроксидикал ОН в боковой цепи), в сравнении с известными различиями в их биологическом действии [3, 6]. Норадреналин функционирует в головном мозге и в периферической (симпатической) нервной системе, проходя путь от фенилаланила и тирозина, поступающего в организм с пищей, до создания дофамина. Дофамин под воздействием гидроксилазы превращается в норадреналин. Различие между эффектами токсического действия двух химически сходных соединений, дофамина и норадреналина, по крайней мере, частично, могут являться результатом специфических взаимодействий с рецепторами на поверхности клеток, индивидуально распознающие указанные нейротрансмиттеры. Так их разницу в специфичной чувствительности рецепторов клеток выявили у эукариотных организмов *Saccharomyces cerevisiae*. Обнаружено, что апоморфин связывается с рецепторами D1 и D2, специфичными к дофамину, стимулируя клеточную пролиферацию у *S. cerevisiae*, тогда как норадреналин не оказывал существенного влияния на этот процесс [14,6].

#### Список литературы:

1. Danilov V.S., Zarubina A.P., Eroshnicov G.E., Solov'eva L.N., Kartashev F.V., Zamil'gelsky G.B. The bioluminescent sensor systems with lux-operons from various species of luminescent bacteria. //Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2002. Vol.57. №. 3. P. 20-24
2. De Backer D., Biston P., Devriendt J., Madl C., Chochrad D., Aldecoa C., Brasseur A., Defrance P., Gottignies P., Vincent J.L. Comparison of dopamine and norepinephrine in the treatment of shock. //The New England Journal of Medicine. 2010. V.362. № 9. P. 779-89.
3. Inoue W., Vaimoukhametova D.V., Füzesi T., Wamsteeker Cusulin J.I., Koblinger K., Whelan P.J., Pittman Q.J., Bains J.S. Noradrenaline is a stress-associated metaplastic signal at GABA synapses. //Nat. Neurosci. 2013. Vol. 16. №. 5. P. 605-612.
4. Isbister, G.K., Bower, S.J., Dawson A., Whyte, I.M. Relative toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in overdose. //J. Toxicol. Clin. Toxicol. 2004. V.42. №3. P.277-285.
5. Kaiser K.L. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. //Environ. Health Perspect. 1998. Vol. 106. N. 2. P. 583-591.
6. Oleskin A. V., Shishov V. I., Malikina K. D. Symbiotic Biofilms and Brain Neurochemistry. Hauppauge (NY): Nova Science Publishers. 2010.
7. Sarkar C., Basu B., Chakroborty D., Dasgupta P.S., Basu S. The immunoregulatory role of dopamine: an update. //Brain Behav. Immun. 2010. Vol. 24. №. 4. P. 525-528.
8. Sconbaume E., Sellers E.A., Johnson G.E. Noradrenaline and survival of rats in a cold environment. //Can. J. Biochem. Physiol. 1963. V.41. P.975-98
9. Xue R., Zhang Y.P., Jin Z.L., Yuan L., He X.H., Zhao N., Chen H.X., Zhang L.M., Fan S.Y., Zhong B.H., Zhang Y.Z., Li Y.F. The discovery of 071031B, a novel serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor. //Neurosc. Lett. 2013. V.544. № 1. P.68-73.
10. Zarubina A. P., Perfiliev Yu. D., Sorokina E. V., Netrusov A. I. Evaluation of the Properties of Potassium Ferrate Used for Water Purification by Luminescence Bioassay. //Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2016. Vol. 71. №. 4. P. 226-230.
11. Анучин А. М., Чуелев Д. И., Кировская Т. А., Олескин А. В. Действие нейромедиаторных моноаминов на ростовые характеристики *Escherichia coli* K-12. //Микробиология. 2008. Т. 77. № 6. С. 758-765.
12. Ашмарин И. П., Ещенко Н. Д., Каразеева Е.П. Нейрохимия в таблицах и схемах. // М. «Экзамен». 2007. 143 стр.
13. Васильев В. Н. Диагностика и терапия инкурабельных нервных и психических заболеваний допаминовой этиологии. Биокоррекция Васильева. // Медиакит. М. 2009. 247стр.
14. Маликина К.Д., Шишов В.И., Чуелёв Д.И., Кудрин В.С., Олескин А.В. Регуляторная роль нейромедиаторных аминов в клетках *Saccharomyces cerevisiae* // Прикл. биохим. микробиол. 2010. № 6. С.1-6.
15. Олескин А. В., Кировская Т. А., Ботвинко И. В., Лысак Л. В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференциацию микроорганизмов // Микробиология. 1998. Т. 67. № 3. С. 306-311.
16. Олескин А.В., Эль-Регистан Г.И., Шендеров Б.А. Роль нейромедиаторов в функционировании микробиоты человека: межмикробные «переговоры» и диалог микробиота-хозяин. // Микробиология. 2016. Т.85. №1. С.1-24.
17. Шендеров Б. А. Микробная экология и ее роль в поддержании здоровья // Метаморфозы. 2014. № 5. С. 72-80.

УДК 581.582.526

## ВОДОРОСЛИ ОСНОВНЫХ ТИПОВ ПОЧВ ФЕРГАНСКОЙ ДОЛИНЫ

Тухтабоева Ю.

Наманганский госуниверситет (Узбекистан)

e-mail: repititor\_bio@mail.ru

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2018.1.56.36-40

### АННОТАЦИЯ

Нами изучена флора водорослей светлый, типичный серозем, типично коричневая и светло – бурая почва Ферганской долины в пределах Узбекистана распространены от 250 до 2100 метров над уровнем моря.

Светлый серозем полугидроморфный, солончаковатый, слабозасоленный. Растительность мятликово осачково разнотравная. Проективное покрытие примерно 75%, задернение слабое. Типичный серозем суглинистый, солончаковатый на лессовидных средних легких суглинках. Слабо всхолмленная. Растительность мятликово-пырейно- разнотравная. Проективное покрытие 70 %, задернение слабое.

Темный серозем на лессовидных суглинках. Крутизна около 25 градус. Растительность зизифорова – кострово-мятликовая, проективное покрытие 70 %, задернение среднее.

### ANNOTATION

Us studied flora of the algae light, typical serosem, typically -brown and light - boring ground Ferganskoj valleys within Uzbekistan wide-spread from 250 before 2100 metres on sea level.