

УДК 57.083.36:582.26

## ВИКОРИСТАННЯ ОДНОКЛІТИННИХ ВОДОРОСТЕЙ ЯК ІНДИКАТОРНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ

Кордон Т.І.

**Використання одноклітинних водоростей як індикаторних тест-систем для визначення цитотоксичності.** – Т.І. Кордон – Огляд являє собою аналіз даних літератури щодо досвіду використання одноклітинних мікроорганізмів в якості індикаторних для оцінки токсичності біологічних рідин. Особливу увагу приділено мікроводорості *Dunaliella viridis*, що специфічно реагує на присутність цитотоксичних сполук різного походження. Узагальнено результати експериментальних досліджень, які вказують на високу чутливість та ефективність клітинної тест-системи *D. viridis* як індикаторної, що може бути використана в практиці клініко-діагностичних та науково-дослідних лабораторій.

**Ключові слова:** цитотоксичність, біоіндикація, мікроводорості.

**Адреса:** ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії НАМН України», в'їзд Балакірева, 1, м. Харків, 61018, Україна; e-mail: kti@rambler.ru

**USE of unicellular algae as an indicator test-system for determining cytotoxicity.** – T.Kordon. – This review is analysis of the literature on the experience of using unicellular microorganism as an indicator to assess the toxicity of biological fluids. Particular attention is paid heed to microalgae *Dunaliella viridis*, which specifically reacts to the presence of cytological compounds of different origin. The results of experimental studies that indicate high sensitivity and efficiency of the cell test system *D. viridis* as an indicator that can be used in the practice of clinical diagnostic and research laboratories.

**Keywords:** cytotoxicity, bioindication, microalgae.

**Address:** GI «Institute of general and urgent surgery National academy of medical science of Ukraine», Balakireva vyzd 1, Kharkiv, 61018, Ukraine; e-mail: kti@rambler.ru

Проблема пошуку оптимальних методів селективного та інтегрального визначення різноманітних цитотоксичних сполук у біологічних рідинах, які б володіли високою чутливістю і давали змогу швидко і достовірно виявляти потенційно цитотоксичні компоненти речовин з біологічно-активною дією, і до сьогодні залишається актуальною.

В останні роки у багатьох галузях біології та медицини широко застосовуються експресні методи аналізу з використанням різноманітних тест-систем – одноклітинних біоіндикаторів, які характеризуються широкою доступністю, і разом з тим, володіють досить високим рівнем чутливості, вибіркової, специфічності, і які дають можливість швидко та у досить малому об'ємі досліджуваного матеріалу виявити присутність різноманітних цитотоксичних речовин [1]. Такі методи дозволяють судити про наявність будь-якої речовини чи її кількісний вміст за характером та ступенем її впливу на певний організм, взятий як індикаторний. Аналітичним сигналом при цьому є його реакція

на подразник, яким, наприклад, можуть бути токсичні речовини середовища, біологічних рідин чи будь-які інші біологічно активні речовини, що спричиняють порушення життєвих функцій індикаторного організму чи його загибель [17].

Як відомо, при різноманітних патологічних станах розвивається синдром ендогенної інтоксикації, зумовлений підвищеним розпадом тканин, посиленими процесами катаболізму, недостатністю функції печінки та нирок, що виникає при порушенні процесів мікроциркуляції та регуляції агрегатного стану крові і лімфи, порушення газообміну, функції імунореактивної системи. Можливість безперервного моніторингу таких метаболітів з допомогою клітинних тест-систем вигідно відрізняють їх від стандартних методів дослідження, що потребують більше матеріальних витрат і часу на їх виконання. Тому клітинні тест-системи як інструмент скринінг-діагностики є перспективним дослідницьким напрямком, а їх використання стає більш затребуваним у різноманітних сферах діяльності [16, 24].

Протягом багатьох років одноклітинні мікроорганізми широко застосовуються для реалізації задач в галузі охорони здоров'я та суміжних з нею напрямків, таких як фармакологія, біологія, радіологія та інших в якості індикаторних тест-систем. На даний час досить широкого практичного застосування набули тест-системи, основою яких є одноклітинні водорості. Таке превалювання обумовлене досить тривалою у часі статистикою їх використання як індикаторів. Різноманітні властивості водоростей можна використовувати в якості клітинного біосенсору як високочутливої системи біоіндикації. [6, 7, 23, 24].

Для оцінки токсичності біологічних рідин в медичній практиці досить тривалий час використовують парамеційний тест. Суть методу полягає у визначенні часу життєздатності парамецій (інфузорій) – «парамеційного часу» в присутності токсичного чинника, який знаходиться у біологічній рідині. В якості контролю визначають час виживання інфузорій в присутності плазми або сироватки крові здорових людей. Для цього до досліджуваної біологічної рідини додають стільки ж завісі 11-15 добової культури парамецій, ретельно перемішують і за допомогою мікроскопії визначають час повної загибелі парамецій. Тривалість життєздатності парамецій при додаванні їх культури в біологічній рідині здорових людей складає 25-30 хвилин. Вираховують кількість токсичного фактору досліджуваної рідини, яка виражається в умовних токсичних одиницях [9].

В роботі Жмінько П.Г. зі співавторами показано можливість визначення токсичності лікарських засобів на системі інфузорії *Tetrahymena pyriformis* W. Автори провели порівняльне дослідження гострої токсичності для лабораторних тварин, інфузорій та тимоцитів лікарських засобів (анальгін, диклофенак, ацетілсаліцилова кислота, натрієві солі пеніциліну, етиловий спирт). Кореляція між показниками токсичності свідчила про те, що інфузорії *Tetrahymena pyriformis* W можуть бути використані як альтернативна модель у прогнозуванні гострої токсичності фармакологічних субстанцій на етапі їх скринінгу та доклінічного дослідження [8].

Співробітниками діагностичної лабораторії ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії НАМН України» та Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна сумісно розроблена тест-система на основі одноклітинної водорості *Dunaliella viridis*. Зелені клітини водорості *D. viridis*, грушоподібної або овальної, рідше кулястої або циліндричної форми, що мають на одному полюсі два джгутика, розмножуються шляхом бінарного поділу, з ростовий оптимумом 14-30<sup>0</sup> С специфічно реагують на присутність

цитотоксичних сполук в біологічних рідинах, що проявляється зміною форми, розмірів клітин, напрямку руху, частковою або повною втратою рухливості, агрегацією клітин [18]. Реєстрацію морфологічних та функціональних змін клітин *D. viridis*, а також кількість макро- і мікро агрегатів, які утворюються, можна реєструвати за допомогою автоматизованої програми. Відсутність клітинної стінки забезпечує прямий контакт агента безпосередньо з клітинною мембраною. Зміна форми та рухливості клітин може залежати не лише від властивостей клітин, але й від природи та концентрації певних хімічних сполук в біологічних рідинах. Як наслідок, мікроводорості можуть по-різному реагувати на хімічні сполуки різного походження.

Вивченню можливості застосування водоростей *D. viridis* в якості тест-системи для оцінювання цитотоксичності біологічних рідин передували роботи Божкова А.І., Голтвянського А.В. (2000р.), які виявили, що клітини мікроводорості *D. viridis* активно реагують на стрес-фактори зміною форми клітин та формуванням пальмел чи клітинних агрегатів [2]. Авторами ряду робіт показана можливість застосування водорості *D. viridis* в якості індикаторного мікроорганізму для діагностики різних клінічних форм міастенії [3, 12, 20]. Відомо, що формування аутоімунних реакцій при міастенії супроводжується появою в сироватці крові хворих різноманітних цитотоксичних сполук, які через відсутність у *D. viridis* клітинної стінки можуть справляти негативну дію безпосередньо на плазматичну мембрану. Відповідна реакція цих клітин легко визначається, оскільки ці клітини рухливі, і порушення їх рухливості легко спостерігати. Автори показали, що внесення в культуру клітин *D. viridis* сироватки крові, хворих на міастенію, призводило до цілого комплексу змін – форми клітин, формування клітинних агрегатів – пальмел. Автори також встановили, що при різних клінічних фенотипах міастенії відповідь біосенсору також різнилася, оскільки у сироватці крові присутні цитотоксичні компоненти з різними властивостями та різною молекулярною вагою, що і визначає їх різних ефект на клітини тест-культури.

В роботах Клімової О.М. зі співавторами показано, що після тімектомії та тимомтімектомії змінюється характер відповіді клітинного біосенсору *D. viridis*, який корелює зі змінами концентрації міастогенних факторів, присутніх в сироватці крові таких хворих. Цей скринінг-тест дає можливість застосовувати біосенсор для оцінки важкості стану пацієнта, прогнозу перебігу захворювання та ефективності лікування, в тому числі хірургічного видалення зміненої вилочкової залози [4, 10, 12].

Доведена ефективність застосування одноклітинної тест-системи *D. viridis* для визначення загальної гострої токсичності лікарських засобів в умовах *in vitro*. З його допомогою отримано результати відносно максимальної припустимої концентрації лікарських засобів, які ототожнюються з даними гострої токсичності, попередньо проведеної на тваринах [21]. В літературі з біоетики, як і раніше, активно обговорюються переваги та обмеження медичних досліджень на експериментальних тваринах, що зумовлено не лише морально-етичними принципами, але й бажанням нівелювати очевидні недоліки експериментальних досліджень: затратність, трудомісткість, невисока практична користь результатів. Тому використання одноклітинних тест-систем як альтернатива експериментам на тваринах є ще однією їх перевагою.

Була проведена біоіндикація й визначені морфологічні та фізіологічні зміни клітинної тест-системи *D. viridis* при різних концентраціях афлотоксину В1, що дозволяє використовувати дану методику в кількісному аналізі зазначеного токсину як альтернативу стандартній з використанням високоефективної рідинної хроматографії [11].

На основі використання одноклітинної водорості *D. viridis* розроблено та запатентовано вдосконалений метод біоіндикації цитотоксичних факторів біологічної і хімічної природи [4, 5, 19]. В роботі показано, що тест-система *D. viridis* дозволяє виявити не лише перебіг патологічного стану, а й кількісно оцінити посилення або зниження цитотоксичності під впливом екзогенних біологічних або хімічних речовин. Описаний метод дає змогу проводити біоіндикацію цитотоксичних компонентів сироватки крові, лікарських засобів, алергенів, мікотоксинів, харчових консервантів та барвників *in vitro* для наступної екстраполяції на організм *in vivo*, для чого використовують розроблені математичні формули інтегрального коефіцієнту цитотоксичності та загального сумарного індексу цитотоксичності. Нововведення впроваджено в ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії НАМНУ», має практичне значення, дозволяє здійснювати оцінку потенційної цитотоксичної дії хімічних речовин з біологічно-активною дією, скринінг та біоіндикацію фармакологічних препаратів, оцінку потенційно цитотоксичних метаболітів, що містяться в сироватці крові, скринінг та моніторинг компонентів сироватки в лікуванні моно вірусних та TORCH-інфекцій, здійснювати індивідуальний підбір лікарських препаратів у відповідності з наявністю цитотоксичних сироваткових компонентів.

На користь використання клітинної тест-системи *D. viridis* як альтернативи уніфікованим методам дослідження цитотоксичності свідчить

робота Клімової О.М. зі співавторами [15], в якій встановлено кореляцію загальноприйнятих показників цитотоксичності сироватки крові хворих з різною патологією (пептидів середньої молекулярної маси (ПСММ), циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), та індексу цитотоксичності, визначеного з використанням тест-системи *D. viridis*. Показано, що при зростанні вмісту ПСММ та ЦІК в дослідних зразках сироватки крові виявлено достовірне збільшення рівня сумарної цитотоксичності, визначеного з використанням мікро водорості. Таким чином, отримані результати дозволяють застосувати культуру клітин *D. viridis* як високочутливу систему з метою біоіндикації цитотоксичних сироваткових факторів.

Досить інформативними виявились результати біоіндикації цитотоксичних факторів з використання клітинної тест-системи *D. viridis* в сироватці крові пацієнтів з різними зворотними неневертними патологічними станами [14]. Встановлено достовірні відмінності співвідношення кількості змінених клітин залежно від патології. Так, експериментальним шляхом доведено, що найбільший цитотоксичний ефект на клітини водорості *D. viridis* справляє сироватка крові хворих на цироз печінки, а найменшу негативну дію чинить сироватка крові хворих з судинними патологіями. На основі отриманих даних визначено та візуалізовано патерни формофункціональних змін клітин біосенсору в системі координат, розраховано сумарні коефіцієнти та індекси цитотоксичності сироватки для таких патологій як цироз печінки, рак товстої кишки, панкреатит, міастенія, термічні опіки та судинні захворювання. Отже, можна констатувати високу специфічність клітин *D. viridis* щодо цитотоксичної дії різноманітних факторів. Тому комплексне оцінювання спектру морфофункціональних показників клітин *D. viridis* з наступним розрахунком інтегральних коефіцієнтів цитотоксичності можна розглядати як скринінговий метод біоіндикації патологічного стану.

В роботі Клімової О.М. та Лавінської О.В. приведені результати дослідження впливу цитотоксичних компонентів сироватки крові з різними критичними станами на клітини мікроводорості *D. viridis* [13]. Показано, що при різних захворюваннях відмічається чітка гетерогенність ефектів у клітинній тест-системі. Проведено серію експериментів щодо вивчення дозової залежності цитотоксичних ефектів шляхом послідовних розведень сироваток крові хворих з різними патологіями. Даний феномен дозволяє проводити не лише попередній скринінг патологічних станів, але й кількісно оцінити посилення або зниження цитотоксичності сироватки під впливом екзогенних біологічних та хімічних чинників.

Також чутливим і достовірним виявився метод використання клітинної тест-системи *D. viridis* для оцінки рівня ендогенної інтоксикації при перитоніті, що дозволяє діагностувати різні ступені важкості ендотоксикозу [22]. Застосування експрес-оцінки стану компенсаторно-захисних сил організму шляхом визначення ступеню ендотоксикозу у хворих на гострий перитоніт дозволяє на ранніх етапах розвитку перитоніту діагностувати важкість перебігу захворювання та здійснювати моніторинг компонентів сироватки в період лікування.

Таким чином, використання одноклітинних водоростей, зокрема *Dunaliella viridis* в якості тест-системи для оцінювання цитотоксичності сироваток, лікарських засобів, будь-яких інших речовин з біологічно активною дією, на практиці є високочутливим методом, цінність якого полягає у можливості динамічного визначення, що характеризується низькою вартістю та простотою у використанні, а потенційними споживачами розробленої продукції можуть стати клініко-діагностичні лабораторії на базі медичних закладів різного рівня та наукові лабораторії.

1. Богдан А.С. Методы токсиколого-гигиенических исследований с использованием в качестве тест-объекта *Tetrahymena pyriformis* (Мат наук.-практ. конф. «Актуальные проблемы экологии и токсикологии», 28-29 мая 1998, К. – Ч.1 – с. 57-61.
2. Божков А.И., Голтвянский А.В. Функциональная гетерогенность клеток *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) и чувствительность к действию сернистой меди // Альгология. – 2000. – 10, №1. – С.22-31
3. Божков А.И., Климова Е.М., Бойко В.В. Связь клинических форм миастении с частотой встречаемости HLA-DR-фенотипа и разработка клеточного биосенсора для оценки этой патологии // Научно-теоретический журнал Президиї НАНУ. – 2002. - № 3. – С. 35 – 40.;
4. Божков А.И., Мензянова Н.Г., Климова Е.М. Использование водорослей в качестве клеточного биосенсора при оценке патологических состояний организма // Горизонты биофизики. От теории к практике./ Под ред. Г.Р. Иванникова. – Пушкино: Институт теоретической и экспериментальной биофизики, 2003. – С. 66 – 69.
5. Бойко В.В., Климова Е.М., Божков А.И. и др. Новые возможности выявления цитотоксических сывороточных факторов с помощью клеточных биосенсоров у больных с неотложными хирургическими состояниями // в кн. Материалы XXI съезда хирургов Украины. – 2005. – Запорожье. – Т. 2. – С. 440 – 443
6. Брянцева Ю.В. Индекс формы одноклеточных водорослей как новый морфометрический критерий // Экол. моря. – 2005. – №67. – С.27-31.
7. Долгов В.А. Сравнительная оценка параметров токсичности различных веществ для инфузорий тетрахимена пирформис и белых крыс (Сб. науч. тр. ВНИИ вет. сан. гигиены и экол. – 1996. – Вып. 100. – с 79-84.
8. Жмійко П.Г., Кокшарьова Н.В., Дмитренко М.П. Досвід використання різних тест-систем в скринінгових дослідженнях токсичності лікарських засобів // Вісник фармакології та фармації. – 2006. - №4. – С.21 – 27.
9. Зубанов П.А., Виноходов Д.О., Филimon Е.В. Зависимость чувствительности *Paramecium caudatum* к токсичным веществам от условий обитания // Материалы IV съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, 17-19 октября 2006г., Пушкино. – С.60-64.
10. Климова Е.М., Божков А.И., Бойко В.В., Дроздова Л.А. Использование диагностических клеточных биосенсоров при неотложных хирургических состояниях // Битехнол., биотехн., пищ. технол. – 2006. №1. – С.105-109.
11. Климова Е.М., Божков А.И., Кордон Т.И. Использование клеточного биосенсора для тестирования цитотоксических сывороточных факторов // Биотехнология. Наука. Образование. Практика. В кн. материалы IV Международной научно-практической конференции. – Днепропетровск, 2008. – с.88.
12. Климова Е.М., Кордон Т.И., Дроздова Л.А., Калашникова Ю.В. Использование клеточного биосенсора для интегральной оценки изменений метаболических и иммунологических показателей у больных различными формами миастении до и после операции // Биологический вестник. – 2007. – Т. 11, № 2. – с. 9 – 13.
13. Климова Е.М., Лавинская Е.В. Использование микроводоросли *Dunaliella viridis* Teodor. (Chlorophyta) в качестве клеточного биоиндикатора // Альгология. Т.22, №2. – 2012. – С.208-218.
14. Климова Е.М., Лавинская Е.В., Божков А.И., Кордон Т.И. Оценка степени цитотоксичности компонентов патологических сывороток с использованием клеточной тест-системы. // Биотехнология. – Т.3 – №6. – 2010. – С.85-91.
15. Климова О.М. Божков А.И., Кордон Т.И. Лавинська О.В. Оцінка сироваткової цитотоксичності за імунологічними показниками та з використанням клітинного біосенсору. – Науковий вісник УжНУ: Серія Біологія. 2010. – 27. – С.167-172.
16. Крашуров Е.С., Островский А.Г., Лузина Е.В. Методы определения степени интоксикации. – Врачебное дело. – 1988. – № 7. – С. 47 - 49..
17. Лавриненко И.А., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Создание цельноклеточной биосенсорной тест-системы для обнаружения генотоксических воздействий на клетку // Вестник Новосибирского гос. Ун-та. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2007. – Т.5, №1. – С.95-99.
18. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. – К.: «Наук. думка». – 1973. – 243 с.
19. Пат. UA № 08958, G01N33/15, C12Q1/04, C12M1/34. Спосіб біосенсорної індикації цитотоксичних факторів біологічної і хімічної природи / Климова О.М., Божков В.В., Бойко В.В., Кордон Т.И., Дроздова Л.А., Лавинська О.В. – пр. 28.08.2009
20. Пат. UA № 19128, A61B10/00, G01N33/49. Процес діагностики і прогнозу клінічного перебігу патологічного процесу / Климова О.М., Божков А.И., Бойко В.В. – Заявл. 24.02.2006; Опубл. 24.02.2006, Бюл. № 12
21. Патент № 39323 U, G01N33/15. Спосіб визначення цитотоксичності лікарських засобів / Козарь В.В., Полторак В.В., Божков А.И., Климова О.М. – Заявл. 06.08.08; опубл. 25.02.09, Бюл. №4.
22. Патент № 50174 МПК G01N 33/48. Експрес-діагностика стану компенсаторно-захисних сил організму при перитоніті / Польовий В.П., Соловей Ю.М., Божков А.И., Климова О.М. Соловей В.М. – Заявл. 14.12.1009, опубл. 25.05.10., Бюл. №10.
23. Пономаренко С.П., Паршикова Т.В. Экспресс-оценка эффективности биологически активных веществ на тест-культурах водорослей // Альгология. – 2001. - №4. – с.495 – 501;
24. Рощина В.В. Растительные микроспоры как биосенсоры // УПС.совр. биол. – 2006. – №4. – С.366-378.
25. Тернер Э., Карубе И., Уилсон Дж. Биосенсоры. Основы и приложения. – М.: Мир, 1992. – 616 с

Отримано: 21 жовтня 2012 р.

Прийнято до друку: 12 грудня 2012 р.