

Вивчення токсичності ряду ціанінових барвників, що застосовуються для детекції нуклеїнових кислот та білків

Н.Н. Нізамов, З.Ф. Ісмаїлов, Е.Н. Курталієв, Ш.Н. Нізамов,
Ф.У. Хайдарова, Г. Ходжаєв¹, О.П. Кухаренко²,
А.О. Баланда², С.М. Ярмолук^{2*}

Самаркандський державний університет ім. А. Навої
Університетський бульвар, 15, Самарканд, 703004, Узбекистан

¹Самаркандський сільськогосподарський інститут
вул. М. Улугбека, 77, Самарканд, 703004, Узбекистан

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Резюме. Проведено порівняльне дослідження потенційної токсичності відомих і новосинтезованих барвників, які застосовують для детекції білків та нуклеїнових кислот. Тестування проведено на інфузоріях *Paramecium caudatum*, клітинах міцелію гриба *Rhizoctonia solani* та *E. coli*. Виявлено токсичність речовин **Родаміну С, Суан-40, SIL, SBT та D-174**. Показано найвищу чутливість *Paramecium caudatum* серед інших індикаторних організмів для тестувань токсичності барвників на біооб'єктах.

Ключові слова: флуоресцентні барвники, токсичність, *Paramecium caudatum*.

Вступ. У практиці біомедичних досліджень застосовується широкий спектр хімічних сполук, які здатні специфічно взаємодіяти з певними біополімерами та клітинними органелами біологічних об'єктів. До таких сполук належить велика кількість барвників, які взаємодіють з біополімерами як на поверхні, так і всередині клітин [1–3]. Відомо, що наявність певної реакційної активності барвників може бути небезпечною для живих організмів, у тому числі для людей і тварин [4]. Багато з уже досліджених барвників, що вико-

ристовуються для детекції білків та нуклеїнових кислот, проявляють мутагенну, канцерогенну та імунотоксичну активність по відношенню до багатьох живих об'єктів [5–7]. У зв'язку з цим разом з проблемами забруднення навколишнього середовища біонебезпечними сполуками виникає необхідність дослідження новосинтезованих сполук на предмет токсичності, а також вивчення їх здатності до біодеструкції у разі потрапляння в природне середовище [8].

Метою нашої роботи було визначення потенційної небезпеки синтезованих нами барвників [9, 10] для живих об'єктів.

Об'єкт та методи дослідження. Об'єктом дослідження токсичності барвників були *Escherichia coli* штам HB101, клітини міцелію гриба *Rhizoctonia solani* та інфузорії *Para-*

*Corresponding author.

Tel./fax: +38044-5222458

E-mail address: sergiy@yarmoluk.org.ua

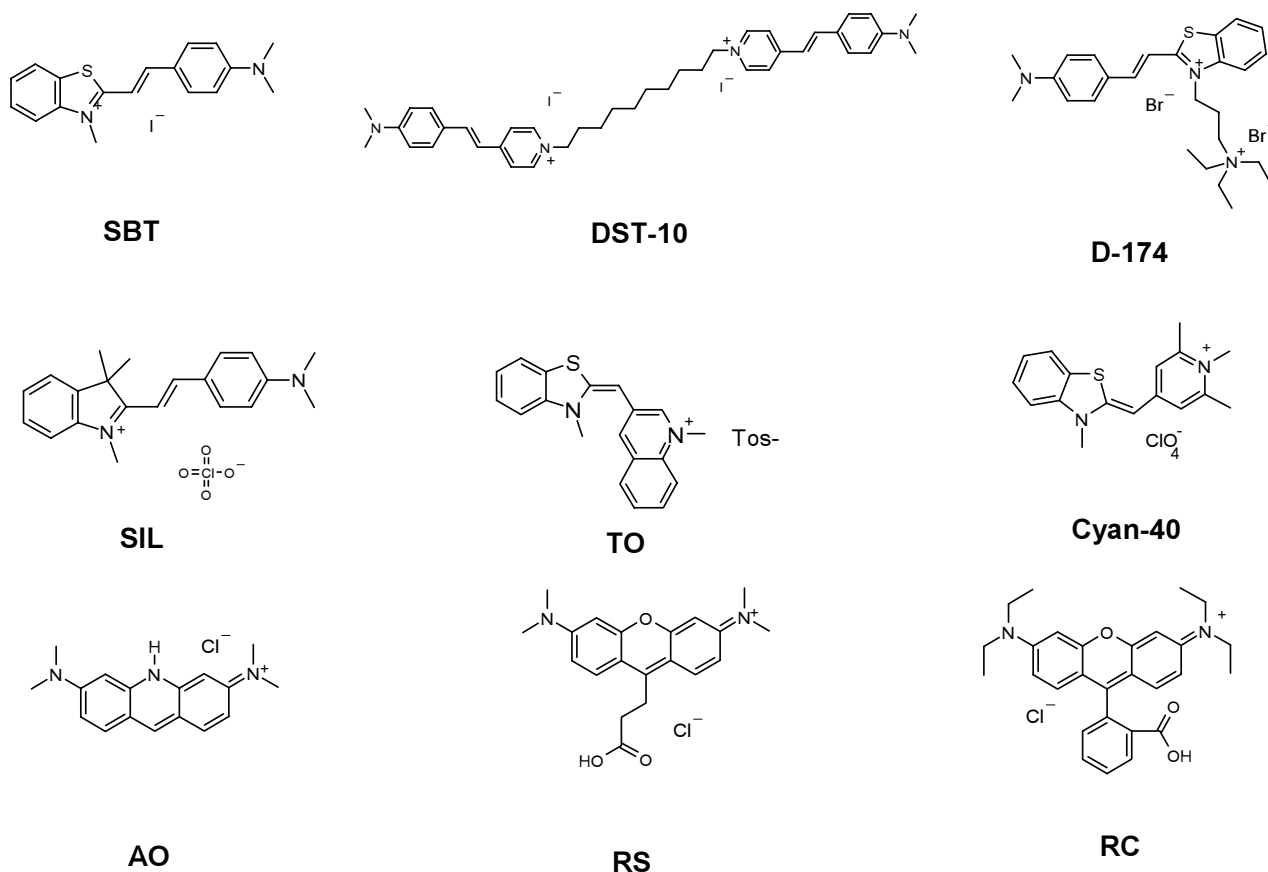


Рис. 1. Структури досліджуваних барвників.

mesium caudatum відповідно до наведених у літературі методів [11—15].

У дослідах використовували водні розчини синтезованих барвників **DST-10**, **Cyan-40**, **SIL**, **D-174**, **SBT** [10—12], **TO** (Fluka, Німеччина) та класичні для біомедичних дослідів барвники Акридин-оранж (**AO**), Родамін С (**RC**) та Родамін S (**RS**) (Sigma, США) в якості контролю (рис. 1). Концентрації стокових розчинів у всіх випадках становили 10^{-3} М. Стирилові барвники **DST-10** та **SIL** були люб'язно надані к.х.н. Д.В. Криворотенком (Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ, Київ, Україна).

Для оцінки токсичності зазначених вище сполук 100 мкл суспензії клітин *E. coli* висівали на поверхню агаризованого поживного середовища LB. Суспензію втирали шпателем досуха і потім наносили піпеткою на поверхню агару відповідні кількості сполуки, що тестувалася, в об'ємі 10 мкл. Негативним контролем слугувала дистильована вода, позитивним — антибіотик канаміцин. Рівень токсичності визначали за наявністю та розмірами зони при-

гнічення росту клітин у місці нанесення барвника.

Досліджуючи *R. Solani*, міцелій гриба вирощували на агаризованому середовищі, потім вирізали блок агару з міцелієм і переносили на свіже поживне середовище PDA. По периметру блоку агару з міцелієм наносили по 100 мкл розчину барвника у відповідних концентраціях і порівнювали ріст міцелію у свіжому середовищі з контрольним експериментом. Негативним та позитивним контролем слугували дистильована вода та розчин ністатину відповідно.

При роботі з *Paramecium caudatum* в якості середовища використовували сінний відвар [11]. Для цього подрібнену пшеничну солому півгодини настоювали у воді, наступні 30 хв. настій варили на водяній бані. Після цього відвар фільтрували через вату і доводили рН до 7,0. Інфузорій культивували в сінному відварі при температурі $+25$ °С в термостаті упродовж тижня, концентрували центрифугуванням та брали для експерименту в невеликих обсягах. Стокові розчини барвників роз-

Токсична активність деяких барвників по відношенню до клітин інфузорії *Paramecium caudatum*

Назва барвника	Розведення стокового розчину барвника та його концентрація (моль)									
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:20	1:40	1:64	1:256	1:1024
	$5,0 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-4}$	$6,2 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$	$7,75 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-7}$
DST-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Суан-40	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
SIL	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
D-174	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
SBT	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
AO	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
RS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RC	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Контроль (H ₂ O)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Примітки: «-» — живі інфузорії відсутні, «+» — наявність живих інфузорій.

водили у відношеннях 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:20, 1:40, 1:64, 1:256 та 1:1024 і вносили в рідке середовище з *Paramecium caudatum*. Поведінку інфузорій спостерігали безперервно протягом першої години після додавання барвника, а потім через 24 години.

Результати й обговорення. Проведені нами дослідження дали змогу встановити, що майже всі барвники не виявили токсичної дії на *E. coli* та клітини міцелію гриба *R. solani* при концентраціях нижче 10^{-3} М. Лише барвники **Суан-40**, **SIL**, **SBT**, **D-174** в тій чи іншій мірі мали незначний вплив на ріст зазначених біооб'єктів.

У табл. 1 подано результати дослідження токсичності барвників на *Paramecium caudatum*. Отримані дані свідчать, що в порівнянні з негативним контролем (дистильована вода) класичні барвники **RC** та **AO** спричиняли токсичну дію з летальним виходом досліджуваних мікроорганізмів у концентраціях порядку 10^{-5} та 10^{-6} М. Барвник **RS** при концентраціях нижче 10^{-3} М взагалі не виявив токсичної дії. Розбіжність у токсичній активності **RC** у порівнянні з **RS**, можливо, пов'язана з тим, що у **RC** карбоксильна група більш жорстко зв'язана з кістяком молекули барвника, тоді як у **RS** ця група має більше ступенів свободи для зміни свого положення у просторі.

Для стирилових та монометинціанінових барвників варто відзначити відсутність токсичності проти *P. caudatum* у речовин **TO** та **DST-10** у діапазоні досліджуваних концентрацій. Барвники **Суан-40**, **SIL**, **SBT** виявили летальну токсичність, меншу, але досить близьку до **RC**. При цьому можна вказати на деякі особливості дії окремих барвників. У разі додавання **Суан-40** у високих концентраціях відбувалося забарвлення клітинних вакуолей та ядра. Значні концентрації барвника **SIL** також забарвлювали вакуолі, крім цього відбувалося уповільнення рухливості інфузорій, яке переходило в аномальний рух по колу з наступною загибеллю мікроорганізмів. Аналогічні явища спостерігалися при додаванні барвника **RC**, причому розміри вакуолей при значних концентраціях барвника могли перевищувати розміри клітин. На нашу думку, це пояснюється тим, що інфузорії намагаються знизити внутрішньоклітинну концентрацію токсину, активно «секвеструючи» його у вакуолях, що призводить до збільшення об'ємів води в останніх. Надмірне збільшення об'ємів вакуолей може бути причиною загибелі мікроорганізмів. Барвник **AO** також спричиняє аномальну рухливість інфузорій перед загибеллю їх — мікроорганізми здійснюють коливальні

рухи «від голови до хвоста», ніби намагаючись скинути з себе токсичний вантаж. Додавання барвника **D-174** призводило до уповільнення рухливості інфузорій.

Отже, у роботі виявлено токсичність речовин **Суан-40**, **SIL**, **SBT** у концентраціях від $2,5 \times 10^{-5}$ М та вище. Барвник **D-174** виявив токсичний вплив на інфузорій при концентраціях від $6,5 \times 10^{-5}$ М. Також було підтверджено токсичність відомих класичних барвників по відношенню до *P. Caudatum* ($7,75 \times 10^{-6}$ М та 2×10^{-6} М у випадках **RS** та **AO** відповідно) [4]. Серед усіх об'єктів дослідження інфузорії виявились найбільш чутливим об'єктом для тестувань токсичності барвників.

Також у ході роботи було виявлено барвни-

ки, у яких практично відсутня токсичність для біологічних об'єктів. Зокрема, **DST-10** не виявив явних токсичних впливів при концентраціях вище 5×10^{-7} М. Цей барвник є найбільш перспективним флуоресцентним зондом серед досліджуваних сполук, оскільки крім з'ясованої нетоксичності, за нашими попередніми даними, йому притаманна висока константа зв'язування з коров'ячим сироватковим альбуміном (БСА), а також те, що комплекс **DST-10**—БСА є більш стабільним у порівнянні з іншими представленими барвниками.

Робота була виконана за підтримки Українського науково-технологічного центру (Проект № U3104к).

Надійшла до редакції 15.12.2005 р.

Toxicity evaluation of the series of cyanine dyes used for nucleic acids and proteins detection

N.N. Nizamov, Z.F. Ismailov, E.N. Kurtaliev, Sh.N. Nizamov, F.U. Khaydarova,
G. Khodjayev¹, O.P. Kukhareno², A.O. Balanda², S.M. Yarmoluk²

Samarkand State University named A. Navoi

15 University blvd., Samarkand, 703004, Uzbekistan

¹Samarkand Agricultural Institute

77 M. Ulugbek Str., Samarkand, 703003, Uzbekistan

²Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine

150 Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Abstract. Potential toxicity of some commercial and novel dyes specifically interacting with biopolymer molecules was comparatively studied on bioobjects such as protozoa *Paramecium caudatum*, fungus *Rhizoctonia solani* and *E. coli*. The toxicity and critical concentrations were determined for compounds **Rhodamine C**, **Суан-40**, **SIL**, **SBT**, **D-174**. *Paramecium caudatum* revealed the highest sensitivity to studied dyes and can be used as sensitive indicator organism in the toxicity tests.

Key words: fluorescent dyes, toxicity, *Paramecium caudatum*.

Перелік літератури

1. Досон Р., Елліот Д., Елліот У., Джонс К. Справочник биохимика. Пер. с англ. — М.: Мир, 1991. — 544 с.
2. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1981. — 286 с.
3. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. — М.: Мир, 1980. — 480 с.
4. Степанов Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей. — М.: Химия, 1971. — 448 с.
5. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. — М.: Мир, 1978. — 463 с.
6. Дубинин Н.П., Пашин Ю.В. Мутагенез и окружающая среда. — М.: Наука, 1978. — 130 с.
7. Куценко С.А. Основы токсикологии. — Санкт-Петербург, 2002.
8. Емашова Н.А., Калюжный С.В. Конверсия азокрасителей под действием анаэробных микроорганизмов // Успехи современной биологии. — 2005. — Т. 125, № 4. — С. 379—390.
9. Kovalska V.B., Kryvorotenko D.V., Balanda A.O., Losytskyu M.Yu., Tokar V.P., Yarmoluk S.M. Fluorescent homodimer styrylcyanines: synthesis and spectral-luminiscent studies in nucleic acids and protein complex // Dyes and Pigments. — 2005. — Vol. 67, No 1. — P. 47—54.
10. Огульчанский Т.Ю., Яцук В.М., Ярмолук С.М., Лосицкий М.Ю. Взаимодействие цианиновых красителей с нуклеиновыми кислотами. Спектральные особенности монометиновых бензотиазоловых цианиновых красителей и их взаимодействие с ДНК // Биополимеры и клетка. — 2000. — Т. 16, № 5. — С. 345—351.
11. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. — М.: Высшая школа, 1979. — 455 с.
12. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф.Герхардта. — М.: Мир, 1983.
13. Хаусман К. Протозоология. Пер. с нем. — М.: Мир, 1988. — 336 с.
14. Зауольников С.Д., Кочанов М.М., Лойт А.О., Ставчанский И.И. Экспрессные методы определения токсичности и опасности химических веществ. — Л.: Медицина, 1978. — 184 с.
15. Иванов А.В., Полянский Ю.И., Стрелков А.А. Большой практикум по зоологии беспозвоночных. 3-е изд. — М.: Высшая школа, 1981. — Т. 3. — С. 58—178.