10. Thangabalan B., Harini A.L., Manohar Babu S. Spectrophotometric estimation of cyclophosphamide in capsule dosage form. *Thangabalan B et al*., 2015, vol. 5, pp. 36-37.

РАЗНОНАПРАВЛЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ШУНГИТА НА РОСТ ПЛАНКТОННЫХ ОРГАНИЗМОВ В ПРИСУТСТВИИ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ И СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

Даллакян Г.А.
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1, корп. 12, г. Москва, 119991, РФ
e-mail: honaris@bk.ru

Аннотация. Исследована эффективность токсического действия синглетного кислорода на культуру водорослей Sc. quadricauda. При наличии в среде шунгита 100г/л защита от токсического действия синглетного кислорода на водоросли происходит в течении всего времени роста культуры. Концентрация шунгита 100г/л без эозина стимулирует рост культуры, при концентрации более 200г/л замедляет. В аквариумной воде при добавлении антибиотиков численность бактерии снизилась в 12 раз. При наличии шунгита и антибиотиков численность бактерии снизилась только в 1,7 раз по сравнению с исходными значениями. В присутствии только шунгита в среде рост культуры стимулируется. Шунгит в зависимости от концентрации может быть использован в качестве стимулятора роста микроорганизмов и как протектор от токсикантов. Совместное действие шунгита сульфата меди и сульфата кадмия на ракообразных показало, что шунгит в минимальной из пяти исследованных концентраций 0,01 г/л оказывал защитное действие на дафний. При высоких концентрациях шунгита дафнии погибали, и шунгит не защищал их от действия токсикантов. Таким образом, в зависимости от концентрации шунгит может стимулировать рост водных организмов, инактивировать токсическое действие различных соединений и вместе с тем в больших концентрациях тормозить развитие гидробионтов. Поэтому при выборе шунгита для очистки питьевой воды с большой осторожностью надо относиться к широко рекламируемым, но не прошедших необходимых клинических испытаний в лабораторных условиях препаратов.

Ключевые слова: Шунгит, водоросли, бактериопланктона, фуллерен, Дафнии магна, эффективность фотосинтеза, тяжелые металлы, антибиотики.

THE DIFFERENT ACTION OF SHUNGYT ON THE GROWTH OF PLANKTON ORGANISMS IN THE PRESENCE OF HEAVY METALS AND SINGLE OXYGEN

Dallakyan G.A.
Moscow State University M.V. Lomonosov
Leninsky Hills, 1, build. 12, Moscow, 119991, Russia
E-mail: honaris@bk.ru

Abstract. The effectiveness of the toxic effect of singlet oxygen on the culture of algae Sc. Quadricauda. If there is 100 g / l of schungite in the environment, the protection against the toxic effect of singlet oxygen on algae occurs during the entire time of culture growth. The concentration of schungite 100 g / l without eosin stimulates the growth of the culture, at a concentration of more than 200 g / l slows down. In aquarium water, with the addition of antibiotics, the number of bacteria decreased 12-fold. In the presence of schungite and antibiotics, the number of bacteria decreased only 1.7 times in comparison with the initial values. In the presence of only schungite in the environment, the growth of culture is stimulated. Shungite, depending on the concentration, can be used as a growth stimulant for microorganisms and as a protector against toxicants. The combined action of schungite copper sulfate and cadmium sulfate on crustaceans showed that schungite in the minimum of five concentrations of 0.01 g / l tested had a protective effect on daphnia. At high concentrations of schungite, daphnia perished, and shungite did not protect them from the action of toxicants. Thus, depending on the concentration, shungite can stimulate the growth of aquatic organisms, inactivate the toxic effect of various compounds and at the same time in large concentrations inhibit the development of hydrobionts. Therefore, when choosing shungite for drinking water purification with great caution, one must treat widely advertised, but not undergone the necessary clinical tests in laboratory conditions of preparations.

Keywords: schungite, algae, bactero-plankton, fullerene, Daphnia magna, photosynthesis efficiency, heavy metals, antibiotics

Введение.

В настоящее время о целебных свойствах шунгита существует значительное количество литературы, однако о происхождении этого камня и механизме проявления уникальных лечебных свойств до сих пор идут дискуссии. В действительности отсутствуют научно обоснованные объяснения причины высокой биологической активности шунгита. Ряд исследователей ссылается на присутствие в шунгите фуллеренов. При этом следует учитывать весь комплекс достаточно сложных биологически активных соединений, а также металлов, входящих в состав органической массы и минеральной составляющей шунгита.

В 1992 г. в шунгите Карелии был обнаружен фуллерен [1]. Показано, что в проходящей через шунгит воде быстро окисляются органические молекулы и свободные радикалы [2]. При этом содержание в ней бактерий снижается в десятки раз [3]. Важную роль в очистке воды от загрязняющих веществ и стабилизации

энергетического баланса воды играют абсорбционные свойства шунгита и фуллереноподобные вещества. Ряд авторов предполагают, что фуллерены, входящие в состав шунгита, изменяют окислительно-восстановительный потенциал среды и структуру воды, тем самым способствуют очистке воды от вредных для здоровья человека веществ [4]. Водоросли, бактерии и ракообразные в водоеме являются первичными мишенями для различных вредных веществ, поступающих в водные экосистемы. Кроме того, они являются общепризнанным тест-объектом для биотестирования токсического действия различных веществ. Целью данной работы является исследование защитных свойств шунгита от действия тяжелых металлов, эозина и антибиотиков на различные гидробионты в условиях постоянного присутствия шунгита в среде культивирования во время роста культуры.

Методика.

Объектом исследования была альгологически чистая культура Scenedesmus quadricauda (Turp.) Bréb, которая выращивалась в конических колбах объемом 100 мл в среде Успенского № 1 при температуре 25 °С и круглосуточном освещении 15 мкмоль квантов м.-2 с.-1. В экспериментах использовался шунгит с Зажогинского месторождения от компании «Арго». Из расчета 100 г/л и 200 г/л на развитие водорослей в накопительной культуре. Генератором синглетного кислорода служил фотосенсибилизатор эозин (динатриевая соль эозина $C_{20}H_8Br_4Na_2O_5$) в количестве 5 мг/л. Эозин и шунгит добавляли в среду однократно на 3 сутки после посева культуры водорослей. Шунгит предварительно обрабатывали согласно инструкции изготовителя с учетом специфики выращивания водорослей. Интенсивность флуоресценции хлорофилла и кинетика индукции флуоресценции рассчитывали по показателям Fo и Fm, которые измерялись на приборе «МЕГА-25» [5]. Для определения численности гетеротрофных бактерий (ЧБ) использовали метод эпифлуоресцентной микроскопии с окраской клеток водным раствором флуорохрома акридинового оранжевого. Для оценки влияния шунгита (10 г/л) на ЧБ после воздействия антибиотиков, использовали смесь двух антибиотиков: ванкомицина (100 мг/л) и пенициллина (5 мг/л). Для проведения исследований на ракообразных использовали синхронизированные лабораторные культуры Daphnia magna Straus.При работе с дафниями в емкости наливали по 100 мл растворов и помещали по 10 рачков в трехкратной повторности. Все опыты сопровождались контрольными испытаниями. Эксперименты по совместному влиянию шунгита и солей тяжелых металлов проводили с условной концентрацией шунгита 0,01 г/л сульфата меди и сульфата кадмия от 0,00025 до 0,0020 г/л. Продолжительность опытов составляла 24-72 часов. Начиная со вторых суток опыта рачков кормили C. vulgaris согласно методике [6]. Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Office Excel 2010 с использованием пакета анализа данных. Для графического отображения полученных результатов, рассчитывали среднее число клеток водорослей и доверительный интервал. Оценку статистической значимости различий контрольной и опытных выборок проводили при помощи критерия Стьюдента для уровня значимости 0,05. Для вычисления полулетальных концентраций (ЛК50) металлов для ракообразных в острых опытах использовали пробит-анализ [10].

Результаты и обсуждения.

Как показано (см. рис.1) скорость прироста популяции водорослей Scenedesmus quadricauda больше в присутствии шунгита в среде (кр. 2), хотя в питательной среде присутствует эозин. Присутствие в среде только эозина оказывает наименьшую скорость прироста популяции (кр. 3).

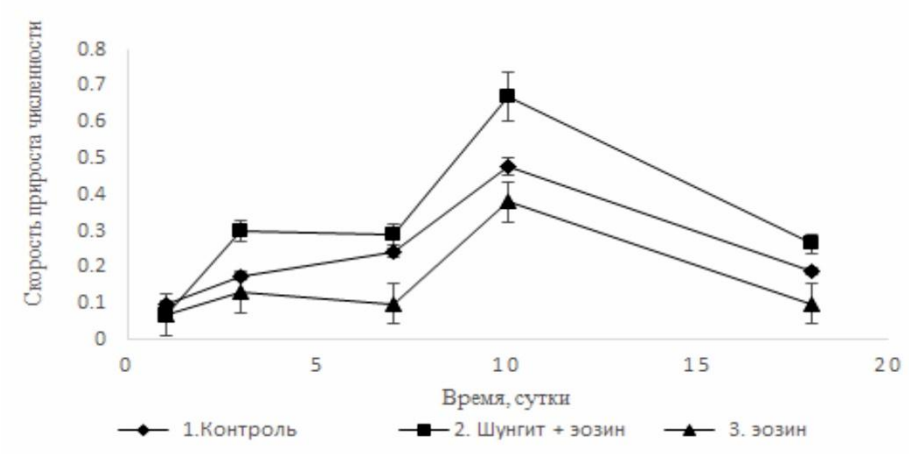

Рисунок 1 – Скорость прироста численности водорослей $P=\Delta N/\Delta t$

Ранее в наших опытах было показано, что шунгит инактивирует токсическое действие бенгальского розового [7]. В этих работах выдвигались гипотезы, объясняющие действие шунгита. Характерные максимумы на 3-ий и 10-ий день роста культуры (рис.1) в наших опытах соответствуют началу и концу логарифмической фазы роста популяции. Вместе с исследованием прироста численности популяции были изучены интенсивность флуоресценции хлорофилла водорослей на рисунке 2 представлены изменения эффективности фотосинтеза $\psi=Fv/Fm$, рассчитанная по формуле $\psi= (Fm-Fo)/Fm$, где Fo - интенсивность флуоресценции при открытых реакционных центрах (РЦ) фотосистемы II Fm - интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах [5] При сопоставлении данных (см. рис. 2) и скорости прироста клеток Scenedesmus quadricauda

(см. рис. 1) видно, что эффективность фотосинтеза больше в пробах, где скорость прироста культуры выше. Эта закономерность наблюдается для всех проб вне зависимости от наличия исследуемых веществ в среде. Полученные данные подтверждают представления о том, что эффективность фотосинтеза коррелирует со скоростью прироста культуры. При больших концентрациях шунгита 200 г/л и выше шунгит не защищал водоросли от токсического действия синглетного кислорода, и тормозил их рост.

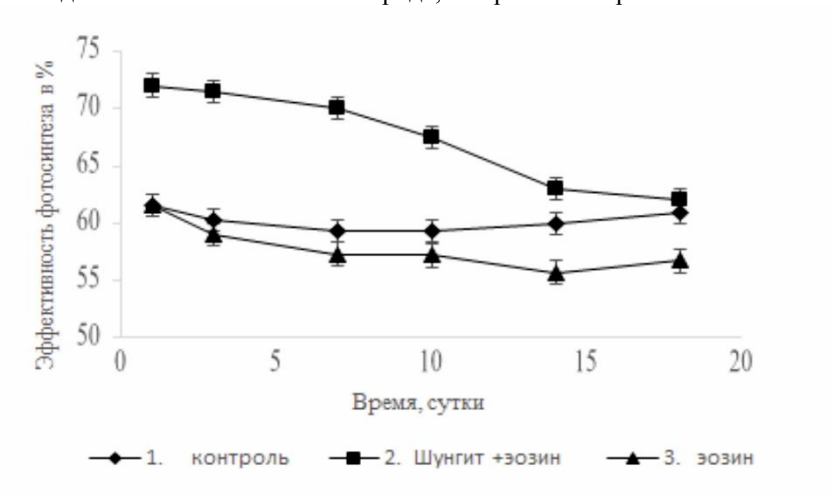

Рисунок 2 – Эффективность фотосинтеза в процентах (Fv/Fm) в различных условиях среды

После того, когда было обнаружено стимулирующие и защитное свойства шунгита (100г/л) на развитие водорослей, было исследовано возможности использовать шунгит как протектор от антибиотиков. Для проведения этого эксперимента нами были предварительно подобраны такие действующие концентрации двух антибиотиков - ванкомицина и пенициллина, которые оказывали выраженное бактериостатическое действие на гетеротрофный бактериоценоз аквариумной воды. Они составили 100 мг/л и 5 мг/л соответственно. Через сутки после внесения ванкомицина и пенициллина 100 мг/л и 5 мг/л численность гетеротрофных бактерий в аквариумной воде с антибиотиками снизилась до 0.04±0.001 млн. кл/мл, т.е. более чем в 10 раз по сравнению со стартовыми значениями этого параметра (0.51±0.01 млн. кл/мл). В варианте «Шунгит 10 г/л +антибиотики» численность бактериальных клеток через сутки после внесения антибиотиков тоже снизилась и составила 0.3±0.01 млн. кл/мл, т.е. оказалась почти в 8 раз выше, чем в варианте «Антибиотики» с внесением только антибиотиков без шунгита (см. рис. 3).

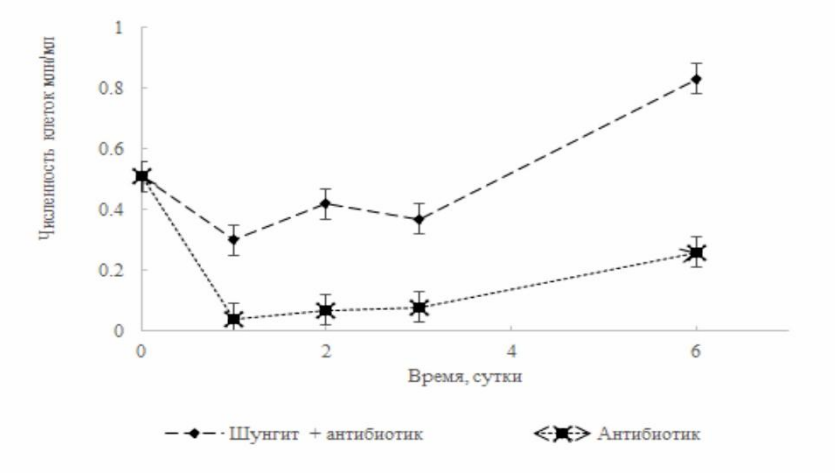

Рисунок 3 – Изменение численности бактериальных клеток в аквариумной воде под влиянием шунгита и антибиотиков

В концентрации шунгита выше 150 г/л численность бактерии снижалась и шунгит не защищал их от токсического действия антибиотиков.

Следующим этапом нашей работы было исследовано влияние шунгита на развитие Дафнии магна являющимися наиболее чувствительными к токсическим веществам.

Таблица 1 – Полулетальные концентрации соединений тяжелых металлов (мг/л) для Daphimagna в присутствии шунгита

Время ,часы	Сульфат кадмия	Сульфать меди	Сулфвть кадмия+ Шунгит (0,01 г/л)	Сулбфать меди + Шунгит (0,01 г/л)
24	0.29	0.29	0.38	0.36
48	0.13	0.23	0.29	0.28
72	0.02	0.18	0.04	0.24

Результаты экспериментов на Daphnia magna с солями кадмия, меди и приведены в таблице. По величинам расчетных полулетальных концентраций (ЛК50) видно, что присутствие шунгита (0,01 г/л) оказывает протекторное действие на ракообразных при воздействии солей тяжелых металлов при всех приведенных сроках экспозиции в остром эксперименте (24-72 часов). Показано, что острая токсичность тяжелых металлов для рачков снижается в ряду Cd – Cr. Добавление шунгита в концентрации 0,01 г/л в растворы тяжелых металлов приводило к повышению устойчивости рачков к токсическому воздействию в разной степени. Защитные свойства шунгита в концентрации 0,01 г/л возрастали в ряду токсичности металлов Cd – Cr, то есть чем токсичнее металл – тем менее выражен протекторный эффект. Шунгит только в минимальной из исследованных концентраций 0,01 г/л снижал токсичность на дафний.

Таким образом комбинированном действии 100 мг/л шунгита и эозина шунгит инактивирует токсическое действие синглетного кислорода. Выше 200г/л шунгита рост культуры водорослей замедлялся эффективность фотосинтеза снижалась и шунгит не защищал водоросли от токсического действия синглетного кислорода. Шунгит в концентрации 10г/л подавляет токсическое действие антибиотиков. Выше 150 г/л численность бактерии снижалась и шунгит не защищал их от токсического действия антибиотиков. Шунгит только в концентрации 0,01 г/л снижал токсичность тяжёлых металлов на дафний. Снижение биологических показателей на гидробионты при воздействии высоких концентрации 1 г/л шунгита для Дафний магна, (для бактерии выше 150 г/л, для водорослей 200 г/л) возможно, связано с увеличением содержания ионов переменной валентности и фуллеренов в среде, приводящих к усилению образования активных форм кислорода в воде, что приводит к гибели гидробионтов. Кроме этого, снижение выживаемости и плодовитости ракообразных связано с механическим повреждением фильтрационного аппарата дафний шунгитом в высоких концентрациях (1-100 г/л).

Анализ наших данных показывает, что концентрации шунгита для инактивации тяжелых металлов в тысячи раз отличаются для водорослей и ракообразных. Таким образом в зависимости от концентрации шунгита, он может стимулировать рост водных организмов, инактивировать токсическое действие различных соединений и вместе с тем в больших концентрациях тормозить развитие гидробионтов. Поэтому при выборе шунгита для очистки питьевой воды с особой осторожностью необходимо выбирать концентрацию. Полученных данных достаточно для того, чтобы с большой осторожностью относиться к широко рекламируемым, но не прошедшим необходимых испытаний препаратам, которые предлагаются в оздоровительных целях населения и для «улучшения» качества такого жизненно необходимого для человека продукта, как питьевая вода.

Список литературы / References:

1. Buseck P.R. Fullerenes from the geological environment. *Science*, 1992, vol. 257, no. 5067, pp. 215-217

2. Voeikov V.L. Reactive oxygen species (ROS); pathogens or sources or sources of vital energy? *Complementari Medicine*, 2006, vol. 12, no. 2, pp. 111-118.

3. Дриаева М.Д., Сыпченко А.Я., Туктамышев И.Ш., Удина Н.В., Хадарцев А.А. Изучение влияния свойств шунгита на микроорганизмы. *Вестник новых медицинских технологий*, 2003, т. 10, № 4, с. 60-61. [Driayeva M.D., Sypchenko A.Ya., Tuktamyshev I.Sh., Udina N.V., Khadartsev A.A. Izucheniye vliyaniya svoystv shungita na mikroorganizmy. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*, 2003, vol. 10, no. 4, pp. 60-61. (In Russ.)]

4. Ширинкин С.В., Шапошников А.А., Волкова Т.О., Андриевский Г.В., Давыдовский А.Г. Гидратированный фуллерен, как инструмент для понимания роли особых структурных свойств водной среды живого организма для его нормального функционирования. *Научные ведомости белгородского государственного университета. Серия: медицина-фармация*, 2015, т. 31, № 16 (213), с. 20-30. [Shirinkin S.V., Shaposhnikov A.A., Volkova T.O., Andriyevskiy G.V., Davydovskiy A.G. Gidratirovannyy fulleren, kak instrument dlya sozdaniya spetsial'nykh strukturnykh svoystv vodnoy sredy zhivogo organizma dlya yego normal'nogo funktsionirovaniya. *Nauchnyye vedomosti belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: meditsina-farmatsiya*, 2015, vol. 31, no. 16 (213), pp. 20-30. (In Russ.)]

5. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Погосян С.И. *Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла*. М.: «МАКСПресс», 2010, 116 с. [Matorin D.N., Osipov V.A., Yakovleva O.V., Pogosyan S.I. *Opredeleniye sostoyaniya rasteniy i vodorosley po fluorestsentsii khlorofilla*. M.: «MAKSPress», 116 p. (In Russ.)]

6. USEPA—US Environmental Protection Agency (2002) *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. EPA-821-R-02-012. Washington, DC. pp 120-154.

7. Даллакян Г.А., Агеева И.В., Братковская Л.Б. Влияние шунгита на функциональную активность микроводорослей Scenedesmus quadricauda. *Вода: химия и экология*, 2013, № 10, с. 102-106. [Dallakyan G.A., Ageyeva I.V., Bratkovskaya L.B. Vliyaniye shungita na funktsional'nuyu aktivnost' mikrovodorosley Scenedesmus quadricauda. *Voda: khimiya i ekologiya*, 2013, no. 10, pp. 102-106. (In Russ.)]

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ Ca^{2+} И ФЛАВОНОИДОВ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ ГОЛУБЯ

Сюсин И.В., Ревин В.В., Девяткин А.А.
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»
ул. Ульянова, 26б, г. Саранск, 430000, РФ
e-mail: ilya.sysin@gmail.com

Аннотация. С помощью метода лазерной интерференционной микроскопии показано, что увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубирования до 3,5 мМоль приводит к изменениям морфологических характеристик эритроцитов голубя. Происходит уменьшение площади клетки и оптической разности хода, которая прямо пропорциональна толщине клетки. Добавление в суспензию эритроцитов, инкубируемых в присутствии высоких концентраций кальция, флавоноидов, выделенных из плодов черной смородины, значения площади и оптической разности хода были сравнимы с контрольными значениями. Мы предполагаем, что из-за своих свойств флавоноиды связывают свободные ионы Ca^{2+}, что приводит к ингибированию процессов направленных на изменение морфологических характеристик эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты голубя, ионы кальция, лазерно-интерференционная микроскопия.

EFFECT OF HIGH CONCENTRATIONS OF IONS Ca^{2+} ON MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PIGEON'S ERYTHROCYTES

Syusin I.V., Devyatkin A.A., Revin V.V.
Ogarev Mordovia State University
Ulyanov St., 26b, Saransk, 430000, Russia
e-mail: ilya.sysin@gmail.com

Abstract. Using the method of laser interference microscopy, it was shown that an increase in the concentration of Ca^{2+} ions in the incubation medium to 3.5 mM results in changes in the morphological characteristics of the pigeon's erythrocytes. There is a decrease in the area of the cell and the optical path difference, which is directly proportional to the thickness of the cell. Adding to the suspension of erythrocytes incubated in the presence of high calcium concentrations, flavonoids isolated from black currant fruit, the area values and the optical path difference were comparable with the control values. We assume that, because of their properties, flavonoids are bound by free Ca^{2+} ions, which leads to inhibition of processes aimed at changing the morphological characteristics of erythrocytes.

Keywords: Pigeon erythrocytes; Calcium ions; Laser-interference microscopy.

Ионы Ca^{2+} являются универсальными физиологическими агентами, которые участвуют во многих процессах жизнедеятельности эритроцитов. Действия Ca^{2+} проявляется на уровне целой клетки [1-4], на состояние бислоя клеточной мембраны [5], на уровне мембраносвязных и отдельных ферментных систем [6-8]. В литературе имеются данные о том, что увеличение ионов Ca^{2+} приводит к изменению объема клетки [9] и снижению деформируемости эритроцитов из-за работы Ca-зависимых K-каналов [10]. Однако, в настоящее время все еще мало данных о механизмах влияния высоких концентраций ионов Ca^{2+} на морфологические характеристики эритроцитов и механизмах защиты клеток от осмотического стресса.

Для защиты организма от воздействия высоких концентраций металлов можно применять фенольные соединения, которые способны хелатировать ионы металлов [11]. Из литературных данных известно, что ионы Ca^{2+} активны только в свободном состоянии. Однако, когда ионы Ca^{2+} образуют комплекс с каким-либо веществом, то активность данных ионов уменьшается.

В связи с выше изложенным, представляло интерес установить корреляцию между морфологическими характеристиками эритроцитов при действии высоких концентраций ионов Ca^{2+} и флавоноидов.

Объектом исследования служили эритроциты периферической крови голубя. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (5000 ед/мл). Эритроциты получали путем центрифугирования цельной крови при 1500g в течении 15 минут, эритроциты подвергали трехкратной промывке фосфатным буфером (pH=7,4). Эритроциты разбавляли 1:1 (v/v) фосфатным буфером (pH=7,4) и добавляли раствор $CaCl_2$, так что бы конечная концентрация Ca^{2+} составляла 3,5 мМ и раствор флавоноидов, выделенных из плодов черной смородины, в концентрации 0,0025 мг/мл. Инкубацию вели при температуре 40^0C. Забор проб осуществляли по прошествии 0, 10, 20, 30 минут.

Морфологические изменения в эритроцитах изучали с помощью метода ЛИМ на автоматизированном интерференционном микроскопе МИИ-4М (Россия). С помощью данного метода исследуется динамика