


**Министерство здравоохранения Республики Беларусь  
Республиканское унитарное предприятие  
«Научно-практический центр гигиены»**

«УТВЕРЖДАЮ»  
Заместитель министра  
здравоохранения – Главный  
государственный санитарный врач  
Республики Беларусь

  
Н.П. Жукова  
«19» декабря 2018 г.  
Регистрационный номер № 007-1018

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ,  
АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И АНТИМУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО  
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Учреждение-разработчик: республиканское унитарное предприятие  
«Научно-практический центр гигиены», учреждение образования  
«Белорусский государственный университет»

Авторы: В.Г. Цыганков, Н.В. Дудчик, С.И. Сычик, А.В. Адамович,  
О.А. Емельянова, В.В. Шевляков, В.А. Филонюк, А.М. Бондарук,  
Т.Н. Головач, В.П. Курченко.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра —  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ Н. П. Жукова  
19.12.2018  
Регистрационный № 007-1018

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ,  
АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И АНТИМУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО  
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: РУП «Научно-практический центр гигиены»,  
УО «Белорусский государственный университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук В. Г. Цыганков, д-р мед. наук, доц. Н. В. Дудчик, канд.  
мед. наук, доц. С. И. Сычик, А. В. Адамович, канд. биол. наук О. А. Емельянова,  
д-р мед. наук, проф. В. В. Шевляков, канд. мед. наук, доц. В. А. Филонюк, канд.  
мед. наук А. М. Бондарук, Т.Н. Головач, В.П. Курченко

Минск 2018

# ГЛАВА 1

## НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) устанавливает методы для выявления и количественной оценки антиоксидантной, антибактериальной и антимуtagenной активности биологически активных веществ объектов растительного происхождения (сырья, продуктов их переработки, водных и органических экстрактов, биологически активных добавок и др.).

2. Методы, изложенные в настоящей инструкции, могут быть использованы для скрининга и комплексной оценки биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения как самостоятельно, так и в батарее тестов.

3. Инструкция предназначена для научно-практических учреждений, учреждений образования, центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора и других организаций, осуществляющих разработку, исследование и оценку биологических свойств лекарственного фитосырья, продуктов их переработки, а также фармакологических препаратов/БАД на их основе и др.

4. Лаборатории, проводящие данные исследования, должны иметь полученное в установленном порядке разрешение на работу с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими объектами (I–II групп патогенности).

5. При применении методов оценки антибактериального и антимуtagenного потенциала БАВ растительного происхождения должны быть учтены следующие условия и ограничения:

в зависимости от природы оцениваемого объекта (растворимость, компонентный состав, сведения о возможной токсичности и др.) допускается как непосредственное внесение образцов в среду проведения исследования, так и исследование вытяжек из них;

ограничением при исследовании природных объектов является высокая начальная контаминация образцов, что требует включения этапа стерилизации в ходе пробоподготовки образцов;

ограничением при исследовании химических веществ и их смесей может быть их бактериостатическое действие. В этом случае в опыте должны быть использованы концентрации исследуемых веществ, не оказывающих подобного действия на тест-организм.

6. В настоящей инструкции используются следующие термины и их определения:

антибактериальная (антимикробная) активность БАВ — свойства биологически активных веществ, позволяющие им при воздействии на микроорганизмы подавлять их рост, жизнедеятельность или приводить к гибели;

антимуtagenная активность БАВ — способность биологически активных веществ оказывать генопротекторное действие в отношении различных мутагенов при их совместном воздействии на тест-организмы;

антиоксидантная активность БАВ — способность биологически активных веществ взаимодействовать с потенциально опасными радикалами или окислителями;

тест-штамм — чистая культура микроорганизма, чувствительная к определенному веществу, воздействию или обладающая специфическими характеристиками, позволяющими использовать данный штамм для экспериментального подтверждения заданных свойств исследуемых образцов.

## ГЛАВА 2 ОБОРУДОВАНИЕ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

	Нормативная документация
1. Оборудование	
Микробиологический анализатор с электрохимическим (импедансным) принципом детекции	ГОСТ 19881-74
Микроскоп биологический	ГОСТ 28489-90
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений $pH \pm 0,1$ (pH-метр)	ГОСТ 19881-74 ГОСТ 25.7416.0171
Весы лабораторные 2–4 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1000 г	ГОСТ 24104-2001
Вортекс для встряхивания жидкости в пробирках	
Денситометр (прибор для измерения мутности)	
Центрифуга лабораторная	
Диспенсер суспензимального раствора	
Автоматические пипетки переменного объема 20–200, 100–1000, 1000–5000 мкл	
Водяная баня с терморегулятором, поддерживающая температуру 100 и 45 °С с погрешностью $\pm 1$ °С	
Термостат электрический с диапазоном рабочих температур 28–55 °С с погрешностью $\pm$ ) °С	ТУ 64-1-1382-72
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317-87
Стерилизатор паровой с рабочим давлением пара не более 0,22 МПа (2,2 кгс/см <sup>2</sup> )	ТУ 9451-106-12517820-2003
Стерилизатор суховоздушный для температурного режима 180 $\pm$ 5 °С	
Дистиллятор электрический	ТУ 9452-014-22211860-2009
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С, с ценой деления шкалы 1 °С	ГОСТ 28498-90
2. Материалы	
Кюветы одноразовые полистирольные с длиной оптического пути 10 мм объемом 1,5 мл	
Наконечники с фильтром к автоматическим пипеткам переменного объема 20–200, 100–1000 мкл	ГОСТ 21241-89
Наконечники без фильтра к автоматическим	

пипеткам переменного объема 20–200, 100–1000, 1000–5000 мкл	
Стандарт мутности МакФарланда на 5 ед.	
Петли бактериологические диаметром 2 мм	
Пипетки стерильные стеклянные или пластиковые объемом 1, 5, 10 мл	ГОСТ 29227-91
Груши резиновые разные	
Чашки биологические (Петри) диаметром 90 мм	ГОСТ 23932-90Е
Планшеты для культивирования клеток стерильные	
Бюксы или стаканчики для взвешивания	ГОСТ 25336-82
Воронки разные лабораторные	ГОСТ 25336-82
Шприцы стерильные на 5 мл	ГОСТ 22967-90
Стерильные фильтровальные насадки на шприц для стерильной фильтрации	
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	ГОСТ 25336-82
Пробирки типа «эппендорф» нестерильные объемом 1,5, 2 и 5 мл	
Флаконы и банки стеклянные или пластиковые с навинчивающейся крышкой или притертой пробкой для приготовления и хранения растворов и реактивов вместимостью 50, 100, 400 мл	ГОСТ 1770-74 ГОСТ 25336-82
Пробки различных размеров: силиконовые, резиновые и другие, выдерживающие высокую температуру, стерилизацию	
Спектрофотометр	ГОСТ 14686-69
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90Е
Стекла предметные	ГОСТ 9284-75
Штативы для пробирок	
Мешалка лабораторная	
Маркеры водостойкие	
3. Реактивы, растворы, питательные среды	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Вода деионизированная	ГОСТ ISO 3696-2013
Агар микробиологический	ФС 42-188ВС-90 ГОСТ 17206-96
Питательный бульон (мясопептонный бульон (МПБ) или другая жидкая питательная среда с аналогичными ростовыми свойствами)	ГОСТ ISO 11133-2016
Питательный агар (мясопептонный агар (МПА) или другая плотная питательная среда с аналогичными ростовыми свойствами)	ФС 42-188ВС-90
Дифференциально-диагностические среды (агар Эндо для энтеробактерий, Pseudomonas агар для псевдомонад, Байрд-Паркер агар для стафилококков)	ФС 42-188ВС-90

или другие в зависимости от используемых тест-микроорганизмов)	
Агар Сабуро	ФС 42-188ВС-90
2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат (АБТС), ч.д.а.	
Персульфат аммония (аммоний надсерноокислый) 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (Тролокс), ч.д.а.	ГОСТ 20478-75
Физиологический раствор	ГОСТ 10444.1-84
Фосфатный буферный раствор	ГОСТ 4919.2-77
Масло вазелиновое стерильное	ГОСТ 3164-78
Спирт этиловый 96 %	ТУ 6-091710
Глюкоза, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 6038-79
Аммония цитрат двузамещенный, х.ч. или ч.д.а.	ТУ 6-09-01-755-8
Аммония хлорид, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 3773-72
Аммония сульфат, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 9097-82
Натрия цитрат трехзамещенный, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 31227-2004
Натрия хлорид, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4233-77
Натрия фосфат двузамещенный, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4172-76
Калия гидрофосфат двухзамещенный, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 2493-7
Калия дигидрофосфат, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 2493-75
Калия хлорид, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4198-75
Магния сульфат 7-водный, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4234-77
Магния хлорид 6-водный, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4523-77
Мочевина	ГОСТ 4209-77
D-биотин, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 2081-2010
L-гистидин, х.ч. или ч.д.а.	
Бромкрезоловый пурпурный, х.ч. или ч.д.а.	
Натриевая соль глюкозо-6-фосфата, ч.д.а.	
НАДФ (никотинамидадениндинуклеотид фосфат), ч.д.а.	
Фракция S-9 печени крыс	
4. Тест-штаммы микроорганизмов:	
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
<i>Escherichiacoli</i> ATCC 11229	
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9372	
<i>Candida albicans</i> ВКПМ Y-3108 (ATCC 10231)	
- <i>Aspergillus niger (brasiliensis)</i> ATCC 16404	
При испытаниях могут быть использованы иные тест-штаммы	

5. Все исследования выполняют при температуре окружающего воздуха в лаборатории от 18 до 27 °С, относительной влажности воздуха не более 85 % при 5 °С, атмосферном давлении 84–106 кПа (630–800 мм рт. ст.).

6. В работе используют стандартное оборудование микробиологических лабораторий.

7. При использовании электроприборов частота переменного тока  $50 \pm 1$  Гц, напряжение сети  $220 \pm 10$  В.

8. Допускается использование оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками для проведения исследований в соответствии с настоящей инструкцией. При их использовании следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

### ГЛАВА 3

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ, РЕАКТИВОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

1. Посуда, применяемая для микробиологического анализа, должна быть стерильной; для определения антиоксидантной активности — химически чистой.

2. Для культивирования тест-культур допускается использование как стеклянной, так и пластиковой посуды.

3. Среда и растворы для определения антибактериальной и антимуtagenной активности готовят на дистиллированной воде и после приготовления стерилизуют автоклавированием или кипячением. Допускается стерилизация путем фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

4. Растворы для определения антиоксидантной активности готовят на деионизированной воде.

5. Водный агар 2 %: 20 г агара растворить в воде, довести раствор до объема 1000 мл.

6. Мясо-пептонный агар 1,5 и 2 %: 15 и 20 г агара соответственно на 1000 мл (МПБ).

7. Дифференциально-диагностические среды в зависимости от используемого тест-штамма микроорганизма готовят в соответствии с действующими ТНПА или рекомендациями производителя (при использовании готовых коммерческих сред).

8. Солевой концентрат:

для чашечного теста Эймса: цитрат натрия трехзамещенный — 2 г,  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  — 42 г,  $KH_2PO_4$  — 18 г,  $(NH_4)_2SO_4$  — 4 г растворить в воде, довести раствор до объема 1000 мл, pH = 7,2;

для планшетного теста Эймса: цитрат натрия трехзамещенный — 0,57 г,  $K_2HPO_4$  — 7 г,  $KH_2PO_4$  — 2 г,  $(NH_4)_2SO_4$  — 2 г,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  — 0,2 г растворить в 500 мл воды. Стерилизовать мембранной фильтрацией.

9. Минимальная среда: солевой концентрат развести стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:3.

10. Раствор глюкозы 20 %: D-глюкоза — 200 г, вода — 800 мл.

11. Раствор сернокислого магния 1%:  $MgSO_4 \times 7H_2O$  — 1 г растворить в 99 мл воды.

12. Селективный агар 1,5 % (нижний слой): водный агар — 300 мл, солевой концентрат — 100 мл, раствор глюкозы — 10 мл, раствор сернокислого магния — 2 мл.

13. Полужидкий минимальный агар 0,7 %: агар — 7 г, NaCl — 6 г растворить в воде, довести раствор до объема до 1000 мл.

14. Раствор гистидина:

0,5 мМ (для чашечного теста Эймса): 9,6 мг L-гистидина растворить в 100 мл воды;

50 мкг/мл (для планшетного теста Эймса): 10 мг L-гистидина растворить в 200 мл воды. Стерилизовать мембранной фильтрацией.

15. Раствор биотина:

0,25 мМ (для чашечного теста Эймса): 6,1 мг D-биотина растворить в 100 мл воды;

400 мкг/мл (для планшетного теста Эймса): 80 мг D-биотина растворить в 200 мл воды. Стерилизовать мембранной фильтрацией.

16. Верхний полужидкий полуобогатенный агар: полужидкий минимальный агар 0,7 % — 80 мл, раствор гистидина — 10 мл, раствор биотина — 10 мл.

17. Раствор бромкрезолового пурпурного 1 мг/мл: 1 г бромкрезолового пурпурного растворить в 100 мл воды. Стерилизовать мембранной фильтрацией.

18. Среда для экспозиции (культуральная среда): минимальная среда — 100 мл, раствор гистидина 50 мкг/мл — 0,4 мл, раствор биотина 400 мкг/мл — 2 мл, 20 % раствор глюкозы — 4 мл. Среда необходимо готовить непосредственно перед использованием.

19. Индикаторная среда: минимальная среда — 100 мл, раствор гистидина 50 мкг/мл — 0,4 мл, раствор биотина 400 мкг/мл — 2 мл, 20 % раствор глюкозы — 4 мл, раствор бромкрезолового пурпурного — 2,5 мл. Среда необходимо готовить непосредственно перед использованием.

20. Раствор хлористого калия 0,15 М: 11,5 г KCl растворить в воде, довести раствор до объема 1000 мл.

21. Фосфатный буфер 0,2 М, pH 7,4: отдельно приготовить 0,4 М раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (27,2 г в 500 мл воды) и 0,4 М раствор  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (45,6 г в 500 мл воды). Затем слить растворы в соотношении — 19 мл первого раствора и 81 мл второго. После измерения pH объем буфера довести до 200 мл.

22. Раствор хлористого калия и хлористого магния для микросомальной активирующей смеси: KCl — 9,8 г,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  — 6,5 г, растворить в воде, довести раствор до объема 1000 мл.

23. Микросомальная активирующая смесь: на 10 мл активирующей смеси необходимо 5 мл 0,2 М фосфатного буфера, 1 мл раствора  $\text{KCl}$  и  $\text{MgCl}_2$ , 1 мл 50 мМ раствора глюкозо-6-фосфата, 1 мл 40 мМ раствора НАДФ, 3 мл фракции S-9 печени крыс. Раствор натриевой соли глюкозо-6-фосфата 50 мМ и раствор НАДФ 40 мМ необходимо готовить непосредственно перед составлением микросомальной активирующей смеси.

24. Физиологический раствор хлористого натрия: 8,5 г хлористого натрия растворить в 1000 мл воды.



25. Раствор АБТС 7 мМ (исходный водный раствор): 9,6 мг АБТС растворить в воде, довести раствор до объема 2,5 мл.

26. Раствор персульфата аммония 60 мМ: 13,7 мг персульфата аммония растворить в воде, довести раствор до объема 1 мл.

27. Фосфатный буфер 0,1 М, рН 7,4: отдельно приготовить 0,2 М раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13,6 г в 500 мл воды) и 0,2 М раствор  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (22,8 г в 500 мл воды). Затем слить растворы в соотношении — 19 мл первого раствора и 81 мл второго. После измерения рН объем буфера довести до 200 мл.

28. Раствор Тролокса 1 0мМ: 2,58 мг тролокса растворить в 1 мл фосфатного буфера (п. 21). Полученный раствор используют для приготовления калибровочных растворов стандарта антиоксиданта.

29. Раствор этилового спирта 75 %: этиловый спирт — 75 г, вода — 15 г.

30. Допускается использование готовых коммерческих растворов и реактивов с аналогичными по назначению техническими характеристиками для выполнения исследований в соответствии с настоящей инструкцией. При их использовании следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

## ГЛАВА 4

### ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ТЕСТ-ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. В качестве тест-микроорганизмов используют штаммы международной или национальной коллекции культур, штаммы, входящие в состав коллекции лаборатории или клинические изоляты микроорганизмов.

2. При работе с бактериальными тест-штаммами необходимо соблюдать правила безопасности при исследовании с микроорганизмов I–II групп патогенности в микробиологической лаборатории.

3. При использовании в качестве тест-штаммов патогенных микроорганизмов должны соблюдаться дополнительные требования безопасности.

4. Для определения антимикробного эффекта применяются штаммы микроорганизмов, характеризующиеся стабильными биохимическими свойствами, типичными для данного вида микроорганизмов, устойчивостью к внешним факторам среды, в т. ч. высушиванию, а также хорошими ростовыми свойствами, способностью к росту на неселективных питательных средах в аэробных условиях с формированием видимых глазом колоний в течение 24–48 ч.

5. Перед использованием тест-штаммов необходимо проведение биохимической идентификации используемых штаммов, определение чистоты культуры.

6. Для моделирования естественных условий контаминации объектов используются природные или сконструированные бактериальные консорциумы (субпопуляционные тест-модели).

7. Для оценки антимикробного действия рекомендуется использовать следующие микроорганизмы:

бактерии родов *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* др., а также консорциумы микроорганизмов — для оценки антибактериального эффекта;

споры и вегетативные клетки бактерий рода *Bacillus* — для оценки спороцидного эффекта;

грибы родов *Candida*, *Aspergillus* — для оценки фунгицидного эффекта.

8. Для исследования антимуtagenного эффекта используются генно-модифицированные штаммы *Salmonella typhimurium* ауксотрофные по гистидину (несущие мутации в генах, ответственных за синтез гистидина). Характеристика индикаторных штаммов приведена в приложении А.

9. Хранение микроорганизмов и их консорциумов осуществляется в отдельном холодильнике при температуре  $5\pm 3$  °С, в коробке с плотной закрывающейся крышкой. Пробирки, содержащие микроорганизмы, должны иметь прочно наклеенные этикетки с обозначением названия микроорганизма, номера штамма и даты пересева. Внутри коробки находится список с перечнем и количеством хранящихся микроорганизмов.

10. Для сохранности штаммов каждый музейный микроорганизм хранится в пробирке с плотно притертой крышкой на косяке МПА или агара Сабуро для грибов. Дополнительно каждый штамм микроорганизма хранится в пробирках с плотно притертой крышкой в столбике МПА или агара Сабуро под слоем стерильного вазелинового масла, высотой 2 см.

11. Для сохранения жизнеспособности штаммов производят их пересев с косяков 1 раз в 1 мес., а также не реже 1 раза в 6 мес. из-под масла.

12. Периодически при пересевах на новые косяки ауксотрофных штаммов *S. typhimurium*, необходимо проводить их проверку на соответствие генотипу тест-штаммов с использованием методов, приведенных в приложении Б.

13. Перед использованием музейного штамма микроорганизмов производят пересев на поверхность плотной питательной среды или в пробирку с жидкой питательной средой и инкубацию штамма при оптимальных температурных условиях в течение  $24\pm 2$  ч. Грибы инкубируют в течение  $48\pm 3$  ч.

14. Консорциумы хранятся и используются так же, как и отдельные тест-штаммы микроорганизмов.

15. Подготовка суспензии микроорганизмов для исследования антибактериального эффекта: одну или несколько изолированных колоний суточной культуры, выращенной на плотном питательном агаре МПА в течение  $24\pm 2$  ч при температуре  $36\pm 1$  °С, снимают с использованием стерильной петли и помещают в пробирку, содержащую 10 мл физиологического раствора. Суспензию тщательно гомогенизируют и доводят концентрацию микроорганизмов до  $10^6$ – $10^9$  клеток мл с использованием оптического стандарта мутности. Допускается также приготовление бактериальной суспензии методом смыва. Подготовленную бактериальную суспензию используют в течение 2 ч.

16. Подготовку суспензии дрожжей *C. albicans* проводят аналогично бактериальной суспензии. Для выращивания колоний используют агар Сабуро, посева инкубируют при температуре  $30\pm 1$  °С в течение 42–48 ч. Концентрация микроорганизмов в суспензии должна быть в пределах  $1,5$ – $8,0 \times 10^8$  клеток на мл.

17. Для использования плесневых грибов культуру выращивают на поверхности агара Сабуро в течение 7 дней при температуре  $30\pm 1$  °С. С помощью стеклянного шпателя конидии отделяют от поверхности агара и ресуспендируют в

10 мл физиологического раствора. Для удаления мицелия плесневых грибов суспензию фильтруют через стерильную вату и центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин. Осажденную массу повторно разводят в 10 мл физиологического раствора и центрифугируют. С использованием оптического стандарта мутности стерильным физиологическим раствором дважды центрифугированная суспензия доводится до концентрации  $1,5-8,0 \times 10^8$  спор на мл. Готовая суспензия спор плесневых грибов может храниться при температуре  $4 \pm 2$  °С в течение 2 дней.

Перед посевом микроскопически проверяется в используемой суспензии отсутствие проросших спор грибов.

18. Для приготовления суспензии спор микроорганизмов суточную бульонную культуру бактерий рода *Bacillus* пересевают в 10 пробирок на скошенную питательную среду (МПА) и инкубируют при температуре 30 °С (или другой температуре оптимальной для роста штамма) в течение 24 ч. Затем выросшую культуру смывают стерильной дистиллированной водой и переносят во флаконы объемом 250 мл, содержащие 100 мл скошенного агара. Взвесь во флаконе равномерно распределяют по поверхности среды. Флаконы инкубируют при 30 °С (или другой температуре оптимальной для роста штамма) в течение 7–10 сут в наклонном положении. На 5, 7 и 10-е сут культуру проверяют на интенсивность спорообразования, оценивая процент спор в культуре клеток при микроскопии. После завершения споруляции культуру осторожно смывают с поверхности агара 5 мл стерильной дистиллированной воды. Для удаления вегетативных клеток полученную суспензию прогревают при температуре 65–70 °С в течение 30 мин, центрифугируют в стерильных центрифужных пробирках с частотой вращения 2000 об/мин в течение 15 мин. Далее надосадочную жидкость осторожно удаляют, а осадок трехкратно промывают стерильной дистиллированной водой, чередуя с центрифугированием, после чего споры суспендируют в стерильной дистиллированной воде в соотношении 1:1 по объему. Готовая суспензия спор может храниться в холодильнике в течение 2 лет.

19. Перед использованием спор микроорганизмов определяют титр жизнеспособных спор. Для этого делают ряд десятикратных последовательных разведений суспензии с последующим высевом 0,1 мл суспензии спор на чашки Петри с МПА, затем инкубированием при температуре 30 °С (или другой температуре, оптимальной для роста штамма) в течение 48 ч.

20. При подготовке суспензии спор микроорганизмов проводят разведение суспензии спор с учетом определенного титра жизнеспособных спор до рабочей концентрации клеток  $10^6-10^9$  спор/мл.

21. Подготовка суспензии микроорганизмов для исследования антимуtagenного эффекта: суточную культуру микроорганизмов, выращенную на скошенном агаре в течение  $24 \pm 2$  ч, подращивают в МПБ (или другой жидкой среде с аналогичными ростовыми свойствами) при температуре 37 °С в течение 4–6 ч. Затем культуру центрифугируют, супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют минимальной средой до плотности  $\geq 10^9$  КОЕ/мл.

22. После использования микроорганизмы уничтожаются автоклавированием при температуре  $132 \pm 2$  °С и давлении 2,0 атм в течение 1,5 ч.

## ГЛАВА 5 ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БАВ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР

1. Оценка антимикробной активности методом диффузии в агар представляет собой качественный тест, позволяющий выполнить скрининговые исследования бактериотоксичности БАВ растительного происхождения.

2. Определение антимикробной активности данным методом основано на способности различных веществ угнетать рост микроорганизмов, что можно оценить визуально и инструментально путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-штаммов микроорганизмов (визуально различимы как зоны просветления).

3. Для сравнения могут быть использованы контрольные (стандартные) образцы — вещества (например, антибиотики), активность которых определяется в соответствии с международными биологическими стандартами или на основании показателей качества, установленных физико-химическими методами.

4. Число чашек для каждого образца должно быть достаточным для обеспечения статистической достоверности результатов (как правило, не менее 6).

5. При исследовании используют стерильную воду или другой стерильный растворитель, готовят ряд разведений исследуемых БАВ и при необходимости стандартных образцов (контроля). При использовании стандартных образцов рабочие растворы исследуемых БАВ готовят таким образом, чтобы их концентрации приблизительно соответствовали концентрациям контроля.

6. Луночный метод предполагает предварительное внесение тест-штамма в расплавленную питательную среду определенного состава (в зависимости от используемого тест-штамма).

7. При использовании суспензии вегетативных клеток культуру вносят в расплавленную среду температурой  $49 \pm 1$  °С, при использовании суспензии спор —  $65$ – $70$  °С.

8. Объем добавляемой суспензии вегетативных клеток или спор, добавляемый в среду, должен обеспечивать оптимальный рост тест-микроорганизма, а так же возможность четкой регистрации зон угнетения его роста (конечная концентрация —  $1 \times 10^6$ – $1 \times 10^7$  КОЕ/мл).

9. После внесения суспензии рабочей культуры среду осторожно перемешивают вращательными движениями.

10. Заливку чашек специфической средой, содержащей тест-штамм микроорганизма, производят в 1 или 2 слоя.

При использовании 2-слойного метода нижний слой представляет собой стерильную среду, верхний — стерильную агаровую среду, предварительно инокулированную соответствующим тест-микроорганизмом. В один слой заливают соответствующую среду, предварительно инокулированную тест-организмом.

11. Принципиальным моментом является однородность и равномерность заливки (толщины слоя) по всей площади чашки. Для этого каждую чашку

заливают 10 мл среды так, чтобы после застывания ее толщина составляла 2 мм, и устанавливают на строго горизонтальном столе.

12. После полного застывания среды на чашке Петри на ее поверхности на равном расстоянии друг от друга и края чашки делают 4–6 лунок диаметром 6–8 мм (с помощью стерильного сверла либо другого соответствующего приспособления).

13. Допускается хранение подготовленных таким образом чашек Петри в течение 2 дней в холодильнике.

14. В ходе исследования в лунки каждой чашки вносят равные объемы рабочих растворов изучаемого и стандартного образца (по 50–100 мкл) в последовательно возрастающих концентрациях.

15. После внесения всех растворов в лунки чашки выдерживают при комнатной температуре в течение 1–2 ч, а затем инкубируют при оптимальном температурном режиме для тест-штамма (в диапазоне 28–37 °С) в течение 16–72 ч.

16. По окончании инкубации антимикробную активность оценивают путем измерения диаметров зон угнетения роста тест-штаммов (с учетом диаметра лунки) с точностью до 0,1 мм. При наличии эллипсовидной зоны подавления роста измеряют максимальный и минимальный диаметры, а затем находят среднее значение.

17. В качестве альтернативы луночному методу может быть применен метод дисков, при котором суспензию тест-организмов засевают газоном на чашки Петри с плотной питательной средой (специфической в зависимости от используемого тест-штамма), и подсушивают при комнатной температуре 30–40 мин.

18. Далее на поверхность агара стерильным пинцетом помещают диски, пропитанные растворами исследуемого образца в различных разведениях.

19. Чашки инкубируют при оптимальном для используемого тест-микроорганизма температурном режиме (как правило,  $36 \pm 1$  °С) в течение 18–24 ч.

20. По окончании инкубации антимикробную активность оценивают путем измерения диаметров зон угнетения роста тест-штаммов (с учетом диаметра диска) с точностью до 0,1 мм. При наличии эллипсовидной зоны подавления роста измеряют максимальный и минимальный диаметры, а затем находят среднее значение.

21. Наличие зоны задержки бактериального роста свидетельствует о наличии антимикробного эффекта исследуемого образца в отношении использованного тест-штамма.

22. Результаты оценки антибактериального действия фиксируют в протоколе с указанием диаметра зоны ингибирования роста в мм.

## ГЛАВА 6

### КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БАВ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫМ МЕТОДОМ С ИМПЕДИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

1. Развитие популяции микроорганизмов в жидкой питательной среде имеет, как правило, несколько фаз: лаг-фазу, выраженную фазу быстрого роста

культуры (логарифмическую фазу), фазу замедления роста, стационарную фазу и фазу отмирания.

2. Метод с импедиметрической детекцией основан на оценке динамики электрохимических показателей при развитии популяции тест-штаммов в периодической системе культивирования.

3. Схема тестирования антимикробной активности импедиметрическим методом состоит из следующих этапов:

приготовление растворов образца в рабочем диапазоне концентраций;  
подготовка рабочей культуры тест-микроорганизма (гл. 4);  
подготовка оптимизированной среды культивирования;  
инокулирование приготовленной среды культивирования оптимизированного состава тест-штаммами или консорциумами до оптимальной конечной концентрации;

помещение в измерительные ячейки анализатора;  
внесение исследуемого образца в ряд концентраций;  
инкубирование в термоинкубаторе анализатора при оптимальной температуре в течение времени, необходимого для получения показателей  $IDT_1$  — время детекции роста микроорганизма в контроле (без внесения образца),  $IDT_2$  — время детекции роста микроорганизма в опыте (с внесением образца);

расчет качественных или количественных параметров оценки антимикробных свойств исследуемого образца.

4. В ходе исследования для предотвращения контаминации все манипуляции производят с соблюдением правил асептики.

5. Для приготовления разведений исследуемых образцов БАВ используют стерильную воду или физиологический раствор, а для гидрофобных субстанций — органические растворители (этиловый, изопропиловый и другие спирты), раствор диметилсульфоксида (ДМСО) и др.

6. Исходя из известных сведений о возможной токсичности и растворимости БАВ готовят ряд разведений, предпочтительно 10-кратных.

7. Среда культивирования инокулируют параллельно тест-штаммами до конечного содержания клеток  $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^8$  клеток/мл.

8. Исследования выполняют не менее чем в трех повторностях для каждой концентрации.

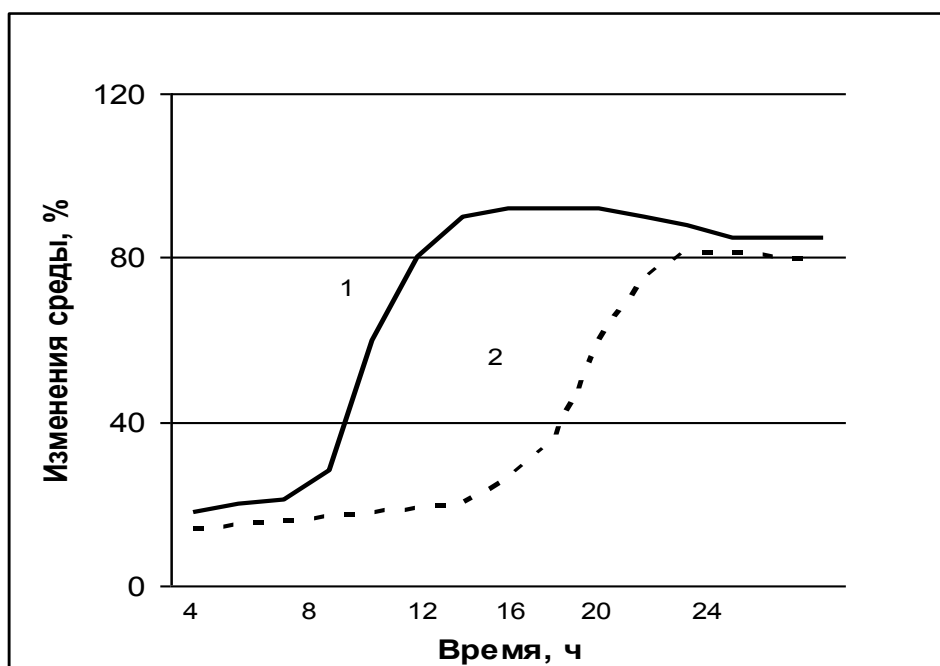
9. Контролем служит среда культивирования, инокулированная соответствующими тест-штаммами, в которую вместо образца вносят равный объем стерильного физиологического раствора.

10. Подготовленные образцы/ячейки инкубируют в термоинкубаторе анализатора при оптимальной для роста тест-штамма температуре в течение не менее 4–24 ч.

11. Результаты оценивают на основании показателя времени детекции IDT (Impedance Detection Time), а также графики изменения электрохимических показателей среды культивирования при росте популяции тест-штаммов.

12. Для оценки роста тест-штамма подбирают параметр детекции таким образом, чтобы кривая роста тест-культур на соответствующих питательных средах имела характерный вид: стабильную базовую линию, выраженную фазу

быстрого роста культуры (рисунок) и значительные значения изменений электрохимических показателей среды.



1 — в контроле без внесения исследуемого растительного объекта;  
2 — в опыте с внесением исследуемого растительного объекта

**Рисунок — Типичные графики роста тест-культур**

13. В качестве количественного критерия оценки антимикробной активности предлагается использовать показатель степени ингибирования  $I$ , который рассчитывают по формуле 1:

$$I = \frac{IDT_2 - IDT_1}{IDT_1} * 100\%, \quad (1)$$

где  $IDT_1$  — время детекции роста микроорганизма в контроле;  
 $IDT_2$  — время детекции роста микроорганизма в опыте.

14. При значении  $I$ , отличном от нуля, считают, что образец обладает антимикробной активностью.

15. Качественная оценка антимикробной активности образца производится по следующей шкале:

$I$  менее 15 % — слабая антимикробная активность в отношении тест-культуры;

$I$  от 15 до 50 % — умеренно выраженная антимикробная активность в отношении тест-культуры;

$I$  более 50 % — выраженная антимикробная активность в отношении тест-культуры.

## ГЛАВА 7

### КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БАВ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫМ МЕТОДОМ С ОПТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

1. При использовании инструментального метода с оптической детекцией для оценки модулирующего (стимулирующего или ингибирующего) действия БАВ растительного происхождения на тест-штаммы микроорганизмов в качестве критериально значимого показателя целесообразно использовать время наступления стационарной фазы развития популяции в культуре.

2. Стационарная фаза роста характеризуется максимальным накоплением биомассы культуры, что может быть оценено по изменению оптической плотности суспензии микроорганизмов.

3. Схема тестирования антимикробной активности оптическим методом состоит из следующих этапов:

приготовление растворов образца в рабочем диапазоне концентраций;  
подготовка рабочей культуры тест-микроорганизма (гл. 4);  
подготовка оптимизированной полусинтетической среды культивирования;  
внесение в среду культивирования суспензии выбранного тест-штамма микроорганизмов (бактерии, грибы) или консорциума;  
внесение исследуемого образца в ряду концентраций;  
инкубирование в термоинкубаторе при оптимальной температуре с периодической детекцией (с заданным промежутком времени);  
расчет качественных или количественных параметров оценки антимикробных свойств исследуемого образца.

4. *Порядок выполнения испытаний.* В пробирки объемом 50 см<sup>3</sup> с 10 см<sup>3</sup> жидкой среды культивирования вносят суспензию микроорганизмов с начальной концентрацией 10<sup>5</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> для дрожжеподобных и мицелиальных грибов, 1 × 10<sup>7</sup>–1 × 10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> для бактериальных культур, после чего добавляют образцы в исследуемом диапазоне концентраций. Контролем служит питательная среда, содержащая суспензию микроорганизмов, с равным объемом физиологического раствора вместо образца БАВ.

5. Пробирки культивируют в термостатируемых условиях при оптимальной для развития используемых тест-микроорганизмов температуре в диапазоне 20–28 °С для грибковых и 30–37 °С для бактериальных культур в течение времени, необходимого для достижения стационарной фазы роста тест-популяций.

6. Во время эксперимента производят периодические измерения оптической плотности культуры: с соблюдением правил асептики отбирают пробы в количестве 2 см<sup>3</sup> в начале опыта и через каждые 4 ч для грибковых культур или через 1 ч для бактериальных культур.

7. Рост микроорганизмов оценивают оптически, измерения производят не менее чем в трех повторностях для каждой исследуемой концентрации образца БАВ на спектрофотокориметре при длине волны  $\lambda = 540$  нм и длине оптического пути 1 см.



8. Время достижения популяцией микробной культуры стационарной фазы роста —  $D$  — определяется инструментально и характеризуется максимальным значением оптической плотности.

9. Направленность модулирующего действия исследуемых образцов, а также степень выраженности ингибирующего действия (степень проявления антимикробной активности) на тест-культуру микроорганизмов разной таксономической принадлежности оценивается на основе предложенного количественного показателя  $M$ , обоснованного корреляционной зависимостью между показателем оптической плотности среды культивирования и соответствующим модулирующим эффектом БАВ.

10. Показатель модулирующего действия исследуемых образцов  $M$  рассчитывают по формуле 2:

$$M = \frac{D_2}{D_1}, \quad (2)$$

где  $D_1$  — значение оптической плотности контроля в стационарной фазе;  
 $D_2$  — значение оптической плотности в опыте в стационарной фазе.

Для расчета показателя  $M$  берут средние арифметические значения  $D_1$  и  $D_2$ .

11. Если  $M = 1$ , делают вывод об отсутствии модулирующего действия исследуемых БАВ.

При значениях  $M$ , отличных от 1, предложенный показатель позволяет охарактеризовать модулирующее действие БАВ: при  $M > 1$  как стимулирующее, при  $M < 1$  — как ингибирующее.

При значении  $M < 1$  считают, что образец в исследованной концентрации обладает антимикробной активностью.

12. При этом степень антимикробной активности в отношении использованной тест-культуры можно оценить по следующей шкале:

$M$  от 0,99 до 0,85 — слабая антимикробная активность;

$M$  от 0,84 до 0,51 — умеренно выраженная антимикробная активность;

$M$  0,5 и менее — выраженная антимикробная активность.

13. Параллельно оценивают кривую роста тест-штамма микроорганизма во избежание диауксии с учетом питательных свойств исследуемых образцов.

## ГЛАВА 8

### МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИМУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ТЕСТА ЭЙМСА НА ЧАШКАХ ПЕТРИ

1. Настоящий метод предназначен для выявления и количественной оценки антимутагенной активности БАВ растительного происхождения на основе модифицированного теста *Salmonella*/хромосомы (бактериальный тест Эймса на чашках Петри).

2. Сущность метода заключается в регистрации *in vitro* способности испытуемого соединения и (или) его метаболитов снижать индуцированные генные мутации у индикаторных штаммов *S. typhimurium* в условиях метаболической активации или без нее.

3. Индуцирование мутаций осуществляют путем внесения в реакционную среду специфического для каждого штамма *S. typhimurium* мутагена (вещества с доказанными в отношении данного тест-организма мутагенными свойствами).

4. В качестве специфических индукторов мутагенеза предпочтительно использование стандартных для теста Эймса мутагенов. Однако при необходимости исследования протекторного действия БАВ в отношении какого-либо конкретного вещества (например, N-нитрозодиметиламина) или комбинации веществ (например, вытяжки из табачных изделий), они так же могут быть использованы в качестве специфических мутагенов.

5. Эффективность специфического мутагена, в качестве индуктора мутаций оценивают, рассчитывая отношение числа ревертантов в положительном (индуцированный мутагенез) и отрицательном (спонтанный мутагенез) контролях. Баланс контролей должен быть не менее 2 (для *S. typhimurium* TA100) и 3 (для *S. typhimurium* TA98).

6. Наличие обратных мутаций (т. е. микроорганизмов, вернувшихся от ауксотрофности к прототрофности) оценивают визуально путем подсчета количества колоний микроорганизмов, выросших на дефицитной по гистидину среде.

7. Для оценки антимутагенной активности БАВ растительного происхождения рекомендуется применение комбинации штаммов *S. typhimurium* TA98 и TA100, несущих плазмиду рКМ 101. Они более чувствительны к действию ряда веществ, чем, например, штаммы TA1535 и TA1538, а также позволяют изучить протекторное действие исследуемых образцов в отношении веществ, вызывающих различные типы мутаций (сдвиг рамки считывания, замена пар оснований). Однако при необходимости могут быть использованы и другие штаммы *S. typhimurium*.

8. Для минимизации вероятности получения ложноотрицательных результатов перед началом эксперимента необходимо оценить антибактериальную активность исследуемого БАВ. В случае ее выявления при определении антимутагенного потенциала БАВ должны быть использованы концентрации образца, не оказывающие бактерицидного и/или бактериостатического действия в отношении тест-организма.

9. Для минимизации вероятности получения ложноположительных результатов образцы, не являющиеся заведомо стерильными, перед началом испытаний рекомендуется подвергнуть стерильной фильтрации.

10. В каждом эксперименте обязательно используют негативный и позитивный контроли.

11. В качестве негативного контроля применяют растворитель, использованный для приготовления растворов исследуемого образца (дистиллированная вода, раствор ДСМО и др.).

12. В качестве позитивных контролей используют вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров:

для *S. typhimurium* TA98 — бромистый этидий или 2-нитрофлуорен в дозе 50–100 мкг/чашку;

для *S. typhimurium* TA100 — азид натрия в дозе 5–10 мкг/чашку.

13. Позитивный контроль для вариантов с метаболической активацией соответствует типу используемой системы экзогенной метаболической активации (например, бенз[а]пирен, 2-аминоантрацен и др.).

14. *Порядок выполнения испытаний.* Используя стерильную воду или раствор ДМСО, готовят ряд разведений исследуемых образцов БАВ, предпочтительно 10-кратных разведений в диапазоне 0,1–1000 мкг/мл, однако допускается исследование и других концентраций. Во всех случаях рабочая концентрация раствора образца должна быть такой, чтобы при внесении 0,1 мл этого раствора доза чашки соответствовала бы необходимой по условиям опыта.

15. В день исследования суточную культуру *S. typhimurium* подращивают в МПБ или ТСБ при температуре 37 °С до плотности  $2-3 \times 10^8$  КОЕ/мл.

16. Затем культуру центрифугируют в течение 15 мин при 4000 об/мин при комнатной температуре, осадок ресуспендируют в 30–40 мл 0,02 М фосфатного буфера, повторно центрифугируют в аналогичном режиме и ресуспендируют в том же буфере до плотности  $10^9$  КОЕ/мл.

17. Необходимое число чашек Петри с соблюдением правил асептики заливают подготовленным минимальным нижним агаром (гл. 4) и оставляют при комнатной температуре до полного застывания.

18. Селективный полуобогатенный агар (гл. 4) плавят в водяной бане при 100 °С, разливают в пробирки в объеме 2–2,5 мл и помещают в термостатируемую водяную баню при температуре 45–46 °С для предотвращения застывания агара. Однако при выполнении опыта все добавки вносятся в пробирки вне водяной бани.

19. *Эксперимент без метаболической активации.* В опытные пробирки с селективным агаром вносят по 0,1 мл исследуемых образцов в исследуемых концентрациях, в контрольные — по 0,1 мл специфического мутагена (позитивный контроль) или растворителя (негативный контроль). Затем в пробирки добавляют 0,1 мл суспензии соответствующего индикаторного штамма, в опытные пробирки дополнительно вносят по 0,1 мл специфического мутагена (для индукции мутаций), в контрольные — аналогичный объем стерильного растворителя.

20. Также возможно использование метода преинкубации, при котором исследуемые образцы или контроли, суспензию тест-организма и мутаген смешивают в указанных выше пропорциях и инкубируют при 37 °С в течение 20–60 мин, после чего смесь вносят в пробирки с селективным агаром.

21. Содержимое пробирок быстро перемешивают на шейкере Vortex и выливают на слой нижнего минимального агара таким образом, чтобы полужидкий верхний агар покрывал поверхность нижнего агара ровным тонким слоем. Причем продолжительность времени перемешивания и разлива полужидкого агара на чашку не должна превышать 10–15 с.

22. Чашки оставляют при комнатной температуре на 30–40 мин и после полного застывания агара инкубируют при 37 °С в течение 48 ч.

23. Параллельно выполняют исследование в условиях метаболической активации. При использовании микросомальной активирующей смеси метаболиты исследуемого образца БАВ образующиеся под влиянием содержащихся в ней ферментов, в случае наличия у них антимутагенной активности будут способствовать снижению уровня индуцированных мутаций у тест-микроорганизмов.

24. *Эксперимент с метаболической активацией.* В опытные пробирки с агаром вносят по 0,1 мл исследуемых образцов в изучаемых концентрациях, в контрольные — по 0,1 мл специфического мутагена (позитивный контроль) или растворителя (негативный контроль). Далее в пробирки добавляют 0,1 мл суспензии соответствующего индикаторного штамма, после этого вносят по 0,5 мл микросомальной активирующей смеси. В опытные пробирки дополнительно вносят по 0,1 мл специфического мутагена (для индукции мутаций), в контрольные — аналогичный объем стерильного растворителя.

25. Также возможно использование метода преинкубации, при котором исследуемые образцы или контроли, суспензию тест-организма, микросомальная активирующая смесь и мутаген смешивают в указанных выше пропорциях и инкубируют при 37 °С в течение 20–60 мин, после чего смесь вносят в пробирки с селективным агаром.

26. Содержимое пробирок быстро перемешивают на шейкере Vortex и выливают на слой нижнего минимального агара таким образом, чтобы полужидкий верхний агар покрывал поверхность нижнего агара ровным тонким слоем. Причем продолжительность времени перемешивания и разлива полужидкого агара на чашку не должна превышать 10–15 с.

27. Чашки оставляют при комнатной температуре на 30–40 мин и после полного застывания агара инкубируют при 37 °С в течение 48 ч.

28. В каждом контрольном и опытном варианте используют по три повторности.

29. Эксперимент повторяют дважды.

30. Результаты учитывают по окончании инкубации путем подсчета количества колоний ревертантов на опытных чашках и сопоставления их с контрольными.

31. Результаты учитывают при наличии мутагенного эффекта во всех вариантах позитивного контроля.

32. Наличие антимутагенного эффекта у исследуемого препарата и/или его метаболитов рассчитывается по снижению частоты индукции обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности ( $I_m$ ) по формуле 3:

$$I_m = 100 - \frac{N_1}{N_2} \times 100, \quad (3)$$

где  $N_1$  — число ревертантов в опыте,

$N_2$  — число ревертантов в позитивном контроле.

33. Снижение частоты индуцированных реверсий менее чем на 25 % свидетельствует об отсутствии антимутагенной активности образца, на 25–40 % — об умеренной, более чем на 40 % — о выраженной антимутагенной активности.

34. Статистическую обработку рекомендуется производить с использованием метода множественных сравнений Даннета либо других методов с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ .

## ГЛАВА 9 МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИМУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ФЛУКТУАЦИОННОГО ТЕСТА ЭЙМСА (HIGH THROUGHPUT FLUCTUATION AMES TEST, FAT)

1. Настоящий метод предназначен для выявления и количественной оценки антимутагенной активности БАВ растительного происхождения на основе модифицированного флуктуационного теста Эймса (High throughput fluctuation Ames test, FAT).

2. Сущность метода заключается в регистрации *in vitro* способности испытуемого соединения и (или) его метаболитов снижать индуцированные генные мутации у индикаторных штаммов *S. typhimurium* в условиях метаболической активации или без нее.

3. Условия/особенности применения метода аналогичны тем, что указаны в пп. 1–6 гл. 8 для классического теста Эймса на чашках Петри, однако в данном тесте исследования выполняют с помощью 384-луночного стерильного планшета (допускается использование других типов стерильных планшетов, например, 96-луночных планшетов).

4. Наличие обратных мутаций (т. е. микроорганизмов, вернувшихся от ауксотрофности к прототрофности) оценивают визуально, по числу лунок, цвет в которых изменился с фиолетового на желтый (любой степени выраженности), за счет уменьшения рН вследствие биохимической активности содержащихся в ней ревертантных микроорганизмов.

5. *Порядок выполнения испытаний.* Используя стерильную воду или раствор ДМСО, готовят ряд разведений исследуемых образцов БАВ, предпочтительно 10-кратных разведений в диапазоне 0,1–1000 мкг/мл, однако допускается изучение и других концентраций.

6. В день исследования суточную культуру *S. typhimurium* подращивают в МПБ или ТСБ при температуре 37 °С в течение 4–6 ч.

7. Затем культуру центрифугируют в течение 10 мин при 2150 ×g комнатной температуре. Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют минимальной средой до плотности/концентрации  $\leq 10^9$  КОЕ/мл.

8. Приготовление рабочей суспензии тест-организмов. Полученную суспензию тест-микроорганизма вносят в среду для экспозиции (гл. 4) в следующих соотношениях:

для *S. typhimurium* TA98 — 1,3 мл суспензии тест-штамма в 11,37 мл культуральной среды;

для *S. typhimurium* TA100 — 0,325 мл суспензии тест-штамма в 12,345 мл культуральной среды.

9. *Эксперимент без метаболической активации.* Рабочую суспензию тест-организма (*S. typhimurium* TA100 или TA98) вносят в лунки стерильного 24-луночного планшета или индивидуальные стерильные пробирки в объеме 0,49 мл. В опытные лунки/пробирки добавляют по 0,01 мл раствора тестируемого образца БАВ в испытуемой концентрации, в контрольные — по 0,01 мл раствора стандартного мутагена (положительный контроль) или стерильного растворителя (отрицательный контроль). В опытные лунки/пробирки дополнительно вносят по 0,01 мл специфического мутагена (для индукции мутаций), в контрольные — аналогичный объем стерильного растворителя.

10. Далее смесь инкубируют 90 мин при температуре 37 °С.

11. По окончании преинкубации в лунки/пробирки добавляют по 2,49 мл индикаторной среды (гл. 4) и перемешивают их содержимое (путем пипетирования, встряхивания или на шейкере Vortex в зависимости от используемой лабораторной посуды).

12. Полученный рабочий раствор (должен быть фиолетового цвета) из каждой лунки/пробирки раскапывают в 48 лунок планшета по 50 мкл в каждую.

13. Планшеты запечатывают (крышка, пленка и т. д.), маркируют и инкубируют при температуре 37 °С в течение 72 ч. Также допускается увеличение срока инкубации до 5 сут (120 ч).

14. *Эксперимент с метаболической активацией.* Рабочую суспензию тест-организма (*S. typhimurium* TA100 или TA98) вносят в лунки стерильного 24-луночного планшета или индивидуальные стерильные пробирки в объеме 0,415 мл. В лунки/пробирки добавляют по 0,075 мл микросомальной активирующей смеси, а затем по 0,01 мл раствора тестируемого образца БАВ в испытуемой концентрации (опыт), раствора стандартного мутагена (положительный контроль) или стерильного растворителя (отрицательный контроль). В опытные лунки/пробирки дополнительно вносят по 0,01 мл специфического мутагена (для индукции мутаций), в контрольные — аналогичный объем стерильного растворителя.

15. Далее смесь инкубируют 90 мин при температуре 37 °С.

16. По окончании преинкубации в лунки/пробирки добавляют по 2,49 мл индикаторной среды (гл. 4) и перемешивают их содержимое путем пипетирования, встряхивания на шейкере Vortex.

17. Полученный рабочий раствор (должен быть фиолетового цвета) из каждой лунки/пробирки раскапывают в 48 лунок планшета по 50 мкл в каждую.

18. Планшеты запечатывают (крышка, пленка и т. д.), маркируют и инкубируют при температуре 37 °С в течение 72 ч. Также допускается увеличение срока инкубации до 5 сут (120 ч).

19. Результаты учитывают по окончании инкубации, визуально регистрируя число положительных лунок, т. е. лунок, цвет раствора в которых изменился с фиолетового на желтый. Слабоположительные лунки (любые переходные оттенки желто-фиолетового) интерпретируются как положительные, так как в них также

присутствуют ревертантные микроорганизмы, но в меньшем количестве, чем в лунках с выраженным желтым цветом раствора.

20. Далее рассчитывают долю положительных лунок для каждого образца и сопоставляют с аналогичным показателем контролей.

21. Частота спонтанного мутагенеза (отрицательный контроль), как правило, составляет 0–20 % (в зависимости от условий эксперимента и используемого тест-штамма). Допускается и более широкий диапазон уровня спонтанных фоновых мутаций, однако при этом ключевое значение имеет баланс позитивного и негативного контролей (число лунок-ревертантов в позитивном контроле должно превышать аналогичный показатель в негативном контроле как минимум в 3 раза).

22. Наличие антимуtagenного эффекта у исследуемого препарата и/или его метаболитов учитывается по снижению частоты индукции обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности.

23. Для его оценки рассчитывают уменьшение доли положительных лунок в опыте по отношению к позитивному контролю, используя формулу 3, где  $N_1$  и  $N_2$  будут обозначать соответствующее число лунок-ревертантов.

24. Снижение частоты индуцированных реверсий менее чем на 25 % свидетельствует об отсутствии антимуtagenной активности образца, на 25–40 % — об умеренной, более чем на 40 % — о выраженной антимуtagenной активности.

25. Для окончательного суждения/заключения о наличии у исследуемого образца антимуtagenной активности принципиальным/ключевым моментом является наличие дозозависимого эффекта и статистически значимое снижение уровня индуцированного мутагенеза по меньшей мере в одной из изучаемых концентраций.

26. Статистическую обработку рекомендуется производить с использованием метода множественных сравнений Даннета либо других методов, с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ .

## ГЛАВА 10 ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ БАВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО МЕТОДА С ОПТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

1. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay — TEAC-метод основан на способности антиоксидантов восстанавливать катион-радикал диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоной кислоты) (АБТС<sup>•+</sup>) и тем самым ингибировать поглощение в длинноволновой части спектра. В качестве стандарта антиоксиданта используют тролокс — водорастворимый аналог витамина Е.

АБТС<sup>•+</sup> — метастабильный радикал, который может существовать в растворе достаточно продолжительное время; при внесении в среду различных антирадикальных агентов наблюдается быстрое восстановление радикала. Реакцию контролируют спектрофотометрически при длине волны  $\lambda_{734}$ : АБТС-радикал (синее окрашивание раствора) при восстановлении преобразуется в свою

бесцветную нейтральную форму. Реакция может протекать в водной, водно-органической и органической средах, что определяет универсальность метода и позволяет характеризовать антиоксидантную активность гидрофильных и гидрофобных веществ.

2. Схема определения антиоксидантной активности оптическим методом состоит из следующих этапов:

- приготовление рабочего раствора АБТС;
- приготовление калибровочных растворов стандарта антиоксиданта;
- приготовление растворов образца в рабочем диапазоне концентраций;
- внесение в тест-систему исследуемого образца в ряду концентраций и калибровочных растворов антиоксиданта;
- расчет степени восстановления катион-радикала, или ингибирования поглощения ( $I$ , %), для исследуемого образца и стандарта антиоксиданта;
- построение графиков зависимости ингибирования поглощения ( $I$ , %) от концентрации стандарта антиоксиданта и содержания исследуемого образца;
- расчет показателей антиоксидантной активности ( $IC_{50}$  и ТЕАС).

3. *Выполнение исследования.* Катион-радикал (АБТС<sup>•+</sup>) получают в реакции 7 мМ исходного раствора АБТС с 2,45 мМ раствором персульфата аммония: в 2,4 мл 7 мМ раствора АБТС<sup>•+</sup> вносят 0,1 мл 60 мМ раствора персульфата аммония. Данную смесь выдерживают в темноте при температуре 25 °С в течение 12–16 ч.

4. Раствор АБТС<sup>•+</sup> (п. 3) разбавляют фосфатным буфером (0,1 М, рН 7,4) или 75 % раствором этилового спирта (в случае водонерастворимых/гидрофобных субстанций) для достижения уровня поглощения  $0,70 \pm 0,02$  ед. при длине волны 734 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

5. Используя фосфатный буфер (0,1 М, рН 7,4) или этиловый спирт (для водонерастворимых/гидрофобных соединений), готовят ряд предпочтительно 2-кратных разведений исследуемых образцов БАВ и стандарта антиоксиданта (тролокса). Рекомендуемый диапазон концентраций для калибровочных растворов тролокса — 0,25–4,0 мМ, однако допускается исследование и других концентраций. Диапазон концентраций для изучаемых образцов подбирают, исходя из известных сведений о возможной антиоксидантной активности и растворимости БАВ.

6. В кювету, содержащую 1 мл разбавленного раствора АБТС<sup>•+</sup> (п. 13), вносят 10 мкл исследуемого образца (в рабочем диапазоне концентраций) или калибровочных растворов тролокса. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 734 нм и температуре 25 °С в течение 5–10 мин для тролокса и 10–30 мин для образцов БАВ. Значения оптической плотности фиксируют каждую минуту до прекращения реакции восстановления. Исследования выполняют не менее чем в 3-х повторностях для каждой концентрации.

7. Контролем служит разбавленный раствор АБТС<sup>•+</sup> (п. 3), в который вместо образца вносят равный объем фосфатного буфера или этилового спирта.

8. Степень восстановления катион-радикала, или ингибирование поглощения ( $I$ , %), рассчитывают по формуле 4:



$$I = \frac{D_0 - D}{D_0} \times 100, \quad (4)$$

где  $D_0$  — оптическая плотность исходного раствора АБТС<sup>•+</sup>;  
 $D$  — оптическая плотность раствора АБТС<sup>•+</sup> после внесения антиоксиданта.

Для расчета ингибирования поглощения ( $I$ ) используют значения оптической плотности образцов ( $D$ ), соответствующие окончанию реакции восстановления АБТС<sup>•+</sup>. Концентрацию калибровочных растворов антиоксиданта и БАВ подбирают таким образом, чтобы на момент измерения степень восстановления АБТС<sup>•+</sup> достигала 20–80 %.

9. Строят график зависимости ингибирования поглощения ( $I$ , %) от концентрации тролокса и исследуемого образца (мкг/мл, мкМ). Согласно полученным уравнениям рассчитывают концентрацию пробы  $IC_{50}$ , соответствующую 50 % ингибированию поглощения.

10. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), или показатель антиоксидантной активности, выраженный в мкМ тролокса/мг БАВ (мкМ тролокса/мкМ БАВ), определяют по формуле 5:

$$TEAC = \frac{IC_{50}(ст)}{IC_{50}(пр)}. \quad (5)$$

где  $IC_{50}(ст)$  — концентрация 50 % ингибирования поглощения при внесении тролокса (мкМ);

$IC_{50}(пр)$  — концентрация 50 % ингибирования поглощения при внесении исследуемого образца БАВ (мкг/мл, мкМ).

10. При статистической обработке данных результаты независимых экспериментов ( $n \geq 3$ ) представляют как среднее арифметическое значение  $\pm$  доверительный интервал. Достоверность различий между выборками экспериментальных данных определяют методом доверительных интервалов при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Характеристика индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*\***

Добавочные маркеры			Мутации в гистидиновом опероне				
ЛПС	репа- рация	R-фактор	his G46	hisC207	hisC3076	hisD3052	his O1242 his D6610
+	$\Delta$ uvrB	–	TA1950	TA1951	TA1952	TA1534	–
rfa	+	–	TA1975	TA1976	TA1977	TA1978	–
$\Delta$ gal	$\Delta$ uvrB	–	TA1530	TA1531	TA1532	TA1964	TA89
rfa	$\Delta$ uvrB	–	TA1535	TA1536	TA1537	TA1538	TA90
rfa	$\Delta$ uvrB	pKM101	TA100	–	TA2637	TA98	TA97
+	+	pKM101	TA92	–	TA2425	TA94	TA110

\* — по Абилов С. К. «Мутагены окружающей среды».

### Проверка генотипа тест-штаммов

*Ауксотрофность по гистидину.* Суспензию бактерий (0,25 мл) проверяемого штамма в буферном растворе переносят в пробирки с 0,6 % полужидким агаром (в данном случае этот агар не содержит гистидина). Содержимое пробирок помещают на нижний 1,5 % минимальный агар. После застывания верхнего слоя (20–30 мин) в центре чашки помещают стерильный диск из фильтровальной бумаги, на который наносят 0,05 мл раствора L-гистидина (4 мг/мл) или дистиллированной воды. Чашки инкубируют 48 ч. Наличие зоны роста культуры вокруг диска при нанесении на него гистидина и отсутствие такой зоны в контроле указывают на наличие у штамма ауксотрофности по гистидину.

*Наличие у бактерий плазмиды pKM101.* Бактерии штаммов ТА 98 и ТА 100 наносят штрихом на поверхность чашки с 1,5 % МПА, содержащим ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. Чашки инкубируют 18 ч при 37 °С. Рост культуры по следу петли свидетельствует о наличии у бактерий фактора резистентности к ампициллину, т. е. плазмиды pKM101. При выращивании штаммов, несущих pKM101, в МПА или в жидкую среду вносят ампициллин (50 мкг/мл).

*Наличие мутации rfa.* Суспензию бактерий культуры переносят в пробирки с 0,6 % МПА (0,25 мл суспензии в пробирку) и помещают на слой нижнего 1,5 % МПА. На застывшую поверхность агара помещают стерильный бумажный диск, на который наносят 0,01 мл 0,1 % раствора кристаллвиолета. Чашки инкубируют 18 ч при 37 °С. Прозрачные зоны ингибирования роста культуры вокруг диска указывают на наличие, а отсутствие такой зоны свидетельствует мутации rfa о том, что не выявлены.