

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Daphnia magna* Straus КАК ОБЪЕКТ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПРЕПАРАТОВ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОГО ТИПА ДЕЙСТВИЯ

Н. П. Подосиновичова<sup>1</sup>, А. Б. Космачев<sup>1</sup>, В. Д. Тонкопий<sup>2</sup>, А. О. Загребин<sup>2</sup>, Е. А. Евдокимова<sup>1</sup>, А. М. Малов<sup>1</sup>, В. В. Петров<sup>1</sup>, В. Б. Долго-Сабуров<sup>1</sup>

На основании литературных и собственных данных представлены биохимические доказательства правомерности использования нового тест-объекта *Daphnia magna* Straus как дополнительного или альтернативного млекопитающим при изучении действия холинотропных веществ. Методом радиолигандного анализа получены прямые доказательства присутствия в организме дафний м-холинорецепторов, не отличающихся по фармакодинамическим параметрам от рецепторов млекопитающих и человека.

**Ключевые слова:** система холинергическая, м-холинорецептор, радиолигандный анализ, *Daphnia magna* Straus

#### ВВЕДЕНИЕ

Предположения о существовании в организме дафний структурных образований, характерных для холинергической нервной системы, были высказаны еще в 30–40-е годы [1, 7]. Значительный интерес к этим представителям класса ракообразных в дальнейшем был обусловлен обнаружением в их организме ряда физиологических и биохимических систем, присущих млекопитающим [5]. В качестве объекта *Daphnia magna* была использована в сравнительных токсикологических экспериментах по изучению влияния антихолинэстеразных веществ разного типа действия и прямых холиномиметиков на дафний и белых крыс. Полученные результаты представили фармакологические доказательства наличия у *Daphnia magna* холинергической системы, возбуждение которой вызывает ответные реакции, близкие по механизмам к реакциям лабораторных животных и человека [3]. Однако прямых доказательств наличия у дафний м-холинорецепторов (м-ХР), близких по фармакодинамическим характеристикам к рецепторам млекопитающих, получено не было. Задачей настоящего исследования явилось сравнение методом радиолигандного анализа м-ХР *Daphnia magna*, млекопитающих и человека для подтверждения правомерности использования нового тест-объекта при отборе соединений холинергического типа действия.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуру *Daphnia magna* Straus выращивали по стандартной методике согласно международному стандарту ISO 6341 – 82 [2].

В основу экспериментов по определению параметров связывания холиноблокаторов с м-ХР различных видов млекопитающих и *Daphnia magna* положен метод, детально описанный в работах Н. J. Jamatuga и Н. S. Snyder [6]. В качестве меченого лиганда использовали классический неселективный мускариновый антагонист, обладающий высоким сродством ко всем подтипам м-ХР — [<sup>3</sup>H] хинуклидинилбензилат ([<sup>3</sup>H]ХНБ) фирмы “Amersham” с удельной активностью 37 Ки/ммоль. Измерение проводили на жидкостно-сцинтилляционном счетчике “Mark III” с применением стандартного диоксанового сцинтиллятора. Источником м-ХР служили 10% водные гомогенаты больших полушарий головного мозга белой крысы, кошки, собаки и человека. Нативный гомогенат *Daphnia magna* оказался непригодным для целей радиолигандного анализа вследствие низкого содержания м-ХР на единицу массы тела животного и низкого специфического связывания [<sup>3</sup>H]ХНБ. Получение мембранной фракции дафнии, обогащенной м-ХР, было проведено методом дифференциального центрифугирования в условиях, специально разработанных для выделения мембранных фракций, имеющих максимальную концентрацию участков специфического связывания [<sup>3</sup>H]ХНБ. С этой целью дафний в количестве 2000 – 3000 особей разрушали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 90 мл среды следующего состава, нМ: NaCl — 207, KCl — 5,4, CaCl<sub>2</sub> — 13,6, MgCl<sub>2</sub> — 2,6, NaHCO<sub>3</sub> — 2,4. Гомогенат центрифугировали 12 мин при 6300 g. Супернатант помещали в холодильник. Осадок ресуспендировали в

<sup>1</sup> Институт токсикологии Минздрава России. Санкт-Петербург, 193019, ул. Бехтерева, 1.

<sup>2</sup> Институт озераведения РАН, Санкт-Петербург, 196199, ул. Севастьянова, 9.

**Сравнительные характеристики общей популяции М-ХР *Daphnia magna* и больших полушарий головного мозга различных видов млекопитающих**

Равновесная константа (Kd) связывания [ <sup>3</sup> H]ХНБ, моль				
<i>Daphnia magna</i>	Белая крыса	Кошка	Собака	Человек
$0,97 \cdot 10^{-10}$	$1,7 \cdot 40^{-10}$	$1,25 \cdot 10^{-10}$	$1,7 \cdot 10^{-10}$	$0,93 \cdot 10^{-10}$

**Примечание.** Образцы ткани мозга человека получены во время нейрохирургических операций.

90 мл среды указанного состава и вновь центрифугировали 12 мин при 6300 g. Супернатанты первого и второго центрифугирования объединяли и осаждали 22 мин при 26500 g. Полученный осадок, представляющий искомую мембранную фракцию, ресуспендировали в дистиллированной воде из расчета 5 мл на 2000 исходного количества особей гидробионта и использовали в эксперименте. Процедуры по выделению мембран и центрифугированию осуществляли при температурах не выше 4°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице представлены результаты сравнительного анализа параметров взаимодействия [<sup>3</sup>H]ХНБ с м-ХР дафний, различных видов млекопитающих и человека. Как следует из представленных данных, константы диссоциации (Kd) комплекса [<sup>3</sup>H]ХНБ с м-ХР гомогенатов больших полушарий мозга трех видов млекопитающих, человека и обогащенной рецепторами мембранной фракции дафний практически не различаются между собой. Поскольку константа диссоциации является фундаментальным фармакодинамическим параметром, который отражает свойства самого рецептора, в представленном эксперименте получены прямые доказательства присутствия в организме *Daphnia magna* высокочувствительных к специфическому лиганду мускариновых рецепторов хинуклидинилбензилату участков связывания, которые по параметрам сроства не отличаются от м-ХР мозга млекопитаю-

щих и человека и могут быть идентифицированы как м-ХР *Daphnia magna*.

В сравнительных фармакологических экспериментах на дафниях и крысах получены данные о присутствии в организме дафний различных подтипов м-ХР [3, 4] и о возможности использования *Daphnia magna* в качестве первичного тест-объекта для оценки рецепторной избирательности холинотропных препаратов в целом организме [4].

К числу достоинств нового биообъекта относятся высокая чувствительность, простота разведения, стабильность результатов, отсутствие сезонных и гормональных колебаний. Особенности строения дафний позволяют в экспериментах *in vivo* использовать в качестве анализаторов высокоизбирательные препараты, не способные проникать через тканевые барьеры млекопитающих, и сочетать преимущества исследований *in vivo* и *in vitro*.

## ВЫВОД

Принципиальное совпадение результатов исследований, полученных на м-холинорецепторах дафний, млекопитающих и человека, подтверждает целесообразность использовать *Daphnia magna* Straus как дополнительный объект при изучении веществ холинергического типа действия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Ермаков, *Международный журнал АН УССР*, **6**(3), 755 – 782 (1936).
2. *Международный стандарт ISO 6341 – 82. Качество воды. Определение угнетения подвижности in vivo Straus (Cladocera, Crustacea)*, 1987.
3. В. Д. Тонкопий, А. Б. Космачев, А. О. Загребин, *Бюл. экпер. биол.*, № 5, 497 – 499 (1994).
4. В. Д. Тонкопий, А. О. Загребин, Л. А. Шерстнева, А. Б. Космачев, *Ж. эвол. биохим.*, **30**(3), 386 – 391 (1994).
5. *Daphnia*, R. H. Peters R. de Bemardi (eds.), Pollanza (1987).
6. H. J. Jamamura and H. S. Snyder, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **142**, 187 – 191 (1974).
7. V. Obreskove, *Biol. Bull.*, **81**(90), 156 – 161 (1941).

Поступила 30.10.2000

## ***Daphnia magna* Straus AS AN OBJECT FOR THE STUDY OF PREPARATIONS POSSESSING CHOLINERGIC ACTIVITY**

N. P. Podosinovichova<sup>1</sup>, A. B. Kosmachev<sup>1</sup>, V. D. Tonkopii<sup>2</sup>, A. O. Zagrebin<sup>2</sup>, E. A. Evdokimova<sup>1</sup>, A. M. Malov<sup>1</sup>, V. V. Petrov<sup>1</sup>, and V. B. Dolgo-Saburov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Toxicology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Bekhtereva 1, St. Petersburg, 193019 Russia;

<sup>2</sup> Institute of Limnology, Russian Academy of Sciences, ul. Sevast'yanova 9, St. Petersburg, 196199 Russia

Published data and original experimental results are summarized to justify biochemically the use of *Daphnia magna* Straus as an additional or alternative test object for the study of cholinotropic substances. The data of radioligand analysis provide direct evidence that the organism of *Daphnia* contains M-cholinergic receptors identical (with respect to pharmacodynamic parameters) to those in the human and animal organism.