

# НОВЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## ЧАСТОТА СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ У *DAPHNIA MAGNA STRAUS* КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕСТ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Н. П. Подосиновичева, Н. Ф. Ежов, Н. А. Сайкина, В. А. Беляев, В. Б. Долго-Сабуров<sup>1</sup>

Предложен метод регистрации функционального параметра — частоты сердечных сокращений (ЧСС) у гидробионтов с использованием в качестве биообъекта *Daphnia magna Straus*. Проведено исследование влияния холинергических лигандов карбамилхолина и атропина на сердечный ритм дафний. Обнаружено, что холинергические агонист и антагонист оказывают разнонаправленное действие на ЧСС у дафний и способны предотвращать действие друг друга. Использование теста изменения ЧСС предлагается для оценки действия ксенобиотиков и отбора средств фармакологической коррекции.

**Ключевые слова:** *Daphnia magna Straus*, частота сердечных сокращений, холинергические лиганды

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно многочисленным исследованиям [5 – 7], гидробионты являются адекватным биообъектом для оценки токсического действия ксенобиотиков, проведения токсикометрического анализа и сравнения действия различных препаратов, в том числе значительно различающихся по токсикокинетическим и токсикодинамическим параметрам. При проведении такого рода исследований критерием действия токсиканта является гибель гидробионта. Соответственно, защитное действие лекарственных средств оценивается по предотвращению гибели животных. Однако во многих случаях данный критерий оказывается слишком “жестким” и недостаточно адекватным при отборе средств фармакологической коррекции. В настоящей работе с использованием *Daphnia magna Straus* предложен метод оценки повреждающего действия химических соединений и его коррекции по изменению функционального параметра — частоты сердечных сокращений (ЧСС) у дафний. В качестве тест-препаратов были использованы карбамилхолин и атропин — лиганды холинергической медиаторной системы, наличие которой у дафний подтверждено предыдущими исследованиями [2, 3].

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты поставлены на гидробионтах *Daphnia magna Straus* в возрасте 7 суток, выращенных в лабораторных условиях в соответствии с требованиями международного стандарта по биотестированию воды [1].

Для измерения ЧСС дафнию помещали в капле воды под микроскоп (HG 315873), воду отсасывали фильтровальной бумагой, оценку ритма проводили в обездвиженном состоянии гидробионта.

В основу метода был положен стробоскопический эффект совмещений ЧСС с частотой вспышек светодиода повышенной яркости. Управление светодиодом и регистрацию результатов измерения проводили с помощью компьютера по специально разработанной программе, позволяющей в широком диапазоне регулировать частоту и длительности импульса, подаваемого на светодиод. После измерения ЧСС дафний помещали по одной особи в стаканчики с 10 мл культивационной воды или исследуемых препаратов, растворенных в этой среде. Через указанные промежутки времени проводили повторное измерение ЧСС. Каждый эксперимент повторяли десять раз.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований на протяжении суток проводили определение влияния на сердечный ритм дафний холиномиметика карбамилхолина в диапазоне концентраций 0,01 – 0,75 LC<sub>50</sub> и холиноблокатора атропина в концентрации 0,1 LC<sub>50</sub>. Значения концентраций тестируемых препаратов приведены в долях LC<sub>50</sub> в связи с тем, что токсичность холинергических лигандов в культивационной воде была значительно ниже, чем в дистиллированной. Она могла существенно различаться в отдельных экспериментах и в каждом случае определялась перед проведением опыта. Очевидно, этот факт связан с присутствием в культивационной воде водорослей, используемых для кормления дафний и способных сорбировать экотоксиканты. Значение LC<sub>50</sub> в дистиллированной воде составляло для

<sup>1</sup> Лаборатория биохимии (зав. — проф. В. Б. Долго-Сабуров) ФГУН Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург, 192019, ул. Бехтерева, 1.

карбамилхолина  $2,86 \pm 0,75$  мг/л, для атропина —  $107,3 - 13$  мг/л.

Результаты определения ЧСС у дафний представлены в табл. 1.

Как следует из представленных данных, карбамилхолин в концентрации  $0,01 LC_{50}$  не влияет на ЧСС у дафний в течение первых двух часов экспозиции и на 29 % снижает ее через сутки. В концентрации  $0,05 LC_{50}$  и  $0,1 LC_{50}$  карбамилхолин увеличивает ЧСС в течение двух часов наблюдения. Это увеличение сохраняется в течение суток при концентрации  $0,1 LC_{50}$ . При концентрации  $0,05 LC_{50}$  через сутки эффект меняется на противоположный — снижение ЧСС. При очень высокой концентрации карбамилхолина —  $0,75 LC_{50}$  наблюдается выраженная брадикардия во все сроки экспозиции. К концу первых суток при этой концентрации наблюдалась гибель части животных. У оставшихся гидробионтов ЧСС не превышала  $10$  уд./мин. При концентрациях карбамилхолина выше  $0,01 LC_{50}$  во все сроки наблюдения регистрировалось обездвиживание дафний.

Холинергический антагонист атропин в концентрации  $0,1 LC_{50}$  при всех экспозициях вызывал снижение ЧСС. Обездвиживания дафний при этом не происходило.

Следует отметить, что ранее методом радиолигандного анализа нами было показано отсутствие различий в сродстве общей популяции м-холинорецепторов дафний и м-холинорецепторов больших полушарий мозга различных видов млекопитающих (белая крыса, кошка, собака, человек) к классическому неселективному мускариновому антагонисту  $^3H$ -хинуклидинилбензилату [4]. Этот факт является прямым доказательством наличия у дафний м-холинорецепторов, близких по фармакодинамическим характеристикам к рецепторам млекопитающих. В то же время обращает на себя внимание тот факт, что агонист холинореактивных медиаторных систем карбамилхолин в зависимости от концентрации и продолжительности действия способен вызывать у *Daphnia magna*, в отличие от млекопитающих, повышение ЧСС. Антагонист этих систем атропин на протяжении суток индуцирует снижение ЧСС. По-видимому, обнаруженные эффекты свиде-

тельствуют не об особенностях м-холинорецепторов гидробионтов, а об отличиях структурно-функциональной организации систем регуляции сердечного ритма у дафний по сравнению с млекопитающими.

На следующем этапе исследований в двух вариантах постановки были проведены эксперименты по предотвращению атропином нарушений ЧСС, вызванных у дафний карбамилхолином. В первом варианте дафнии в течение 1 ч пребывали в растворе карбамилхолина в концентрации  $0,05 LC_{50}$ , после чего в этот раствор добавляли атропин. ЧСС измеряли через 1, 2 ч и 1 сут после добавления атропина (табл. 2).

В концентрациях  $0,01 LC_{50}$  и  $0,1 LC_{50}$  атропин предотвращал обездвиживание дафний, но не нормализовал повышение ЧСС в первые 2 ч наблюдения. Через сутки совместной экспозиции с карбамилхолином и атропином наблюдалось снижение ЧСС до  $40$  уд./мин и обездвиживание дафний при концентрации атропина  $0,01 LC_{50}$  и их гибель при концентрации  $0,1 LC_{50}$ . Возможно, наблюдаемый эффект связан с однонаправленным действием агониста и антагониста при данной концентрации и времени экспозиции (табл. 1).

Во втором варианте постановки через 1 ч пребывания в растворе карбамилхолина дафний извлекали и помещали в раствор атропина. Измерение ЧСС также проводили через 1, 2 ч и 1 сут пребывания в растворе атропина. При отдельной экспозиции с агонистом атропин в концентрации  $0,01 LC_{50}$  и  $0,1 LC_{50}$  предотвращал обездвиживание дафний и нормализовал ЧСС во все сроки наблюдений (табл. 2)

Как указывалось в табл. 1, инкубация с атропином в концентрации  $0,1 LC_{50}$  вызывала у дафний снижение ЧСС через 1, 2 ч и 1 сут. Добавление в среду карбамилхолина в концентрации  $0,01 LC_{50}$  и  $0,05 LC_{50}$  через 1 ч после атропина нормализовало сердечный ритм.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что холинергические лиганды карбамилхолин и атропин оказывают разнонаправленное действие по отношению к параметру — ЧСС — у дафний и проявляют антагонизм при совместной экспозиции. Использование этого параметра позволяет у каждой особи последовательно регистрировать контрольные значения ЧСС,

Таблица 1. Влияние холинергических лигандов на ЧСС у *Daphnia magna* Straus (контроль —  $281,8 \pm 26,9$  уд./мин)

Концентрация	Карбамилхолин		
	1 ч	2 ч	1 сут
$0,01 LC_{50}$	$293,3 \pm 32,3$	$259,3 \pm 28,5$	$200,1 \pm 21,6^*$
$0,05 LC_{50}$	$310,0 \pm 29,4^*$	$310,0 \pm 31,1^*$	$219,8 \pm 20,9^*$
$0,1 LC_{50}$	$369 \pm 40,6^*$	$363,5 \pm 40,0^*$	$355,1 \pm 35,8^*$
$0,75 LC_{50}$	$236,7 \pm 22,5^*$	$169,1 \pm 20,3^*$	$6,0 \pm 3,5^*$
	<i>Атропин</i>		
$0,1 LC_{50}$	$240,1 \pm 22,8^*$	$225,4 \pm 23,7^*$	$205,7 \pm 20,9^*$

\* Отличие от контроля достоверно при  $p < 0,05$ .

Таблица 2. Влияние атропина на изменение ЧСС у дафний под действием карбамилхолина в концентрации  $0,05 LC_{50}$  (контроль —  $281,8 \pm 26,9$  уд./мин)

Концентрация атропина	Значения ЧСС		
	1 ч	2 ч	1 сут
<i>Атропин совместно с карбамилхолином</i>			
$0,01 LC_{50}$	$324,1 \pm 32,9^*$	$321,0 \pm 32,7^*$	$40,0 \pm 20^*$
$0,1 LC_{50}$	$332,3 \pm 40,2^*$	$330,0 \pm 34^*$	гибель
<i>Атропин после экспозиции с карбамилхолином</i>			
$0,01 LC_{50}$	$290,3 \pm 30,1$	$288,5 \pm 29,7$	$290,3 \pm 29,7$
$0,1 LC_{50}$	$267,7 \pm 27,1$	$272,8 \pm 29,1$	$284,6 \pm 29,4$

\* Отличие от контроля достоверно при  $p < 0,05$ .

действие отдельных препаратов и их комбинаций. В этих экспериментах используется одно из основных преимуществ гидробионтов — возможность в течение всего опыта сохранять заданные концентрации ксенобиотиков. Пребывание дафний на протяжении опыта в растворе препаратов заданной концентрации позволяет при сравнении различных ксенобиотиков пренебречь различиями в скорости их метаболизма и выведения из организма, что не представляется возможным в экспериментах на млекопитающих. Использование ЧСС в качестве критерия эффективности фармакологической коррекции значительно расширяет возможности поиска лекарственных средств по сравнению с чрезвычайно жестким и не всегда адекватным критерием гибели животных.

## ВЫВОДЫ

1. С помощью разработанного метода регистрации у *Daphnia magna Straus* частоты сердечных сокращений на основе стробоскопического эффекта выявлена динамика изменения этого показателя при воздействии агониста мускариновых холинорецепторов карбахолина в концентрации 0,01 – 0,75 LC<sub>50</sub> и антагониста атропина в концентрации 0,1 LC<sub>50</sub>.

2. Нарушения сердечного ритма, вызываемые карбахолином в концентрации 0,05 LC<sub>50</sub>, нормализуются атропином в концентрации 0,01 и 0,1 LC<sub>50</sub>. Снижение

ЧСС под действием атропина в концентрации 0,1 LC<sub>50</sub> нормализуется карбахолином в концентрации 0,01 LC<sub>50</sub> и 0,05 LC<sub>50</sub>.

3. Отличный от млекопитающих характер изменений у дафний ЧСС при воздействии атропина или карбахолина отражает, по-видимому, различия в структурно-функциональной организации у них систем регуляции сердечного ритма.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ (№ 06-04-48639).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Международный стандарт ISO 6341-82. Качество воды. Определение угнетения подвижности *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea) (1987).
2. А. Б. Космачев, В. Д. Тонкопий, Н. П. Подосиновикова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(6), 15 – 17 (2000).
3. Н. П. Подосиновикова, А. Б. Космачев, В. Д. Тонкопий и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(6), 20 – 22 (2001).
4. Н. П. Подосиновикова, А. Б. Космачев, В. Д. Тонкопий и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(1), 73 – 74 (2002).
5. M. Zeeman, A. Fairbrother, and J. W. Gorsuch, *Screening and Testing Chemicals in Commerce*, OTA-BP-ENV-166, 59 – 68 (1995).
6. M. Zeeman, *Screening and Testing Chemicals in Commerce*, OTA-BP-ENV-166, 69 – 78 (1995).
7. H. S. Rosenkranz and A. R. Cunningham, *ATLA*, **39**, 9 – 19 (2004).

Поступила 23.11.07

## HEART RATE IN *Daphnia magna* AS A FUNCTIONAL TEST FOR ASSESSING THE ACTION OF PHARMACOLOGICAL AND CHEMICAL AGENTS

N. P. Podosinovicova, N. F. Ezhov, N. A. Saikina, V. A. Belyaev, and V. B. Dolgo-Saburov

Institute of Toxicology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Bekhtereva 1, St. Petersburg, 192019 Russia;

It is suggested to use *Daphnia magna Straus* as a biotest object for the evaluation of heart rate (HR) as a functional parameter. The influence of cholinergic ligands (atropine and carbamylcholine) on the *Daphnia* cardiac rhythm has been studied. It is found that the cholinergic agonist and antagonist produced opposite influence on the HR and are capable of prevent the action of each other. The *Daphnia* HR variation test can be used in evaluating the effect of xenobiotics and in selecting agents for the pharmacological correction of this functional parameter.