

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

### **ДАРНИА MAGNA STRAUS КАК ОБЪЕКТ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ГАМК-ЕРГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В УСЛОВИЯХ ЦЕЛОСТНОГО ОРГАНИЗМА**

**В. Д. Тонкопий<sup>1</sup>, Н. П. Подосиновичева<sup>2</sup>, А. О. Загребин<sup>1</sup>, Л. А. Шерстнева<sup>1</sup>, В. В. Петров<sup>2</sup>, Л. А. Муковский<sup>2</sup>, В. Б. Долго-Сабуров<sup>2</sup>**

В сравнительных экспериментах на гидробионтах *Daphnia magna Straus* и белых мышах проведено определение токсичности антагонистов ГАМК — представителей различных классов химических соединений (11 препаратов). Установлена высокая степень корреляции токсичности антагонистов ГАМК для дафний и мышей. На дафниях проведен фармакологический анализ взаимодействия классических агонистов и антагонистов ГАМК<sub>A</sub>-бензодиазепин-ионофор-рецепторного комплекса — конкурентных лигандов различных участков связывания рецептора. Высказано предположение, что способность ГАМК-миметиков предотвращать действие ГАМК-антагонистов в условиях целостного организма в большей степени определяется фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками препаратов, чем прямой конкуренцией за места связывания в пределах рецепторного комплекса.

**Ключевые слова:** система ГАМК-ергическая, агонисты и антагонисты ГАМК, *Daphnia magna Straus*

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Гидробионт *Daphnia magna Straus* является удобным и адекватным альтернативным объектом для определения у ксенобиотиков холино- или дофаминотропных свойств, фармакологического анализа некоторых аспектов межмедиаторных отношений и первичного скрининга холинергических и дофаминергических агонистов и антагонистов [2, 4, 5, 7]. Сведений о присутствии в организме дафний ГАМК-ергической медиаторной системы в доступной литературе нами обнаружено. В то же время ГАМК является основным тормозным нейромедиатором в головном мозге млекопитающих, тесно связанным со многими нейромедиаторными и гормональными системами, в том числе холинергической и дофаминергической. В связи с изложенным настоящее исследование посвящено фармакологическому анализу влияния ГАМК-ергических лигандов на дафний с целью доказательства присутствия в организме гидробионтов ГАМК-ергической медиаторной системы, аналогичной таковой системе млекопитающих.

#### **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Опыты проводили с использованием в качестве тест-объекта *Daphnia magna Straus*. Разведение даф-

ний осуществляли в лабораторных условиях в соответствии с требованиями международного стандарта по биотестированию воды [3]. Расчет среднетоксической концентрации (LC<sub>50</sub>) химических веществ как показателя чувствительности дафний к ксенобиотикам проводили методом пробит-анализа с использованием таблиц, предложенных В. Б. Прозоровским [6]. В эксперимент брали дафний в возрасте 1–2 сут. Дафний помещали в лабораторные стаканчики с раствором исследуемых веществ в 5–10 возрастающих по логарифмической шкале концентрациях, по 4 особи в каждую пробу объемом 25 мл. Через 24 ч отмечали количество погибших дафний в каждой пробе и по результатам четырех последовательных проб находили в таблице соответствующее значение LC<sub>50</sub>. Антагонизм ГАМК-блокаторов и ГАМК-миметиков оценивали по показателю индекса защиты (ИЗ) — отношение LC<sub>50</sub>(опыт)/LC<sub>50</sub>(контроль), где LC<sub>50</sub>(опыт) — среднетоксическая концентрация антагониста на фоне действия ГАМК-миметика, а LC<sub>50</sub>(контроль) — среднетоксическая концентрация антагониста в отсутствие ГАМК-миметика. ГАМК и вальпроат натрия применяли в эквитоксических концентрациях, кратных величинам их LC<sub>50</sub>. Токсическое действие химических веществ в опытах на мышах определяли по величине LD<sub>50</sub> при подкожном введении.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

На первом этапе исследований была определена чувствительность дафний к ряду антагонистов ГАМК<sub>A</sub>-ре-

<sup>1</sup> Институт озероведения РАН, Санкт-Петербург, 196199, ул. Севастьянова, 9.

<sup>2</sup> Институт токсикологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, 193019, ул. Бехтерева, 1.

Таблица 1. Токсическое действие антагонистов ГАМК на *Daphnia magna Straus* и белых мышей

Препарат	Чувствительность дафний (LC <sub>50</sub> ), мг/л	Токсическое действие на мышей (LD <sub>50</sub> ), мг/кг
Алдрин	0,17 ± 0,03	0,1 ± 0,03
Дилдрин	2,10 ± 0,30	1,2 ± 0,08
Эндрин	2,50 ± 0,50	1,6 ± 0,07
Норборнан	2,53 ± 0,36	0,5 ± 0,09
Адамантан	6,46 ± 1,87	0,5 ± 0,03
Фенилсилатран	10,4 ± 1,78	0,52 ± 0,04
Пикротоксин	10,7 ± 2,78	4,7 ± 0,09
Тиосемикарбазид	17,4 ± 4,84	9,45 ± 1,2
Бикукуллин	17,5 ± 6,42	2,5 ± 0,5
Коразол	228,3 ± 30,0	84,4 ± 10,2
Бемегрид	340,4 ± 40,0	95,0 ± 12,3

цептора, принадлежащих к различным классам химических соединений с различными биохимическими механизмами действия, но общим физиологическим ответом — блокадой активируемой ГАМК проводимости хлор-ионного канала. Параллельно определяли чувствительность дафний к ГАМК-литикам и токсичность этих препаратов для белых мышей при экспозиции в течение одних суток. Данные представлены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, токсическое действие антагонистов ГАМК на теплокровных животных и гидробионтов достаточно высоко. При этом, если чувствительность животных к различным антагонистам ГАМК варьирует в пределах трех порядков, то межвидовые различия токсического действия для каждого лиганда весьма малы и не превышают двадцати раз. Коэффициент корреляции между чувствительностью дафний к антагонистам ГАМК и токсичностью для мышей достаточно высок ( $r = 0,986$ ), что позволяет предположить наличие одинакового механизма токсического действия исследованных препаратов для обо-

их видов животных. Поскольку в экспериментах на мышцах получены убедительные доказательства того, что токсичность большого ряда антагонистов ГАМК коррелирует с их способностью ингибировать стимулируемый ГАМК захват <sup>36</sup>Cl везикулами коры большого мозга и блокировать проводимость хлор-ионного канала [8, 9], высокая корреляция токсичности антагонистов ГАМК для мышей и чувствительности к ним дафний является косвенным подтверждением наличия у дафний хлор-ионного канала, аналогичного каналу млекопитающих.

На следующем этапе исследований в экспериментах на дафниях был проведен фармакологический анализ конкурентных взаимоотношений агонистов и антагонистов ГАМК-бензодиазепин-ионофорного комплекса. В качестве классических конкурентных агонистов ГАМК<sub>A</sub>-рецептора использовали природный медиатор — гамма-аминомасляную кислоту и вальпроат натрия — вещество, способное блокировать ГАМК-трансаминазу (основной путь метаболического превращения ГАМК) и вызывать накопление в организме эндогенного медиатора. Гибель животных вызывали путем введения в среду антагонистов ГАМК различного типа действия.

С этой целью использовали конкурентный антагонист ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов — бикукуллин, пресинаптический антагонист — тиосемикарбазид, обратимый блокатор хлор-ионного канала третбутилбициклофосфат, необратимый блокатор хлор-ионного канала — норборнан. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Из представленных данных следует, что в присутствии ГАМК-миметиков токсическое действие на дафний всех использованных антагонистов ГАМК имеет тенденцию к снижению, однако, лишь в случае третбутилбициклофосфата это снижение было достоверным при взаимодействии с ГАМК и вальпроатом натрия и характеризовалось пороговой концентрацией, равной 1/20 LC<sub>50</sub> для ГАМК и 1/50 LC<sub>50</sub> для вальпроата на-

Таблица 2. Влияние конкурентных агонистов ГАМК<sub>A</sub>-рецептора (ГАМК и вальпроата натрия) на действие различных антагонистов ГАМК в экспериментах на *Daphnia magna Straus*

Агонист ГАМК <sub>A</sub> -рецепторов	Доля от LC <sub>50</sub> агониста	Бикукуллин		Тиосемикарбазид		Третбутилбициклофосфат		Норборнан		Фенилсилатран	
		LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ	LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ	LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ	LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ	LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ
Контроль		17,5 ± 6,4	—	17,4 ± 4,8	—	5,6 ± 1,3	—	2,5 ± 0,36	—	10,4 ± 1,8	—
ГАМК	1/100	20,1 ± 5,4	1,2	22,6 ± 7,4	1,3	6,8 ± 1,5	1,2	—	—	9,4 ± 4,5	0,9
	1/50	28,0 ± 5,2	1,6	26,1 ± 8,1	1,5	8,3 ± 1,8	1,5	3,0 ± 1,0	1,2	12,5 ± 2,8	1,2
	1/20	22,7 ± 2,8	1,3	24,4 ± 7,2	1,4	16,5 ± 4,6*	2,9	3,8 ± 0,6	1,5	14,6 ± 4,5	1,4
	1/10	26,2 ± 5,1	1,5	34,8 ± 4,2*	2,0	21,9 ± 7,2*	3,9	3,3 ± 1,0	1,3	13,5 ± 5,4	1,3
Вальпроат натрия	1/100	21,0 ± 6,0	1,2	18,3 ± 3,8	1,1	8,3 ± 2,0	1,5	—	—	11,1 ± 3,2	1,1
	1/50	22,7 ± 6,3	1,3	24,4 ± 3,8	1,4	15,3 ± 1,8*	2,7	2,6 ± 0,9	1,0	13,1 ± 3,9	1,3
	1/20	20,8 ± 2,6	1,2	19,0 ± 5,8	1,1	12,2 ± 2,3*	2,2	3,5 ± 1,1	1,4	10,6 ± 3,3	1,0
	1/10	24,5 ± 3,0	1,4	24,8 ± 9,2	1,4	13,7 ± 2,4*	2,6	3,5 ± 1,1	1,4	12,4 ± 2,7	1,2

Примечание: \* — отличие от контроля достоверно, при  $p < 0,05$ . LC<sub>50</sub> ГАМК — 960 ± 220 мг/л, LC<sub>50</sub> вальпроата натрия — 73,1 ± 17,3 мг/л.

Таблица 3. Влияние агонистов бензодиазепинового рецептора и участка связывания барбитуратов на активность антагонистов ГАМК в экспериментах на *Daphnia magna Straus*

Агонисты	Доза, мг/л	Коразол		БемеGRID		Третбутилбициклофосфат		Норборнан		Тиосемикарбазид	
		LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ	LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ	LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ	LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ	LC <sub>50</sub> , мг/л	ИЗ
Контроль		288 ± 30	-	400 ± 42	-	5,5 ± 0,9	-	2,5 ± 0,7	-	17,4 ± 4,8	-
Феназепам	0,01	320 ± 50	1,2	405 ± 51	1,0	-	-	-	-	-	-
	0,025	922 ± 216*	3,2	847 ± 24	2,1	-	-	-	-	-	-
	0,1	834 ± 208*	2,9	1009 ± 266*	2,5	15,1 ± 2,1*	2,7	3,0 ± 1,2	1,2	41,8 ± 5,3*	2,4
	0,5	596 ± 243	2,1	926 ± 144*	2,3	14,2 ± 3,1*	2,6	2,1 ± 0,5	0,8	26,2 ± 2,1	1,5
	2,0	-	-	-	-	12,1 ± 1,3	2,2	-	-	-	-
Диазепам	0,1	-	-	-	-	-	-	3,4 ± 0,9	1,4	31,0 ± 5,3	1,7
	0,2	-	-	-	-	-	-	2,3 ± 0,5	0,9	41,8 ± 4,3*	2,4
Фенобарбитал	0,1	300 ± 52	1,0	721 ± 188	1,8	-	-	-	-	-	-
	1,0	683 ± 154*	2,4	1233 ± 275*	3,1	-	-	-	-	-	-
	10,0	716 ± 121*	2,5	1321 ± 446*	3,3	-	-	-	-	-	-

**Примечание:** \* — отличие от контроля достоверно, при  $p < 0,05$ . LC<sub>50</sub> феназепама — 18,1 ± 1,3 мг/л, LC<sub>50</sub> диазепама — 240 ± 10,5 мг/л, LC<sub>50</sub> фенобарбитала — 116 ± 8,5 мг/л.

трия. Чувствительность гидробионтов к тиосемикарбазиду достоверно снижалась лишь при действии ГАМК в концентрации, равной 1/10 LC<sub>50</sub>. Чувствительность дафний к конкурентному антагонисту ГАМК бикикуллину в присутствии конкурентных ГАМК<sub>A</sub>-миметиков достоверно не изменялась.

В следующей серии экспериментов анализировали влияние конкурентных агонистов бензодиазепинового участка ГАМК<sub>A</sub>-бензодиазепин-хлор-ионного рецепторного комплекса — феназепама и диазепама и агониста участка связывания барбитуратов фенобарбитала на токсическое действие антагонистов ГАМК — антагонистов хлор-ионного канала и тиосемикарбазида (табл. 3). Из данных, представленных в табл. 3, следует, что агонисты бензодиазепинового рецептора и участка связывания барбитуратов способны снижать токсическое действие как антагонистов хлор-ионного канала, так и пресинаптического антагониста ГАМК тиосемикарбазида, в отношении которого известно, что он тормозит синтез ГАМК в головном мозге млекопитающих. Исключение представляет препарат норборнан, с которым не способны антагонизировать ни агонисты ГАМК<sub>A</sub>-рецептора (табл. 2), ни агонисты бензодиазепинового участка связывания. Согласно литературным данным, полученным на млекопитающих, норборнан способен необратимо блокировать хлор-ионный канал и захват меченого хлора синапсомозами мозга мышей. В отличие от действия бициклофосфатов и пикротоксина после преинкубации синапсомозом с норборнаном и последующей их отмычки проводимость хлор-ионного канала и захват меченого хлора синапсомозами не восстанавливается [1]. Очевидно, эта особенность фармакодинамики норборнана нашла свое отражение в неспособности ГАМК-миметиков снижать его токсическое действие в экспериментах *in vivo* на дафниях при выбранном времени экспозиции — одни сутки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у дафний, как и у млекопитающих, классические агонисты ГАМК-бензодиазепин-хлор-ионного комплекса являются антагонистами ГАМК, а гидробионт *Daphnia magna Straus* может быть адекватным биообъектом для изучения конкурентных взаимоотношений ГАМК-ергических препаратов различного типа действия в условиях целостного организма. Однако, как следует из данных, представленных в табл. 2 и 3, способность ГАМК-миметиков предотвращать отравление антагонистами ГАМК в экспериментах *in vivo* в большей мере определяется, по-видимому, фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками конкретных лигандов, чем прямой конкуренцией на различных участках связывания ГАМК-бензодиазепин-ионофорного комплекса. Эти результаты следует учитывать при первичном скрининге ГАМК-ергических препаратов в опытах на *Daphnia magna Straus* и при отборе лигандов для целей фармакологического анализа межмедиаторных отношений с использованием гидробионтов.

Выводы

## ВЫВОДЫ

1. Установлена высокая степень корреляции между токсическим действием антагонистов ГАМК различного типа и представителей разных классов химических соединений для дафний и мышей.
2. В экспериментах *in vivo* на дафниях выявлен антагонизм классических ГАМК-миметиков с действием антагонистов ГАМК.
3. Способность ГАМК-миметиков предотвращать действие антагонистов ГАМК в условиях целостного организма у дафний в большей степени определяется фармакодинамическими характеристиками действующих препаратов, чем прямой конкуренцией лигандов

за участки связывания в пределах ГАМК<sub>A</sub>-рецепторного комплекса.

Работа частично поддержана РФФИ 03-04-49696.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Головки, С. И. Головки, С. Ю. Зефиоров, Г. А. Софронов, *Токсикология ГАМК-литиков*, Нива, Санкт-Петербург, 1996.
2. А. Б. Космачев, В. Д. Тонкопий, Н. П. Подосиновичева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(6), 13 – 17 (2000).
3. *Международный стандарт ISO 6341-82. Качество воды. Определение угнетения подвижности Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacera)* (1987).
4. *Методические рекомендации по использованию Daphnia magna в качестве биообъекта для отбора средств лечения отравлений психотропными препаратами (нейролептиками)*, рег. номер МЗ РФ 91 / 168, Санкт-Петербург (1999).
5. Н. П. Подосиновичева, А. Б. Космачев, В. Д. Тонкопий и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(1), 73 – 74 (2002).
6. В. Б. Прозоровский, М. П. Прозоровская, В. М. Демченко, *Фармакол. и токсикол.*, № 4, 56 – 58 (1978).
7. В. Д. Тонкопий, А. Б. Космачев, А. О. Загребин и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **62**(6), 23 – 25 (1999).
8. I. E. Casida, C. I. Palmer and L. M. Cole, *Mol. Pharmacol.*, **28**(3), 246 – 253, (1985).
9. T. Obata, H. I. Jamamura, E. Malatynska, et al., *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, **244**(3), 802 – 806(1988).

Поступила 21.06.04.

## DAPHNIA MAGNA STRAUS: A TEST OBJECT FOR THE PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF GABA-ERGIC DRUGS IN THE WHOLE ORGANISM

V. D. Tonkopi<sup>1</sup>, N. P. Podosinovich<sup>2</sup>, A. O. Zagrebina<sup>1</sup>, L. A. Sherstneva<sup>1</sup>, V. V. Petrov<sup>2</sup>, L. A. Mukovskii<sup>2</sup>, and V. B. Dolgo-Saburov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Limnology, Russian Academy of Sciences, ul. Sevast'yanova 9, St. Petersburg, 196199 Russia.

<sup>2</sup> Institute of Toxicology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Bekhtereva 1, St. Petersburg, 193019 Russia.

The toxicity of a series of GABAlytics (11 drugs) representing different pharmacological groups was evaluated in comparative experiments on *Daphnia magna Straus* and white mice. A high degree of correlation was established between the toxicity of GABA antagonists studied in daphnia and mice. The pharmacological analysis of the interaction of agonists and antagonists of GABA/benzodiazepine/ionophore-receptor complex – the competitive ligands for various binding sites – was carried out. It is suggested that the ability of GABA agonists to prevent the action of GABA antagonists in whole organism is mainly determined by their pharmacokinetic and pharmacodynamic features, rather than by direct competition for binding sites within the receptor complex.