

## **DAPHNIA MAGNA STRAUS — НОВЫЙ ТЕСТ-ОБЪЕКТ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЕФИЦИТА ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ, ВЫЗВАННОГО ИЗБИРАТЕЛЬНЫМ НЕЙРОТОКСИНОМ МФТП**

**Н. П. Подосиновичева, В. В. Петров, В. А. Беляев,  
А. Я. Беспалов, В. В. Трефилов, В. Б. Долго-Сабуров<sup>1</sup>**

В настоящей работе проведено определение возможности использования гидробионтов *Daphnia magna Straus* в качестве тест-объекта при моделировании дефицита дофаминергической нейротрансмиссии. С целью повышения чувствительности и информативности подхода проведена токсиметрическая оценка действия на дафний избирательного экзогенного нейротоксина — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6 тетрагидропиридина (МФТП) в широком диапазоне концентраций ( $2 \cdot 10^{-4}$  –  $5 \cdot 10^{-2}$  М). Представлены графические данные зависимости реального времени гибели дафний от концентрации нейротоксина и определен диапазон его специфической активности. В экспериментах на дафниях при отравлении МФТП проведена оценка модулирующего действия средств фармакологической коррекции дефицита дофамина, используемых в опытах на млекопитающих. Показано, что дофамин, холиноблокатор пентифин и антиоксидант унитиол оказывают защитное действие при отравлении МФТП. Восстановленный глутатион подобным действием не обладает. Высказано предположение о возможности использования дафний в качестве простого и доступного тест-объекта для моделирования дефицита дофаминергической системы и первичного отбора средств фармакологической коррекции.

**Ключевые слова:** дофамин, дофаминергическая система, нейротоксин МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), дефицит дофамина, *Daphnia magna Straus*

### **ВВЕДЕНИЕ**

Модель дефицита дофаминергической передачи, обусловленного повреждением дофамин-синтезирующих нейронов у млекопитающих, является наиболее адекватной для формирования симптомокомплекса, максимально приближенного к паркинсоноподобному состоянию. В настоящее время считается установленным, что 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) является экзогенным нейротоксином, вызывающим у млекопитающих развитие паркинсоноподобного симптомокомплекса вследствие нарушения дофаминергической системы базальных ганглиев. Согласно литературным данным, токсическое действие МФТП, проявляющееся в избирательном повреждении nigro-стриатных дофаминергических нейронов, обусловлено в значительной степени развитием оксидативного стресса [4]. Механизмы токсического действия МФТП совпадают с механизмом действия некоторых производных изохинолина, которые присутствуют в мозге млекопитающих и, являясь эндогенными нейротоксинами, рассматриваются как потенциальные факторы риска болезни Паркинсона [4]. Однако использование в качестве тест-объекта млекопитающих

требует проведения длительных и сложных экспериментов.

Целью настоящего исследования явилась апробация модели нейротоксического нарушения дофаминергической нейротрансмиссии под действием МФТП с использованием в качестве биообъекта гидробионта *Daphnia magna Straus* и оценка на дафниях модулирующего действия средств фармакологической коррекции дефицита секреции дофамина, используемых в экспериментах на млекопитающих.

### **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Опыты поставлены с использованием в качестве тест-объекта гидробионтов *Daphnia magna Straus*. Дафний разводили в лабораторных условиях в соответствии с требованиями международного стандарта по биотестированию воды [1]. Дафний в возрасте 7 суток помещали в лабораторные стаканчики по 1 особи в каждую пробу объемом 40 мл. Измерение токсического действия МФТП проводили на протяжении 6 сут. Результаты оценивали по определению реального времени гибели гидробионтов при различных концентрациях ксенобиотика. Концентрация МФТП изменялась с шагом 0,1 по логарифмической шкале. Данные были представлены в виде графика зависимости среднего времени гибели ( $T$ , мин) от величины обратной концентрации ( $1/C$ ,  $M^{-1}$ ). Модулирующее действие средств фармакологической коррекции дефицита до-

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

фамина оценивали по изменению времени гибели дафний под действием МФТП при одной фиксированной концентрации последнего в условиях одновременного внесения в пробу нейротоксина и препарата-модулятора в предварительно подобранной концентрации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

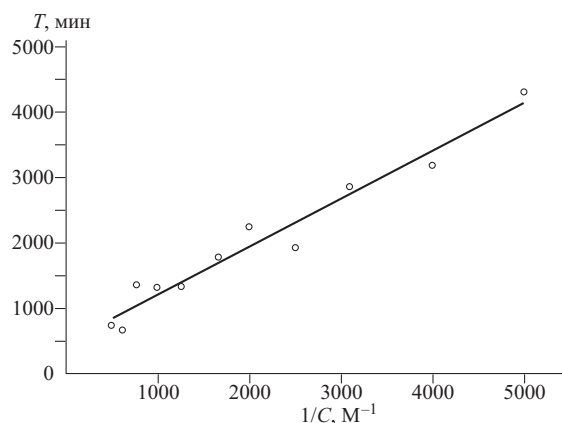
Существование у дафний дофаминергической нейрореперации показано в предыдущих исследованиях [2, 3], что позволило сделать предположение о возможности развития у гидробионтов патологического процесса при разрушении МФТП дофаминсинтезирующих структур. Токсическое действие МФТП оценивали в диапазоне концентраций от  $2 \cdot 10^{-4}$  М до  $5 \cdot 10^{-2}$  М. При высоких концентрациях токсиканта ( $5 \cdot 10^{-2}$  –  $5 \cdot 10^{-3}$  М) время гибели дафний практически не зависело от концентрации и составляло  $7 \pm 1,2$  мин. В диапазоне концентраций от  $2,5 \cdot 10^{-3}$  до  $4,0 \cdot 10^{-3}$  М наблюдался переход от первого (условно неспецифического) механизма гибели животных ко второму, который характеризовался прямо пропорциональной зависимостью среднего времени гибели дафний от концентрации МФТП и с высокой степенью корреляции ( $r = 0,98$ ) описывался уравнением прямой:  $T = 481,3 + 0,7 \cdot 1/C$ , где  $T$  — реальное время гибели дафний (мин) при концентрации токсина  $C$  (М). Такого рода зависимость характеризовала весь дальнейший период наблюдения (до 6 сут) в интервале концентраций МФТП от  $2 \cdot 10^{-3}$  до  $2 \cdot 10^{-2}$  М. Результаты представлены на рисунке.

График зависимости времени гибели дафний от величины обратной концентрации МФТП.

Коэффициент 0,7, характеризующий тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс, численно равен произведению действующей концентрации на соответствующее ей время жизни и определяет чувствительность гидробионтов к данному токсину. Как следует из представленных данных, чувствительность дафний к МФТП не меняется в диапазоне концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  –  $2 \cdot 10^{-3}$  М. В этом интервале была выбрана концентрация нейротоксина  $1,25 \cdot 10^{-3}$  М, при которой оценивалось модулирующее действие фармакологических препаратов, обладающих защитным действием в условиях дефицита дофамина у млекопитающих. Выбор этой концентрации был обусловлен возможностью регистрации гибели животных в дневное время (от 9 до 21 ч).

В качестве фармакологических корректоров были использованы экзогенный дофамин, *m*-холиноблокатор пентифин, а также, учитывая специфическое прооксидантное действие МФТП у млекопитающих, исследовано изменение чувствительности к нейротоксину в присутствии антиоксидантов — восстановленного глутатиона и унитиола (таблица).

Оказалось, что в экспериментах на гидробионтах, подобно опытам на млекопитающих, МФТП вызывает



Зависимость среднего времени гибели ( $T$ , мин) от величины обратной концентрации ( $1/C, \text{M}^{-1}$ ).

токсическое действие, выраженность которого достоверно снижается (время жизни увеличивается) при добавлении в среду дофамина или холиноблокатора, что свидетельствует о существенном вкладе дефицита дофамина в механизмы токсичности МФТП для дафний. Полученные результаты позволяют высказать предположение о перспективности использования гидробионтов для создания модели нейротоксического нарушения дофаминергической медиации под действием МФТП. Восстановленный глутатион в предложенном варианте постановки эксперимента не оказывал влияния на время гибели дафний в присутствии МФТП, в то время как унитиол достоверно его увеличивал. Полученные данные не позволяют дать объяснение различиям в механизмах действия двух антиоксидантов в условиях отравления нейротоксином и свидетельствуют о необходимости дополнительного исследования.

## ВЫВОДЫ

1. Специфический дофаминергический нейротоксин МФТП вызывает у дафний, подобно млекопитающим, нарушение дофаминергической нервной передачи.
2. Фармакологические корректоры дефицита дофамина у млекопитающих (экзогенный дофамин, *m*-холиноблокатор пентифин, антиоксидант унитиол) сни-

### Влияние средств фармакологической коррекции на время гибели дафний под действием МФТП в концентрации $1,25 \cdot 10^{-3}$ М

Вещества	Среднее время гибели дафний, ч, $M \pm m$
1. МФТП	$18,5 \pm 2,6$
2. МФТП + дофамин, $4,15 \cdot 10^{-5}$ М	$29,4 \pm 2,9^*$
3. МФТП + пентифин, $2,9 \cdot 10^{-6}$ М	$25,7 \pm 2,1^*$
4. МФТП + глутатион-SH, $1,62 \cdot 10^{-5}$ М	$20,4 \pm 3,1$
5. МФТП + унитиол, $3,33 \cdot 10^{-4}$ М	$25,5 \pm 2,0^*$

Примечание. \* — отличие от действия одного МФТП достоверно при  $p < 0,05$ .

жают чувствительность гидробионтов к токсическому действию МФТП.

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. Космачёв, В. Д. Тонкопий, Н. П. Подосиновичева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(6), 15 – 17 (2000).
3. Н. П. Подосиновичева, А. Б. Космачёв, В. Д. Тонкопий и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **64**(6), 20 – 22 (2001).
4. L. Antkiewicz-Michaluk, *Pol. J. Pharmacol.*, **54**, 567 – 572 (2002).

Поступила 07.06.07

### ***Daphnia Magna* (STRAUS): A NEW TEST OBJECT FOR MODELING OF DOPAMINERGIC NEUROTRANSMISSION DEFICIENCY INDUCED BY THE SELECTIVE NEUROTOXIN 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE**

**N. P. Podosinovichova, V. V. Petrov, V. A. Belyaev, A. Ya. Bespalov, V. V. Trefilov, and V. B. Dolgo-Saburov**

Department of Biochemistry, Institute of Toxicology, Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation, ul. Bekhtereva 1, St. Petersburg, 193019, Russia

The possibility of using *Daphnia magna* (Straus) hydrobionts as a test object in modeling the disturbances of dopaminergic neurotransmission was investigated. The toxic action of a selective dopaminergic neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), on *D. magna* was determined in a broad interval of concentrations (from  $2 \times 10^{-5}$  to  $10^{-2}$  M). Plots of the real time of *daphnia* death versus MPTP concentration are presented and the concentration limits of its specific activity are evaluated. Experiments on *daphnia* under the conditions of MPTP intoxication were used to study the modulating effects of drugs producing a pharmacological correction of dopamine secretion disturbances in mammals. It is shown that the exogenous dopamine, muscarinic cholinoblocker pentifine, and antioxidant unithiol exhibit a protective action. Reduced glutathione does not possess protective properties. It is suggested to use *D. magna* as a simple and informative test object for the modeling of dopaminergic transmission deficiency and for the primary screening of various substances intended for the pharmacological correction of dopamine transmission disturbances.