

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-81-84>



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ *DAPHNIA MAGNA STRAUS* В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА ДЛЯ СКРИНИНГА ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

А.А. Бондаренко*, А.С. Мелехова, А.Я. Беспалов, Т.Л. Горчакова, Л.И. Прокопенко

ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

С использованием в качестве экспериментальной модели зоогидробионтов *Daphnia magna Straus* проведен первичный скрининг соединений группы аминоэфиров вальпроевой кислоты, обладающих противосудорожной и холиноблокирующей активностью, который позволил отобрать наиболее эффективные соединения для дальнейшего тестирования их на теплокровных животных. Отбор проводили по результатам определения минимальной эффективной концентрации по предотвращению атипичной двигательной гиперактивности, вызванной фенокарбаматом.

Ключевые слова: холинергические вещества, холиноблокаторы, первичный скрининг, *Daphnia magna Straus*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Бондаренко А.А., Мелехова А.С., Беспалов А.Я., Горчакова Т.Л., Прокопенко Л.И. Использование *Daphnia magna Straus* в качестве тест-объекта для скрининга холинергических фармакологических веществ. *Биомедицина*. 2023;19(3E):81–84. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-81-84>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 24.05.2023

Опубликована 06.11.2023

DAPHNIA MAGNA STRAUS AS A TEST OBJECT FOR SCREENING CHOLINERGIC PHARMACOLOGICAL SUBSTANCES

Anastasiya A. Bondarenko*, Aleksandra S. Melehova, Aleksandr Ya. Bepalov,
Tat'jana L. Gorchakova, Ljubov' I. Prokopenko

Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Behtereva Str., 1

Daphnia magna Straus was used as an experimental zoohydrobiont model for primary screening of compounds of the valproic acid aminoether group with anticonvulsant and cholinoblocking activity. On this basis, the most effective compounds for further trials in warm-blooded animals were selected. The selection criterion included their minimum effective concentration for the prevention of atypical motor hyperactivity induced by phenylcarbamate.

Keywords: cholinergic substances, anticholinergic drugs, primary screening, *Daphnia magna Straus*

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Bondarenko A.A., Melehova A.S., Bepalov A.Ya., Gorchakova T.L., Prokopenko L.I. *Daphnia magna Straus* as a Test Object for Screening Cholinergic Pharmacological Substances. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):81–84. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-81-84>

Submitted 20.04.2023

Revised 24.04.2023

Published 06.11.2023

Введение

Дафнии широко используются в экотоксикологических исследованиях по определению токсичности химических веществ. Вследствие того, что у дафний поведенческие реакции контролируются нервной системой, воздействие на них нейротропными веществами приводит к изменению их плавательной активности; таким образом, они могут быть использованы для проверки эффективности данной группы веществ [8]. Холинергическая медиаторная система дафний в настоящее время хорошо изучена, поэтому с их помощью возможно проведение первичного отбора препаратов холинергического типа действия [5].

Добавление в водную среду ингибиторов ацетилхолинэстеразы вызывает атипичную двигательную гиперактивность (АДГА) у дафний, что эквивалентно выраженному судорожному состоянию у теплокровных животных. Таким образом, по критерию предотвращения наступления АДГА можно проводить первичный отбор потенциальных противосудорожных препаратов, что позволит сократить количество используемых млекопитающих в экспериментальных исследованиях [7].

Материалы и методы

Эксперименты проводили на зооидриобионтах *Daphnia magna* Straus, выращенных в лабораторных условиях в соответствии с требованиями международного стандарта по биотестированию воды [6]. Использовали в опытах синхронизированную культуру возрастом 7 сут. Биотестирование проводили в климатостате Р-2 (ООО «СФУ-Система», Россия), который поддерживает температуру $20 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

В качестве объектов исследования была выбрана группа соединений ряда аминокислот вальпроевой кислоты (АВК), обладающих противосудорожной и холиноблокирующей активностью, синтезированных в ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России» [3].

Среднелетальную концентрацию ($ЛК_{50}$) определяли в соответствии с работой [4].

Для определения эффективной концентрации по предотвращению АДГА ($ЭК_{99}$) pripravивали 4–6 разбавлений исследуемых веществ (по 3 пробы на каждую концентрацию), затем помещали в каждое разбавление по 4 дафнии. Через 1 ч добавляли в каждую емкость р-р фенилкарбамата (ФК) в концентрации, вызывающей АДГА

Таблица. Результаты определения $ЭК_{99}$ при отравлении ФК, экспозиция 24 ч

Table. The results of the determination of EC_{99} with PC poisoning, exposure 24 hours

Препарат	$ЛК_{50}$, мг/л ($M \pm m$)	$ЭК_{99}$, мг/л ($M \pm m$)	$ЛК_{50}/ЭК_{99}$
Образец № 3 (Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2пропилентаноата)	1240±430	26,50±5,89	46,8
Атропин	144±51,0	3,33±0,74	43,2
Образец № 12	181,3±47,3	4,20±0,93	43,2
Образец № 14	362,0±94,0	16,70±3,70	21,7
Образец № 4	13,3±3,0	0,84±0,19	15,8
Образец № 5	105,5±23,4	21,10±4,70	5,0
Образец № 15	39,2±13,6	16,70±3,70	2,3

Примечание: $ЛК_{50}$ — среднелетальная концентрация; $ЭК_{99}$ — минимальная эффективная концентрация по предотвращению АДГА; $ЛК_{50}/ЭК_{99}$ — «терапевтический» интервал действия препаратов. Концентрации определяли методом пробит-анализа.

Note: $ЛК_{50}$ — median lethal concentration; $ЭК_{99}$ — minimum effective concentration by AMHA prevention; $ЛК_{50}/ЭК_{99}$ — “therapeutic” drug action interval. Concentrations were determined by the probit analysis method.

у всех дафний с минимальным процентом летальности (0,06 мг/л) [4]. Три пробы с р-ром ФК без добавления исследуемых АВК использовали в качестве контроля. Через 24 ч визуально фиксировали наличие АДГА у дафний в каждой пробе. ЭК₉₉ рассчитывали методом пробит-анализа. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Результаты исследований

В таблице представлены результаты эксперимента. ФК был выбран в качестве отравляющего агента, т.к. именно он применяется при моделировании тяжелого отравления теплокровных животных обратимыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы для поиска эффективных противосудорожных препаратов [2].

Активность тестируемых препаратов сравнивали с атропином (неселективным М-холиноблокатором), являющимся обще-

принятым антидотом при отравлении карбаматами [1].

По результатам эксперимента было показано, что наиболее высокую активность среди обследованных препаратов по предотвращению наступления АДГА проявили образцы № 3 и 12, их результат был сопоставим с атропином. Образец № 14 в исследовании на дафниях был в 2 раза менее эффективен, чем атропин, а образец № 4 в 2,7 раза менее эффективен. Образцы № 5 и 15 обладали наименьшей активностью по предотвращению АДГА у дафний среди обследованных препаратов.

Выводы

Таким образом, с помощью скрининга на дафниях были отобраны наиболее эффективные АВК, которые в дальнейшем можно исследовать в экспериментах на теплокровных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Лудевиг Р., Лос К. *Острые отравления*. М.: Медицина, 1983:560. [Ludevig R., Los K. *Ostrye otravlenija* [Acute poisonings]. Moscow: Medicina Publ., 1983:560. (In Russian)].
2. Мелехова А.С., Петров А.Н., Беспалов А.Я., Бельская А.В., Мельникова М.В., Зацепин Э.П., Шестова Г.В., Ганеев А.А. Экспериментальная фармакотерапия судорожного синдрома при моделировании тяжелого отравления карбаматом. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2019;20(2):294–306. [Melehova A.S., Petrov A.N., Bepalov A.Ja., Bel'skaja A.V., Mel'nikova M.V., Zacepin Je.P., Shestova G.V., Ganeev A.A. Jeksperimental'naja farmakoterapija sudorozhnogo sindroma pri modelirovanii tjazhjologo otravlenija karbamatom [Experimental pharmacotherapy of convulsive syndrome in the simulation of severe carbamate poisoning]. *Medline.ru. Russian biomedical journal*. 2019;20(2):294–306. (In Russian)].
3. Патент № 2714135 Российская Федерация, МПК C07D 295/03 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01) A61P 21/02 (2006.01). *Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2пропиленаноата, обладающий холинолитической и противосудорожной активностью*. Беспалов А.Я., Прокопенко Л.И., Горчакова Т.Л., Козлов В.К., Петров А.Н., Зайцева М.А., Мелехова А.С., Бельская А.В., Мельникова М.В., Иванов М.Б., заявитель и патентообладатель ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА — 2019137931; заявл. 22.11.2019; опубл. 12.02.2020. [Patent No. 2714135 Russian Federation, MPK C07D 295/03 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01) A61P 21/02 (2006.01). *Gidrohlorid (1-metilpiperidin-4-il)-2propilentanoata, obladajushij holinolitičeskoj i protivosudorožnoj aktivnost'ju*. [Hydrochloride of (1-methylpiperidin-4-yl)-2-propylentanoate, which has anticholinergic and anticonvulsant activity]. Bepalov A.Ja., Prokopenko L.I., Gorchakova T.L., Kozlov V.K., Petrov A.N., Zajceva M.A., Melehova A.S., Bel'skaja A.V., Mel'nikova M.V., Ivanov M.B., applicant and patent holder of the Federal State Budgetary Institution “Institute of Toxicology” FMBA — 2019137931; application 11/22/2019; publ. 02/12/2020. (In Russian)].
4. Подосиновичева Н.П., Александрова М.Л., Бондаренко А.А., Горчакова Т.Л., Беспалов А.Я., Ватаева А.А., Мастерова К.В., Журкович И.К. Скрининг холинергических фармакологических веществ на биологических тест-объектах — зоогидробионтах *Daphnia magna* Straus. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(5):3–9. [Podosinovicova N.P., Aleksandrova M.L., Bondarenko A.A., Gorchakova T.L., Bepalov A.Ja., Vataeva A.A., Masterova K.V., Zhurkovich I.K. Skriniring holinergičeskikh farmakologičeskikh veshhestv na biologičeskikh test-ob'ektah — zoogidrobiontah *Daphnia magna* Straus [Screening of cholinergic drugs using *Daphnia magna* Straus hydro-

- bionts as biological test objects]. *J. of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(5):3–9. (In Russian)].
5. Подосиновикова Н.П., Космачев А.Б., Тонкопий В.Д., Загребин А.О., Евдокимова Е.А., Малов А.М., Петров В.В., Долго-Сабуров В.Б. *Daphnia magna* Straus как объект при исследовании препаратов холинергического типа действия. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(1):73–74. [Podosinovicova N.P., Aleksandrova M.L., Bondarenko A.A., Gorchakova T.L., Bepalov A.Ja., Vataeva A.A., Masterova K.V., Zhurkovich I.K. Skrining holinerghicheskikh farmakologicheskikh veshhestv na biologicheskikh test-ob'ektah — zoogidrobiontah *Daphnia magna* Straus [Screening of cholinergic drugs using *Daphnia magna* Straus hydrobionts as biological test objects. *J. of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(5):3–9. (In Russian)].
 6. ФР.1.39.2007.003222, «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний». М.: АКВАРОС, 2007. [FR.1.39.2007.003222, “Metodika opredelenija toksichnosti vody i vodnyh vytyazhek iz pochv, osadkov stochnyh vod, othodov po smertnosti i izmeneniju plodovitosti dafnij” [“Methodology for determining the toxicity of water and water extracts from soils, sewage sludge, waste by mortality and changes in the fertility of *Daphnia*”]. Moscow: AKVAROS Publ., 2007. (In Russian)].
 7. Ren Z., Zhang X., Wang X., Qi P., Zhang B., Zeng Y., Fu R., Miao M. AChE inhibition: One dominant factor for swimming behavior changes of *Daphnia magna* under DDVP exposure. *Chemosphere*. 2015:252–257.
 8. Tkaczyk A., Bownik A., Dudka J., Kowal K., Ślaska B. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of the Total Environment*. 2021;763:1–18.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Бондаренко Анастасия Александровна*, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России;

e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

Anastasiya A. Bondarenko*, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru

Мелехова Александра Сергеевна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

e-mail: melehovalalexandra@gmail.com

Aleksandra S. Melehoa, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: melehovalalexandra@gmail.com

Беспалов Александр Яковлевич, к.х.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

e-mail: albsp2011@yandex.ru

Aleksandr Ya. Bepalov, Cand. Sci. (Chem.), Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: albsp2011@yandex.ru

Горчакова Татьяна Леонидовна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

e-mail: albsp2011@yandex.ru

Tat'jana L. Gorchakova, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: albsp2011@yandex.ru

Прокопенко Любовь Ивановна, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

e-mail: albsp2011@yandex.ru

Ljubov' I. Prokopenko, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: albsp2011@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author