

**ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ ПРОТИВОСУДОРОЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗООГИДРОБИОНТОВ DAPHNIA MAGNA STRAUS**

Бондаренко А.А., Подосиновикова Н.П., Зайцева М.А., Мелехова А.С., Мельникова
М.В., Бельская А.В., Лисицкий Д.С., Верведа А.Б., Вихарев Ю.Б.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии
Федерального медико-биологического агентства», 192019, Санкт-Петербург, ул.
Бехтерева д.1. Тел. +7 (812) 365-06-80, e-mail: bondarenko-nastua@yandex.ru*

Резюме: Предложен метод первичного отбора противосудорожных препаратов с использованием альтернативного тест-объекта *Daphnia magna* Straus. Эффективность препаратов оценивали по отношению среднелетальной концентрации к средней эффективной концентрации. Показано, что М-холино- и NMDA-блокатор карамифен по противосудорожной активности превосходит общепринятый антидот карбаматов атропин. При сопоставлении среднелетальных концентраций препаратов карамифен обладает меньшей токсичностью. Данные результаты находят подтверждение в экспериментах на теплокровных животных.

Ключевые слова: холинергические препараты, противосудорожная активность, среднелетальная концентрация, средняя эффективная концентрация, *Daphnia magna* Straus.

**PRIMARY SCREENING OF ANTICONVULSANT DRUGS WITH HYDROBIONTS
DAPHNIA MAGNA STRAUS**

Bondarenko A.A., Podosinovicova N.P., Zaytseva M.A., Melekhova A.S., Mel'nikova M.V.,
Bel'skaya A.V., Lisitskiy D.S., Verveda A.B., Vikharev Yu.B.

*«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency, 192019, Saint-Petersburg,
Russian Federation*

Abstract: The method for the primary screening of anticonvulsant drugs with an alternative test object *Daphnia magna* Straus is proposed. The efficacy of the drugs was assessed by the ratio between its median lethal concentrations and median effective concentrations. It is shown that the blocker of M-cholino-receptors and NMDA-receptors karamiphen exceeds the atropine in anticonvulsant activity. Karamiphen has the less toxicity than atropine in comparing median lethal concentration. These results are confirmed the experiment's on mammals.

Key words: cholinergic drugs, anticonvulsant activity, median lethal concentration, median effective concentration, *Daphnia magna* Straus.

Введение. Учитывая мировую тенденцию сокращения использования теплокровных животных в экспериментальных исследованиях, является актуальной разработка метода первичного отбора потенциальных противосудорожных средств без использования теплокровных животных. В данном исследовании в качестве биологического тест-объекта предлагается использовать зоогидробионтов *Daphnia magna* Straus. Дафнии широко используются в экотоксикологии в связи с высокой чувствительностью к токсикантам, возможностью разведения в лабораторных условиях и получения генетически однородной синхронизированной культуры. Наличие у дафний холинергической медиаторной системы, холинэстеразы и М-холинорецепторов, обладающих одинаковым с рецепторами млекопитающих сродством к неселективным холинолитикам [1, 2], делает их перспективным тест-объектом для первичного скрининга противосудорожных препаратов при отравлениях веществами антихолинэстеразного действия – карбаматами.

Для оценки противосудорожного действия на дафниях были выбраны: препарат карамифен (М-холино- и NMDA-блокатор), ресинтезированный в Институте токсикологии, и атропин (М-холиноблокатор) как общепринятый антидот карбаматов. В качестве судорожного агента использовался обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы из группы карбаматов – фенилкарбамат. После добавления в водную среду фенилкарбамата у дафний развивалась атипичная двигательная гиперактивность (АДГА) в виде беспорядочных хаотичных перемещений и резких подергиваний. Подобное состояние гидробионтов после воздействия судорожного агента фенилкарбамата соответствует выраженному судорожному состоянию у теплокровных животных. В предыдущих исследованиях было показано, что введение фенилкарбамата белым крысам в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно приводило к развитию генерализованных клонико-тонических судорог у 90% животных [5].

В работе оценивались:

1. Способность препаратов предотвращать развитие проявления АДГА у дафний, как эквивалента судорожного синдрома у млекопитающих.
2. Средняя эффективная концентрация препаратов в тесте предотвращения АДГА.
3. Продолжительность действия препаратов по предотвращению АДГА.
4. Отношение среднелетальной концентрации к средней эффективной концентрации препаратов в тесте предотвращения АДГА.

Целью работы являлась разработка метода первичного скрининга противосудорожных препаратов с использованием в качестве тест-объекта зоогидробионтов *Daphnia magna* Straus.

Материалы и методы. Эксперименты были поставлены на гидробионтах *Daphnia magna* Straus в возрасте 7 суток, выращенных в лабораторных условиях в соответствии с требованиями международного стандарта по биотестированию воды [3].

Для определения среднелетальной концентрации препаратов, дафний помещали в стеклянные емкости с растворами исследуемого препарата в возрастающих по логарифмической шкале концентрациях по 4 особи. Объем проб составлял 10 мл. Растворителем являлась культивационная вода. Через 24 часа в каждой из проб отмечалось число погибших и выживших дафний. На основании полученных результатов среднелетальную концентрацию LC_{50} определяли методом пробит-анализа с использованием таблиц, предложенных В. Б. Прозоровским [4].

Для определения средней эффективной концентрации EC_{50} по предотвращению АДГА дафний помещали по 4 особи в стеклянные емкости с раствором исследуемых веществ в 4-х возрастающих по логарифмической шкале концентрациях по 2 параллельные пробы на каждую концентрацию. Через 1 час в каждую емкость добавляли фенилкарбамат в концентрации, способной вызывать развитие АДГА у 100% гидробионтов с минимальным процентом летальности (0,05 мг/л). В качестве контроля использовали 2 параллельные пробы с раствором фенилкарбамата. Через 1 сутки фиксировали наличие у дафний АДГА и рассчитывали EC_{50} методом пробит-анализа с использованием таблиц, предложенных В. Б. Прозоровским [4]. Об эффективности препаратов по предотвращению АДГА – эквивалента генерализованных судорог у теплокровных животных при отравлении фенилкарбаматом, судили по отношению среднелетальной концентрации (LC_{50}) к средней эффективной концентрации (EC_{50}) препарата.

Результаты и обсуждение. Полученные экспериментальные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Средняя эффективная концентрация, среднелетальная концентрация и отношение среднелетальной концентрации к средней эффективной концентрации препаратов при отравлении дафний фенилкарбаматом в концентрации 0,05 мг/л

Препарат	Средняя эффективная концентрация по предотвращению	Среднелетальная концентрация препарата (LC_{50-24}),	Отношение среднелетальной концентрации к

	атипичной двигательной гиперактивности (АДГА) препарата (EC ₅₀₋₂₄), мг/л	мг/л	средней эффективной концентрации препарата LC ₅₀ /EC ₅₀
Атропин	3,33±0,74	144±51	43,2
Карамифен	0,84±0,19	418±126	497,6

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что у атропина средняя эффективная концентрация (EC₅₀) у дафний составляет 0,02 от LC₅₀, а у препарата карамифен 0,002 от LC₅₀, что говорит о его более высокой эффективности в тесте предотвращения проявлений атипичной двигательной гиперактивности, вызванной фенилкарбаматом у гидробионтов. При этом сопоставление среднелетальных концентраций свидетельствует о меньшей токсичности карамифена. Полученные результаты находят подтверждение в экспериментах на теплокровных животных, где показано, что карамифен, существенно превосходит общепринятый антидот карбаматов атропин по противосудорожной активности [5].

Выводы. Предложенный подход позволяет на этапе предварительного скрининга исключить препараты со слабовыраженной противосудорожной активностью или узкой терапевтической шириной действия.

Литература

1. Тонкопий В.Д., Космачев А.П., Загребин А.О. Сравнительный фармакологический анализ М-холинорецепторов у дафний и крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1994. – Т. 102, № 5. – С. 497-499.
2. Подосиновичева 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. – Т. 65, N 1. – С. 73-74.
3. ИСО 6341, 1987. Международный стандарт. Качество воды. Определение чувствительности гидробионтов *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacera).
4. Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакол. биол. наркол. – 2007. – Т. 7, № 3-4. – С. 2090-2120.
5. Мелехова А.С., Войцехович К.О., Лисицкий Д.С., Бельская А.В., Михайлова М.В., Бондаренко А.А. Фармакологическая коррекция нейротоксических нарушений при тяжелом отравлении фенилкарбаматом // Сборник трудов III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» Под общей редакцией д.м.н., профессора А.С. Радилова и д.м.н., профессора В.Р. Рембовского. – СПб., 2018. – С. 177.