

**ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ DAPHNIA MAGNA STRATUS ДЛЯ
СКРИНИНГА ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ СВОЙСТВАМИ
ИНГИБИТОРОВ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

¹Горбачева Т.В., ²Бонитенко Е.Ю., ¹Башарин В.А., ³Бонитенко К.Е.

*¹Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение
высшего образования
«Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской
Федерации*

194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.6

телефон/факс: +7 (812) 667-71-46

e-mail: vmeda@mil.ru

*²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова»
105275, Москва, пр. Буденного, д. 31*

*³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8*

Резюме.

Целью исследования было изучение роли алкогольдегидрогеназы в биотрансформации этанола у *Daphnia Magna Stratus*. Методом фармакологического зондирования с использованием бесконкурентного ингибитора алкогольдегидрогеназы – амида изовалериановой кислоты установлено, что биотрансформация этанола у дафний осуществляется при участии НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы. На долю последней приходится не менее 84 % всего метаболизма этилового спирта у дафний. На основании полученных результатов был сделан вывод о возможности использования *Daphnia Magna Stratus* в качестве тест объекта для скрининга веществ, обладающих свойствами ингибиторов алкогольдегидрогеназы.

Ключевые слова: дафния *Magna Stratus*, этиловый спирт, алкогольдегидрогеназа, метаболизм, ингибиторы алкогольдегидрогеназы.

**REASON FOR THE USE OF DAPHNIA MAGNA STRATUS FOR SCREENING OF
CHEMICAL COMPOUNDS WITH THE PROPERTIES OF INHIBITORS OF ALCO-
HOLDEHYDROGENASE**

¹Gorbacheva T.V., ²Bonitenko E.Y., ¹Basharin V.A., ³Bonitenko K.E.

¹Military Medical Academy named S.M. Kirov
194044 Russia, Saint-Petersburg, Lebedeva street, 6,
tel.: +7 (812) 667-71-46

²Izmerov Research Institute of Occupational Health
105257, Russia, Moscow, Budennogo Ave., 31

³Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Academician I.P. Pavlov
First St. Petersburg State Medical University” of the Ministry of Healthcare of Russian Federation
194044 Russia, Saint-Petersburg, Lev Tolstoy street, 6-8,

Summary

Studying of a role of alcohol dehydrogenase in biotransformation of ethanol at *Daphnia Magna Stratus* was the aim of research. By method of pharmacological probing with use of uncompetitive alcohol dehydrogenase inhibitor – amide of isovalerian acid has established that biotransformation of ethanol in *daphnia* is performed by the participation of NAD-dependent alcohol dehydrogenase. The share of alcohol dehydrogenase accounts for at least 84% of the total metabolism of ethyl alcohol in *daphnia*.

It was concluded that *Daphnia Magna Stratus* could be used as a test object for screening substances with the properties of alcohol dehydrogenase inhibitors.

Keyword: *Daphnia Magna Stratus*, ethyl alcohol, alcoholdehydrogenase, metabolism, inhibitors of alcoholdehydrogenase.

Введение

В последнее время, с одной стороны наблюдается быстрый рост синтеза новых химических веществ, в связи с чем остро встает вопрос об изучении их токсических свойств и скрининговой оценки специфической фармакологической активности с целью выявления перспективных соединений для дальнейшего изучения. С другой стороны, проведение медико-биологических исследований, растущие требования к качеству лекарств, ужесточение гигиенических и экологических норм для химических веществ, развитие фармакологии, токсикологии и других разделов медицины делают всё более привлекательными эксперименты с использованием не генетически модифицированных животных, а их прототипов – биологических моделей [1].

Основным объектом биомоделирования является животное–модель – лабораторное животное, используемое в эксперименте с целью построения демонстративных или любых других моделей функционирования человека или других животных для последующего описания и анализа изучаемых процессов [2].

Наиболее широко в биологии и медицине используются биологические модели первого и второго порядков. К моделям первого порядка относят лабораторных животных, млекопитающих, классического объекта биомоделирования, реакции которых на действие различных внешних факторов сходны с эффектами, вызываемыми этими факторами у человека. Критериями подобия, обуславливающими адекватность моделирования и возможность переноса полученных данных на человека, являются: сходство у человека и лабораторных животных биологических характеристик систем, реагирующих на воздействие; общность характеристик метаболических процессов; близость чувствительности, значений количественных показателей, установленных для человека и модели [1].

В настоящее время в исследованиях всё чаще применяются более простые модели второго порядка – различные гидробионты, бактерии, другие микроорганизмы и культуры клеток [3].

Критерии подобия, определяющие адекватность моделирования на моделях этого типа сходны, в принципе, с приведенными выше, однако их преимущественно рассматривают в отношении не к целостному организму, а к его отдельным тканям или органам.

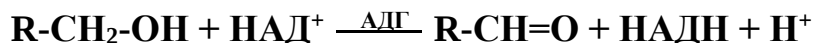
Модели первого и второго порядков имеют как определённые преимущества, так и существенные недостатки. Использование лабораторных животных, дающее информацию, наиболее приемлемую для переноса полученных результатов на человека, является дорогостоящим, а также сопряжено с рядом ограничений этического характера в соответствии с со-

временными представлениями и законодательными актами по защите животных при проведении медико-биологических исследований [4, 5, 6, 7]. Указанные недостатки и ограничения не распространяются на модели второго порядка, однако оценка их результатов вряд ли может быть использовано для непосредственного переноса на крупные биологические объекты. Тем не менее, биомодели второго порядка вследствие своей дешевизны, быстроты получения результатов, широких возможностей моделирования можно рассматривать как первую стадию медико-биологических исследований, прежде всего для проведения скрининга [1].

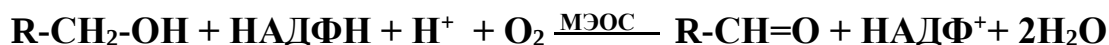
В то же время некоторые характеристики моделей второго порядка, в частности особенности их метаболизма, тип и выраженность реакций на различные внешние воздействия и т.д., исследованы недостаточно и нуждаются в дальнейшем углублённом изучении.

По современным представлениям метаболизм этанола в организме человека и млекопитающих осуществляется при участии трех ферментных систем: алкогольдегидрогеназы (АДГ), микросомальной этанолюкисляющей системы (МЭОС) и каталазы [8].

Алкогольдегидрогеназа содержится в бактериях, дрожжах, тканях растений, насекомых, рыб и млекопитающих. В группу АДГ входят два фермента, один использует в качестве кофактора НАД⁺, другой НАДФ⁺. НАД-зависимая АДГ является основным энзимом, метаболизирующим этиловый спирт у млекопитающих. Это цитоплазматический цинксодержащий фермент с оптимумом pH около 11. Окисление этанола АДГ происходит по схеме:



Второй по значимости является микросомальная этанолюкисляющая система, в функционировании которой участвуют кислород, флавопротеид, НАДФН и цитохром P₄₅₀.



Оптимальные условия деятельности микросомальной этанолюкисляющей системы отличаются от таковых для АДГ. Так, ее оптимум pH равен 6,9 – 7,5.

Кроме АДГ и МЭОС в метаболизме спиртов может участвовать и каталаза, (оптимум pH фермента составляет 5,5) [9].

В последнее годы в виду своей дешевизны и доступности дафний часто используют в качестве модельных организмов во многих экологических, токсикологических и генетических исследованиях. Кроме того, дафнии обращают на себя внимание ученых как объект биоиндикации [10]. Поскольку биоиндикация является комплексным методом определения состояния окружающей среды. *Daphnia Magna Stratus* используются как тест-объекты на проверку токсичности вод и почв по показателям выживаемости и плодовитости [11, 12].

Кроме того, отмечается появление работ, в которых гидробионты *Daphnia magna* Straus используются как тест объекты для изучения медиаторной активности фармакологических препаратов [13].

Цель исследования – изучение роли алкогольдегидрогеназы в биотрансформации этанола у *Daphnia magna* Straus.

Материалы и методы

Работа была выполнена в два этапа: на первом, была изучена острая токсичность этанола и бесконкурентного ингибитора АДГ – амида изовалериановой кислоты (АИК) [14] и их сочетания для дафний; на втором – скорость метаболизма этанола в гомогенатах дафний и влияние на этот показатель АИК и восстановленной формы никотинамида динуклеотида (НАД).

Определение токсичности этанола и АИК для дафний проводилось в соответствии с методикой определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой сточной и природной воды по смертности тест объекта *Daphnia Magna Stratus* [15]. Методика основана на определении смертности дафний при воздействии химических веществ, по сравнению с контрольной культурой. Острое токсическое действие химических веществ на дафний определялось по их гибели за 24 и 48 часов.

Исследования проводились на синхронизированной (полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в третьем поколении) одновозрастной взрослой культуре дафний (задерживающиеся на сите с размером ячеек 1000 – 2200 мкм). Для приготовления разведений использовались пробирки объемом 100 см³. Схема подготовки разведений представлена на рисунке 1.

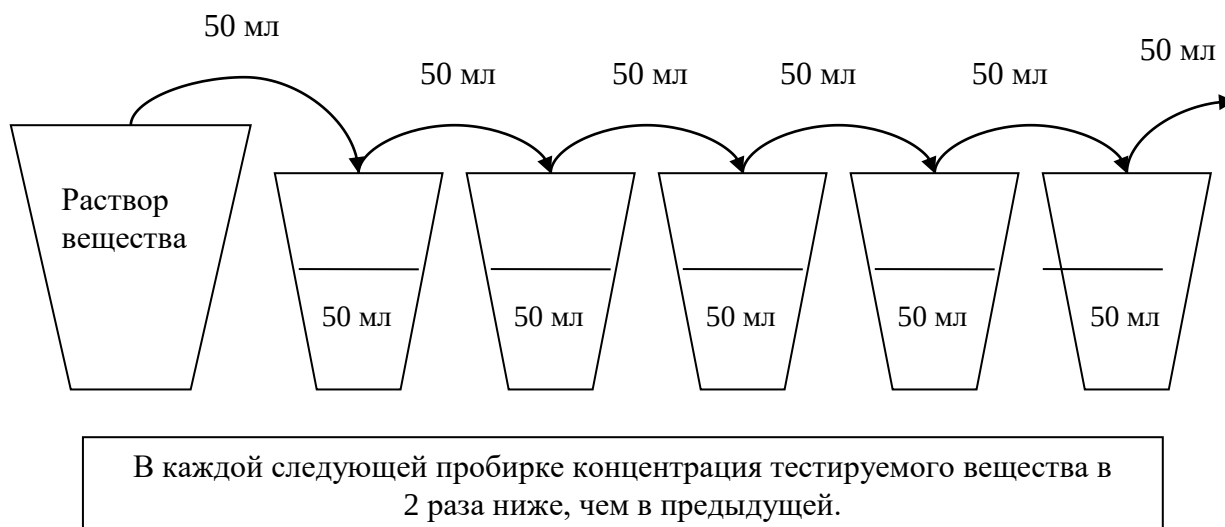


Рисунок 1 – Схема приготовления разведений для определения токсичности

Определение токсичности проводили в трех параллельных сериях при обязательном контроле для каждой опытной группы.

В пробирки объемом 100 см^3 заполненные 50 см^3 подготовленных разведений помещалось по 10 взрослых дафний. Посадку рачков начинали с контрольной серии, в опытной группе с больших разведений. В день эксперимента дафний не кормили. После приготовления пробы герметизировались и помещались в климатостат, в котом поддерживалась постоянная температура $20,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ при искусственном освещении.

Учет смертности дафний в опыте и контроле проводился через 24 и 48 часов. Неподвижные особи считались погибшими, если не начинали двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания пробирки.

Рассчитывались следующие показатели:

- ЛК₀ – концентрация, не вызывающая гибель дафний;
- ЛК₅₀ – концентрация, вызывающая 50% гибель дафний;
- ЛК₁₀₀ – концентрация, вызывающая 100% гибель дафний.

Расчет ЛК₀, ЛК₅₀, ЛК₁₀₀ – осуществлялся с помощью программы для персонального компьютера, основанной на методе пробит-анализа.

Определение скорости метаболизма этанола в гомогенатах дафний осуществлялось по следующей методике. Дафнии высушивали на фильтровальной бумаге. После чего 1,5 г дафний

гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком с добавлением 3,4 мл 0,15 М раствора трис-буфера (pH – 8,8). В гомогенат добавляли 3,0 мл раствора этанола (полученного внесением 0,2 мл 96% спирта в 29,8 мл трис-буфера) при этом общий объем пробы составил 7,9 мл. Отбирали 1,1 мл исходного раствора для определения концентрации этанола. Оставшуюся пробу делили на две равные части по 3,4 мл в одну из которых вносили 10 мг НАД. После чего каждую из двух полученных проб разливали по двум пенициллиновым флаконам по 1,7 мл в каждый в два из которых один с НАД и один без него добавляли 2 мг АИК (рисунок 2). Пробы продували кислородом, герметизировали и инкубировали при $T = 37,0^{\circ}\text{C}$ в течение 6 часов; постоянное перемешивание осуществлялось с помощью электромагнитной мешалки.

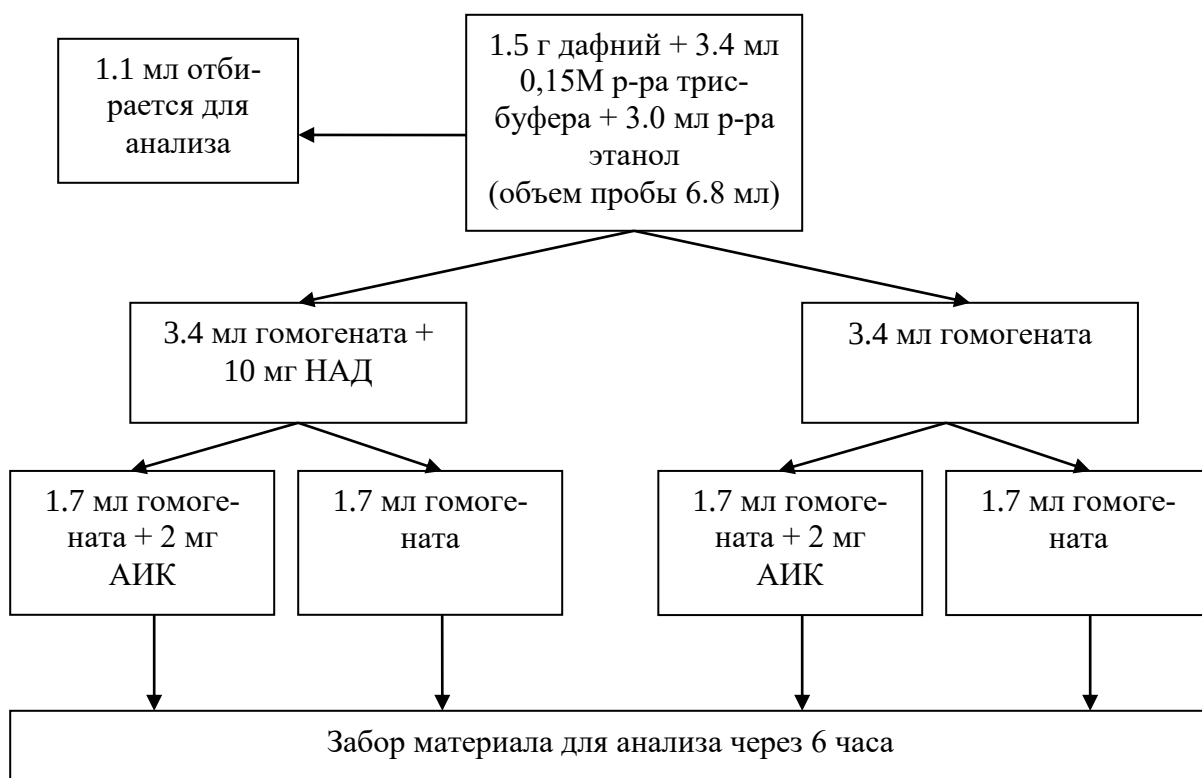


Рисунок 2 – Схема подготовки проб для анализа

Количественное определение этанола в пробах проводилось через 6 часов согласно «Методике выполнения измерений массовой концентрации этанола в крови, моче и слюне» [16].

Хроматограф «МХК», детектор по теплопроводности, колонка стальная 200*0,3 см, 20% ПЭГ–1500 на ИНЗ–600, модифицированном серебром. Температура колонки 60,0⁰С, расход газа-носителя гелия – 55 мл/мин.

Во флакон из-под пенициллина наливали 0,5 мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты, добавляли 0,5 мл пробы. После фиксации пробки в горловине флакона, содержимое его тщательно перемешивали, затем во флакон шприцем вводили 0,25 мл 30% раствора нитрита натрия и смесь тщательно взбалтывали. Шприцем отбирали из флакона 0,5 мл газообразной пробы и вводили в хроматограф. Расчет концентрации этилового спирта в пробе проводили по программе «Z-lab». Градуировочный график строился по вышеописанной методике. При его построении использовали Государственные стандартные образцы состава водных растворов этанола (комплект ВРЭ-1) ГСО 7969-2001: 0,1507 мг/см³, 0,503 мг/см³, 1,002 мг/см³, 2,005 мг/см³, 3,00 мг/см³, 4,00 мг/см³, 5,01 мг/см³, 6,04 мг/см³.

Расчет скорости метаболизма осуществлялся по убыли концентраций этанола в пересчете на 1 г ткани дафний по формуле:

$$V (\text{мг} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}) = K \cdot (C_1 - C_2)/6 \quad (1)$$

где: C_1 – концентрация этанола после внесения исследуемого вещества, C_2 – концентрация этанола через 6 часа, K – коэффициент пересчета; 6 – время инкубации в часах.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывались на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows (версия 6.0). Результаты оценивали по t – критерию Стьюдента. Различия считались достоверными, если p составлял 95 и более процентов ($p < 0,05 - 0,01$).

Результаты и их обсуждение

Острая токсичность веществ для дафний изучалась в два этапа. На первом этапе были определены показатели токсичности амида изовалериановой кислоты. Было установлено,

что АИК относится к малотоксичным для дафний соединениям, ЛК₅₀ через 24 и 48 часов составила $6,25 \pm 0,77$ и $5,93 \pm 0,77$ г/л соответственно (таблица 1).

На втором этапе были изучены показатели токсичности этанола и сочетания этанола с АИК. В этой серии экспериментов АИК использовался в дозе ЛК₀ = 3,38 г/л (не вызывающей гибели дафний). Установлено, что ЛК₅₀ для этанола составил через 24 и 48 часов $27,07 \pm 3,88$ и $25,78 \pm 4,00$ г/л соответственно. Внесение в пробу совместно с этанолом (в различных концентрациях) АИК в фиксированной дозе равной ЛК₀ приводило к значительному увеличению токсичности этанола для дафний в 1,9 и 2,0 раза соответственно через 24 и 48 часов.

Таблица 1

Влияние амида изовалериановой кислоты на токсичность этанола для дафний

Препараты	Время, ч					
	24			48		
	Показатели, г/л					
	ЛК ₀	ЛК ₅₀	ЛК ₁₀₀	ЛК ₀	ЛК ₅₀	ЛК ₁₀₀
Контроль	0	0	0	0	0	0
АИК	3,38	6,25 ± 0,77 ^{*,**}	9,45	3,00	5,93 ± 0,77 ^{*,**}	9,07
Этанол	18,40	27,07 ± 3,88 [*]	36,27	17,04	25,78 ± 4,00 [*]	35,20
Этанол + АИК (ЛК ₀ = 3,38 г/л)	6,24	14,21 ± 2,24 ^{*,**}	23,40	3,84	12,94 ± 2,10 ^{*,**}	22,90
* – различие с контролем достоверно (p < 0,05 – 0,01); ** – различие с группой получавшей этанол достоверно (p < 0,05)						

Полученные данные свидетельствуют о том, что АИК оказывает существенное влияние на токсичность этанола для дафний, что, скорее всего, связано со способностью этого вещества ингибировать метаболизм этанола за счет блокады алкогольдегидрогеназы. Для подтверждения этого предположения нами было изучено влияние АИК на скорость биотрансформации этанола гомогенатами дафний.

При изучении скорости биотрансформации этанола гомогенатами дафний нами были проведены две идентичные серии опытов, результаты которых были объединены и после чего обработаны математически.

Установлено, что гомогенаты дафний метаболизируют этанол со скоростью $0,876 \pm 0,085 \text{ мг} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ (таблица 2). Внесение в гомогенат АИК приводило к существенному снижению скорости биотрансформации этанола до $0,140 \pm 0,041 \text{ мг} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$. В свою очередь внесение в гомогенат НАД увеличивало скорость метаболизма этанола по сравнению с группой без НАД на 24 % ($1,094 \pm 0,097 \text{ мг} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$) и не оказывало влияние на скорость биотрансформации этилового спирта в группе с АИК.

Таблица 2

Скорость метаболизма этанола гомогенатами дафний

Гомогенаты	Скорость метаболизма этанола ($\text{мг} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$)
Контрольный	$0,876 \pm 0,085$
С добавлением:	
– АИК	$0,140 \pm 0,041^*$
– НАД	$1,094 \pm 0,097^*$
– НАД и АИК	$0,154 \pm 0,052^*$
* – различие с контролем достоверно ($p < 0,05 - 0,01$);	

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в биотрансформации этанола у дафний принимают участие, по крайней мере, одна ферментативная система – алкогольдегидрогеназа, на долю которой приходится не менее 84 % всего метаболизма этилового спирта. Для уточнения указанного положения необходимо проведение исследований как с использованием более высоких доз АИК, так и других ингибиторов алкогольдегидрогеназы. Следует также отметить, что внесение в гомогенат дафний НАД приводит с одной стороны к увеличению скорости биотрансформации этанола, а с другой не влияет на нее при совместном использовании с АИК, что говорит о том, что НАД является коферментом алкогольдегидрогеназной реакции. Следовательно, метаболизм алкоголя у дафний осуществляется НАД-зависимой алкогольдегидрогеназой.

Выводы

1. Амид изовалериановой кислоты в дозе 3,38 г/л (ЛК₀) в 1,9 – 2,0 раза увеличивает токсичность этанола для дафний за счет ингибирования его биотрансформации.

2. Биотрансформация этанола у дафний осуществляется при участии НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы, на долю которой приходится не менее 84 % метаболизма этилового спирта.
3. Дафнии могут быть использованы в качестве тест объекта для поиска химических соединений – ингибиторов алкогольдегидрогеназы.

Список использованной литературы

1. Каркищенко Н.Н. Альтернативная биомедицина. Том I. Основы биомедицины и фармакомоделирования / Н.Н. Каркищенко – М.: «Изд-во ВПК», 2007. – 320 с.
2. Славин М.Б. Практика системного моделирования в медицине. Серия: Учебная литература для студентов мед. вузов. / М.Б. Славин. – Казань. «Медицина», 2002. – 166 с.
3. Трахтенберг И.М., Кокшарева Н.В., Лобода Ю.И. Приоритетные аспекты экспериментальных исследований безопасности лекарственных средств // www.medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2003/03_1_1.htm.
4. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных // Качественная клиническая практика, 2002. – №1 (<http://medi.ru/doc/9920109.htm>).
5. ATLA Alternotives to laboratory Animals // Third World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. 29 August – 2 September, 1999. – Bologna, Italy. – Urecht, Programme and Abstracts. – 442 p.
6. Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием «экспериментальных животных»».
7. Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации (утверждены МЗ РФ 29.12.98). ОСТ 42-511-99.
8. Кожемякин Л.А. Ингибиторы алкогольдегидрогеназы и их влияние на основные ферментные системы метаболизма алифатических спиртов / Л.А. Кожемякин и [и др.]. // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т.36, № 3. – С. 67–69.
9. Куценко С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко. – СПб.: «Изд-во Фолиант», 2004. – 720 с.
10. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: Учеб. пос. / под ред. О.П. Мелеховой, Е.И. Егоровой. – М.: «Академия», 2007. – 288 с.

11. Маячкина Н.В., Чугунова М.В. Особенности биотестирования почв с целью их экотоксикологической оценки // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2009. – № 1. – С. 84–93
12. Куделин В.М., Тимошенко Г.А., Толстихина В.С. Токсикологическая оценка сточных и дренажных вод Байкальского целлюлозно-бумажного комбината // Экология. – 2004. – № 1. – С. 74–76.
13. Тонкопий В.Д., Подосиновичева Н.П., Загребин А.О., Шерстнева Л.А., Петров В.В., Муковский Л.А., Долго-Сабуров В.Б. *Daphnia magna* straus как объект для фармакологического анализа ГАМК-ергических препаратов в условиях целостного организма // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – №5. – С. 126–129.
14. Иванова Л.И. Метаболическая эффективность ингибиторов алкогольдегидрогеназы в условиях интоксикации метанолом и этиленгликолем: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Л.И. Иванова; ВМедА им. С.М. Кирова. – Л., 1989. – 23 с.
15. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. ФР.1.39.2001.00282. М.: Акварос, 2001. – 51 с.
16. Аттестованная методика выполнения измерений массовой концентрации этанола в крови, моче и слюне, свидетельство № 56–10. – М.: РЦСМЭ, 2010. – 25 с.