

УДК 57.085.23+615.076.7

МЕТОД ПЕРВИЧНОГО СКРИНИНГА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ЭУКАРИОТ *PARAMECIUM CAUDATUM*

© 2022 г. Г. А. Груздев^{1,*}, О. В. Карпухина^{1,2}, А. Н. Иноземцев¹, А. А. Каменский¹

Представлено академиком РАН К.В. Анохиным

Поступило 19.10.2021 г.

После доработки 25.10.2021 г.

Принято к публикации 25.10.2021 г.

В работе исследовалось воздействие адреналина в различных концентрациях и дофамина в концентрации 10^{-10} моль/мл на поведение *Paramecium caudatum*. Показано, что адреналин снижает двигательную активность и изменяет стратегию движения этих простейших организмов, наблюдается дозозависимый поведенческий ответ от концентрации препарата. Эффект можно объяснить наличием рецепторов к адреналину, расположенных на поверхности мембраны клеток. Для изучения прямого воздействия адреналина на альфа и бета адренорецепторы в данной работе рассмотрено влияние неселективных аденоблокаторов ницерголина и тимолола. В то же время дофамин в концентрации 10^{-10} моль/мл рецепторов, к которому у этого организма не обнаружены, не оказывают достоверного воздействия на характер и величину двигательной активности в течение всего времени регистрации. Предложенный метод позволяет быстро и объективно оценивать характер воздействия различных фармакологических агентов, воздействующих на систему катехоламинов.

Ключевые слова: *paramecium caudatum*, сравнительная физиология, клеточная модель, нейромедиаторы

DOI: 10.31857/S2686738922010097

Требования, утвержденные биоэтическим сообществом для доклинических исследований, ужесточаются. Поэтому поиск объекта для исследования лекарственных препаратов, подходящего для моделирования многих болезней на протяжении десятилетий, был “святым Граалем” биомедицинских исследований [1]. Такой полезной моделью может стать *Paramecium caudatum*. Данный объект охватывает одновременно два уровня организации живой материи, являясь одновременно и клеткой, и организмом, что позволяет изучать молекулярные механизмы воздействия фармакологических препаратов комплексно и наблюдать поведенческий ответ животного [2]. Данная модель хорошо показала себя в токсикологических испытаниях [3, 4], однако потенциал объекта в современных доклинических исследованиях используется в неполном объеме. Нами

предложен практичный метод первичного скрининга фармакологических препаратов с использованием одноклеточных организмов *Paramecium caudatum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена на стерильной культуре живых клеток *Paramecium caudatum*, которых содержали в приближенных к естественной среде условиях обитания при температуре 24 градуса при pH = 6.8–7.2 с соблюдением 12-часового светового дня и поддержанием плотности в размере 600 клеток/мл. Кормление инфузорий производилось ежедневно в объеме 200 мкл на колонию в 100 мл. В качестве корма использовался раствор дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для поддержания стерильности среды проводилась ежемесячная фильтрация колонии через мелкодисперсную губку. В день эксперимента кормление инфузорий приостанавливалось.

Для верификации предложенного нами метода исследования особенностей влияния фармакологических веществ на *Paramecium caudatum* были выбраны дофамин и адреналин, чьи концентрации после введения в исследуемый объем культу-

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

*e-mail: Gleb-neuro.phys@mail.ru

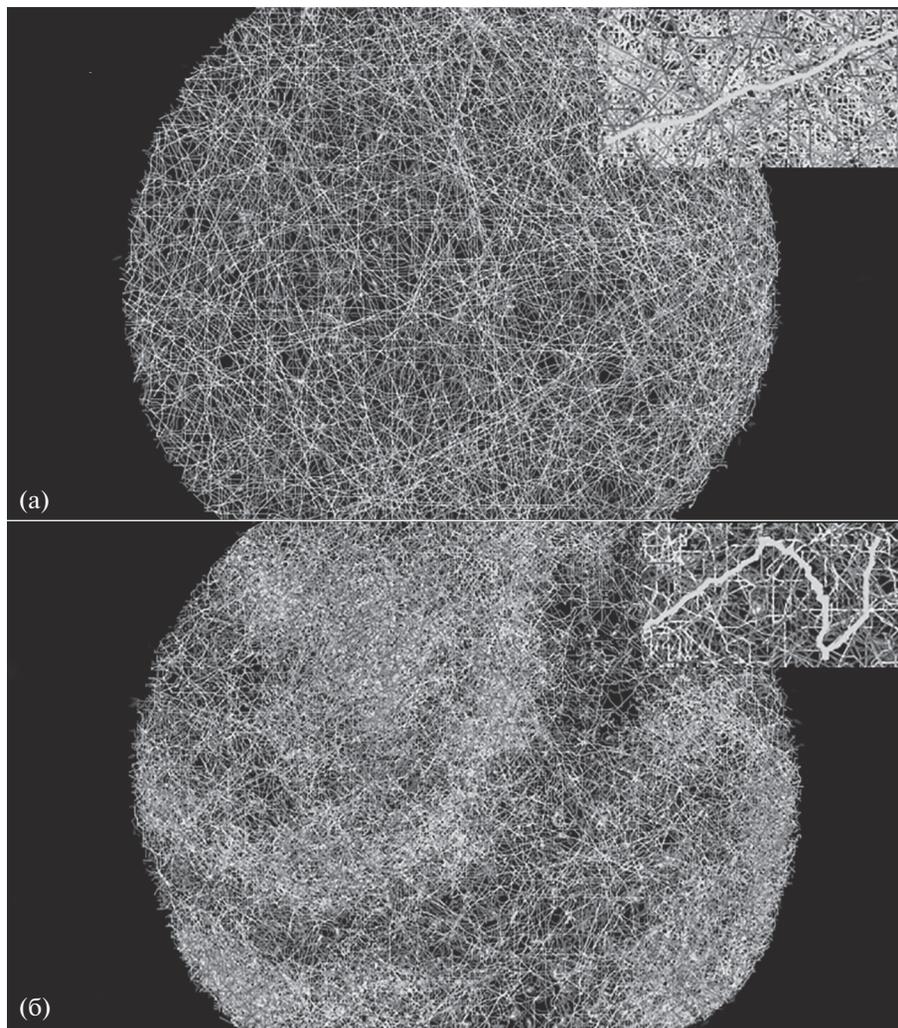


Рис. 1. Возможные стратегии поведения парameций в ответ на введение адреналина в концентрации (10^{-10} моль/мл). а – поведение клеток контрольной группы (после внесения воды), б – проявление хемотаксиса после введения адреналина.

ры (1 мл) составляли 10^{-10} моль/мл для дофамина и 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} моль/мл для адреналина. Так же для определения, через какие адренорецепторы альфа или бета действует адреналин на парameций, были применены неселективные адреноблокаторы: ницерголин и тимолол в концентрации 10^{-10} моль/мл.

Регистрация движения клеток велась с использованием тринокулярного стереоскопического микроскопа Olympus SZ6. Для анализа двигательной активности, по полученным видеозаписям, использовалась программа ImageJ (Fiji) плагин “Track Mate” [5].

Статистический анализ проводился в программе “Statistica 10” с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни после проверки на нормальность критерием Шапиро–Уилка для

больших выборок. Достоверные значения оценивались при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе животные распределялись по всему исследуемому объему, двигаясь с одинаковой скоростью и выдерживая преимущественно линейную траекторию плавания рис. 1а. После добавления адреналина в среду наблюдается снижение двигательной активности, которое становится прерывистым и нелинейным рис. 1б.

Показатели уменьшения скорости под воздействием адреналина относительно контроля приведены на рис. 2а.

При регистрации характера движения парameций в контрольных экспериментах было показано, что подавляющее число животных (95%) дви-

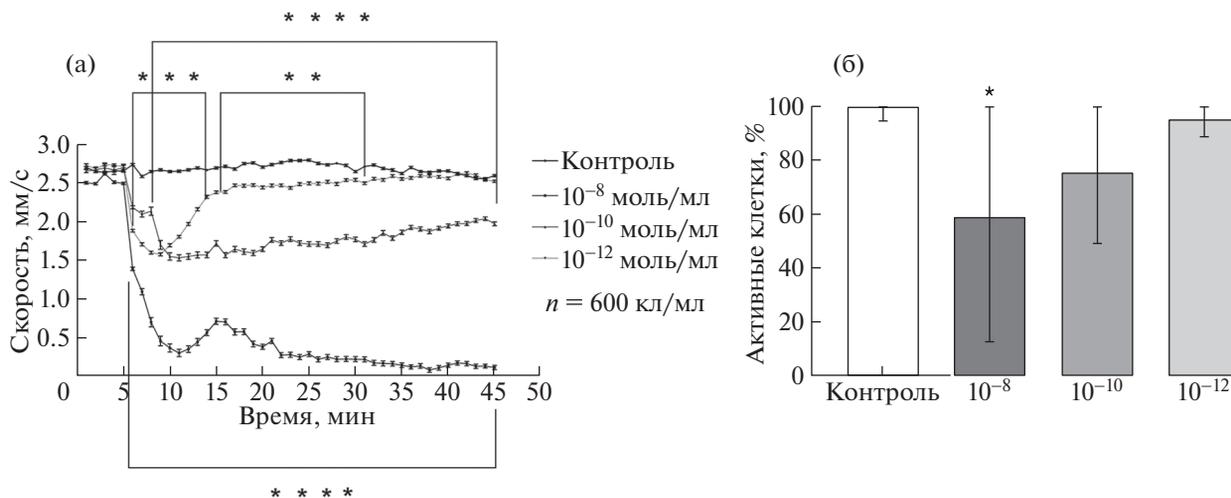


Рис. 2. Изменение скорости движения и активности *Paramecium caudatum* в ответ на предъявление адреналина в концентрации (10^{-10} – 10^{-12} моль/мл). а – График изменения скорости (после введения адреналина на 5-й минуте регистрации). б – График изменения количества активных клеток после воздействия адреналина (активными клетками считаются все подвижные клетки в эксперименте).

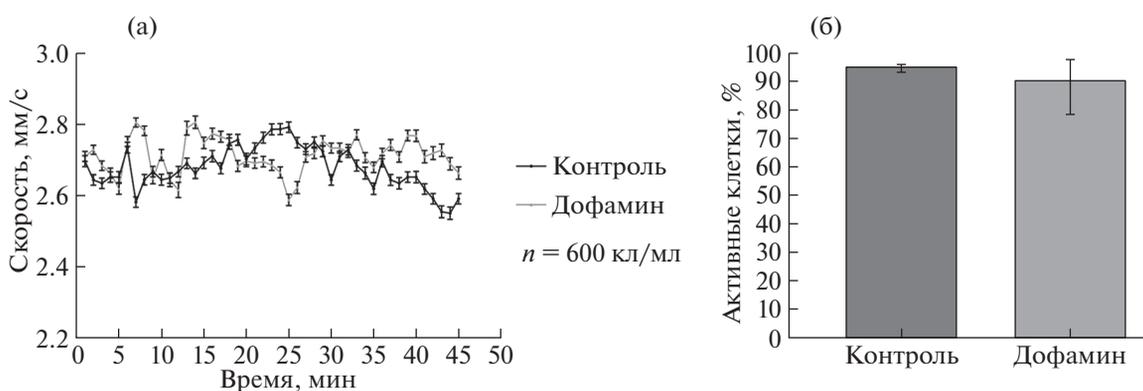


Рис. 3. Изменение скорости движения и активности *Paramecium caudatum* в ответ на предъявление дофамина в концентрации (10^{-10} моль). а – График изменения скорости (после введения дофамина на 5-й минуте регистрации). б – График изменения количества активных клеток после воздействия дофамина (активными клетками считаются все подвижные клетки в эксперименте).

гается прямолинейно, проходя за 40 мин опыта около 150 см (рис. 2а). При этом скорость движения парамеций в течение всего времени регистрации оставалось постоянной. Введение в среду адреналина привело к снижению скорости движения и уменьшению пробега, пройденного за время эксперимента.

Такой поведенческий эффект обусловлен наличием на мембране *Paramecium caudatum* рецепторов к адреналину [6]. Вследствие активации этих рецепторов происходит деполяризация мембраны, что и приводит к снижению двигательной активности животного (рис. 2), т.к. скорость движения клеток по литературным данным напрямую зависит от потенциала на мембране [7].

Снижение активности клеток из опытной группы может быть связано с активацией внутриклеточных процессов, таких как расщепление гликогена, эндоцитоз, конъюгация, пролиферация (рис. 2б).

Однако совсем иная картина отмечается после внесения в среду дофамина (рис. 3).

На графиках показано, что внесение в среду дофамина, в концентрации 10^{-10} моль/мл, не влияет на двигательную активность исследуемой модели в отличие от адреналина, предъявляемого в той же концентрации. Такой результат обусловлен отсутствием дофаминовых рецепторов на мембране *Paramecium caudatum*.

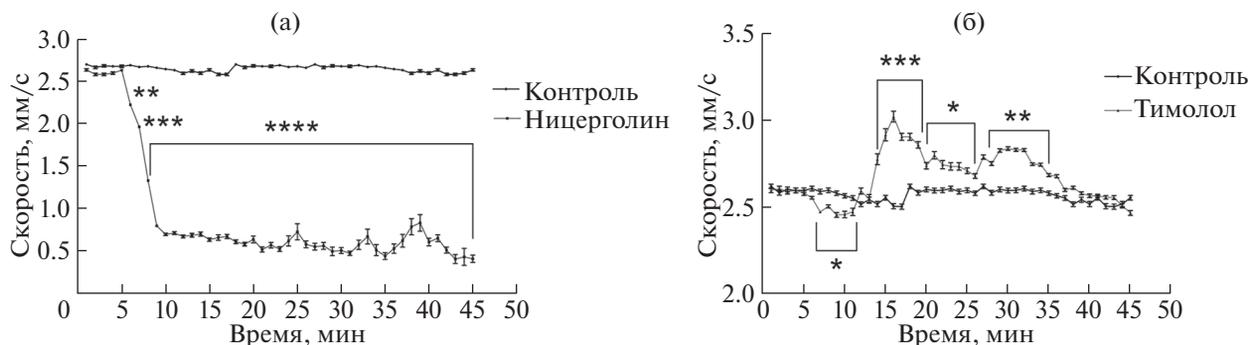


Рис. 4. Изменение скорости движения *Paramecium caudatum* в ответ на предъявление ницерголина и тимолола в концентрации 10^{-10} моль/мл. а – График изменения скорости после введения ницерголина (альфа блокатора), б – График изменения скорости после введения тимолола (бета блокатора).

Теперь рассмотрим влияние эндогенного адреналина, выделяемого клетками, на конкретные адренорецепторы, добавив в среду неселективные адреноблокаторы для каждой группы рецепторов (рис. 4).

В случае с предъявлением ницерголина эндогенный адреналин воздействует на бета-1 и бета-2 адренорецепторы, т.к. данный препарат является неселективным альфа блокатором. Это приводит к сильному снижению скорости движения парамеций (рис. 4а), такой ответ может быть связан с тем, что активация β_1 и β_2 рецепторов направлена на деполяризацию клеточной мембраны. Однако противоположную картину в изменении скорости можно увидеть при добавлении в среду тимолола, где эндогенный адреналин будет воздействовать уже на α_1 и α_2 адренорецепторы, т.к. бета рецепторы будут уже заблокированы (рис. 4б). В этом случае наблюдается характерный двухфазный ответ. Так, в течение 5 мин после введения препарата видим воздействие адреналина на α_1 рецепторы, что приводит к снижению скорости, т.к. данный тип рецепторов так же является деполяризующим, как и β_1 , β_2 . Однако через 14 мин после предъявления тимолола скорость клеток возрастает. Такой ответ обусловлен активацией α_2 рецепторов, которые направлены на гиперполяризацию мембраны и ингибируют секрецию адреналина в среду. Возможно, видимые различия в силе воздействия адреналина на α_1 и α_2 рецепторы объясняются разным количеством этих рецепторов на мембране или различной чувствительностью.

Из полученных нами данных следует, что физиологические реакции парамеций перспективны с позиций познания процессов функционирования медиаторных механизмов [8].

Таким образом, в представленном исследовании показано, что при воздействии адреналина наблюдается снижение двигательной активности клеток, в то время как при отсутствии рецепторов

к дофамину параметры двигательной активности не имеют отличий от контрольных значений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе показана возможность использовать *Paramecium caudatum* в качестве доклинической модели при первичном скрининге фармацевтических препаратов, регистрируя изменение двигательной активности этого одноклеточного организма в ответ на активацию рецепторов разных типов, расположенных на клеточной мембране. Метод позволяет выявлять сродство к известным клеточным рецепторам парамеций, что позволяет дать оценку спектру фармакологического влияния исследуемых препаратов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова (тема № 121032500080-8), а также при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект” (Руководитель программы: академик Константин Владимирович Анохин).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hobson-West P., Davies A.* Societal Sentience: Constructions of the Public in Animal Research Policy and Practice // *Sci Technol Human*. 2018. V. 43. P. 671–93.
2. *Takeda N., Sugiyama K.* Metabolism of biogenic monoamines in the ciliates protozoan, tetrahymena pyriformis // *Biochem. Physid*. 1993. V. 106. № 1. P. 63–70.
3. *Inozemtsev A.N., Karpukhina O.V., Melikhov I.V., et al.* Effect of low temperature plasma of atmospheric pressure on single-cell model organisms of ciliate *Paramecium caudatum* // *J Phys Conf Ser*. 2019. V. 1238. № 1. P. 012050.
4. *Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Karpukhina O.V., et al.* Biosynthesis of isocitric acid in repeated-batch culture and testing of its stress-protective activity // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019. V. 103. P. 3539–3558.
5. *Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
6. *Wiejak J., Surmacz L., Wyroba E.* Dynamain-association with agonist-mediated sequestration of beta-adrenergic receptor in single-cell eukaryote *Paramecium*. // *J. Exp. Biol*. 2004. V. 207. № 10. P. 1625–1632.
7. *Schlaepfer C.H., Wessel R.* Excitable Membranes and Action Potentials in Paramecia: An Analysis of the Electrophysiology of Ciliates. // *J. Undergrad Neurosci Educ*. 2015. V. 14. № 1. P. A82–A86.
8. *Gundersen R.E., Thompson G.A.* Further Studies of Dopamine Metabolism and Function in *Tetrahymena* // *J. Protozool*. 1985. V. 32. № 1. P. 25–31.

METHOD FOR PRIMARY SCREENING OF PHARMACEUTICALS ON THE *PARAMECIUM CAUDATUM* EUKARYOTIC CELL MODEL

G. A. Gruzdev^{a,#}, O. V. Karpukhina^{a,b}, A. N. Inozemtsev^a, and A. A. Kamensky^a

^a *Moscow State University M.V. Lomonosov, faculty of Biology, Moscow, Russian Federation*

^b *Federal Research Center of Chemical Physics N.N. Semenov RAS, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: Gleb-neuro.phys@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS K.V. Anokhin

The effect of epinephrine in various concentrations and dopamine at a concentration of 10^{-10} mol/ml on the behavior of *Paramecium caudatum* was studied. It is shown that adrenaline reduces motor activity and changes the movement strategy of these protozoa, there is a dose-dependent behavioral response from the concentration of the drug. The effect can be explained by the presence of adrenaline receptors located on the surface of the cell membrane. To study the direct effect of adrenaline on alpha and beta adrenoreceptors, the effect of non-selective adrenoblockers nicergoline and timolol is considered in this paper. At the same time, dopamine at a concentration of 10^{-10} mol/ml does not have a significant effect on the nature and magnitude of motor activity during the entire registration time, since it does not have receptors for this mediator. The proposed method allows us to quickly and objectively assess the nature of the effects of various pharmacological agents acting on the catecholamine system.

Keywords: Paramecium caudatum, comparative physiology, cellular model, neurotransmitters