

УДК 57.085.23+615.076.7

ВОЗДЕЙСТВИЕ АГОНИСТА ХОЛЕЦИСТОКИНИНА-4 D-ГБ-115 НА ХАРАКТЕР ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *PARAMECIUM CAUDATUM*

© 2023 г. Г. А. Груздев^{1,*}, Л. В. Соболева¹, А. А. Каменский¹

Представлено академиком РАН К.В. Анохиным

Поступило 15.12.2022 г.

После доработки 11.01.2023 г.

Принято к публикации 12.01.2023 г.

В работе исследовалось воздействие ГАМК в различных концентрациях и D-ГБ-115 в концентрации 10^{-7} М на поведение *Paramecium caudatum*. Показано, что ГАМК повышает двигательную активность и изменяет стратегию движения этих простейших, причем зависимость “доза–эффект” носит куполообразный характер, что можно объяснить присутствием в наружной мембране парамеций рецепторов двух видов к ГАМК: ГАМК-А и ГАМК-Б. Диапазон действующих концентраций ГАМК находится в пределах от 10^{-3} до 10^{-13} М. Исследовано воздействие на поведение инфузорий фармакологических агентов, взаимодействующих с ГАМК-системой: нембутала и холецистокининовой системой: D-ГБ-115.

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

DOI: 10.31857/S2686738923600024, EDN: QHLRZY

Использование высших позвоночных в экспериментальных исследованиях остается одной из самых острых и обсуждаемых тем в научном сообществе, особенно в вопросах доклинических испытаний новых фармакологических препаратов. В условиях быстро растущего вектора биоэтической грамотности ученым сложнее использовать в своих работах классические животные модели. При этом работы на высших животных сопряжены с большими материальными и юридическими издержками [1]. Ранее, исследуя данный вопрос, нами был предложен и описан метод первичного скрининга фармацевтических препаратов, основанный на регистрации двигательной активности и поведения эукариотических клеток *Paramecium caudatum*. Данная модель является универсальной, т.к. может быть использована не только для изучения токсичных воздействий на клетку [2], но также хорошо показала себя в качестве рабочего объекта для изучения фармакологических препаратов разной направленности [3].

В этой статье мы применили этот метод на конкретном препарате. В качестве такого препарата выступал Амид N-(6-фенилгексаноил)-глицил-D-триптофан (D-ГБ-115) (НИИ фармаколо-

гии имени В.В. Закусова, Москва, Россия), который является агонистом холецистокинина-4 и проявляет анксиогенное воздействие. D-ГБ-115 может приводить к паническим атакам у высших позвоночных, которые в свою очередь обусловлены неконтролируемым страхом у животных [4]. Нашей задачей было определить, обладает ли D-ГБ-115 активностью в отношении ГАМК рецепторов, использовать клеточную модель *Paramecium caudatum*, и изучить физиологическое действие препарата на ГАМК-А рецепторы, а также рассмотреть возможную взаимосвязь ГАМКергической и холецистокининовой системами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена на стерильной культуре живых клеток *Paramecium caudatum*. Животных содержали в приближенных к естественной среде 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 раствором дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на колонию в 100 мл. Для поддержания стерильности среды проводилась ежемесячная фильтрация колонии через мелкодисперсную губку. В день эксперимента кормление инфузорий приостанавливалось.

Наше исследование включает в себя две серии экспериментов. В первой серии было изучено

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

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

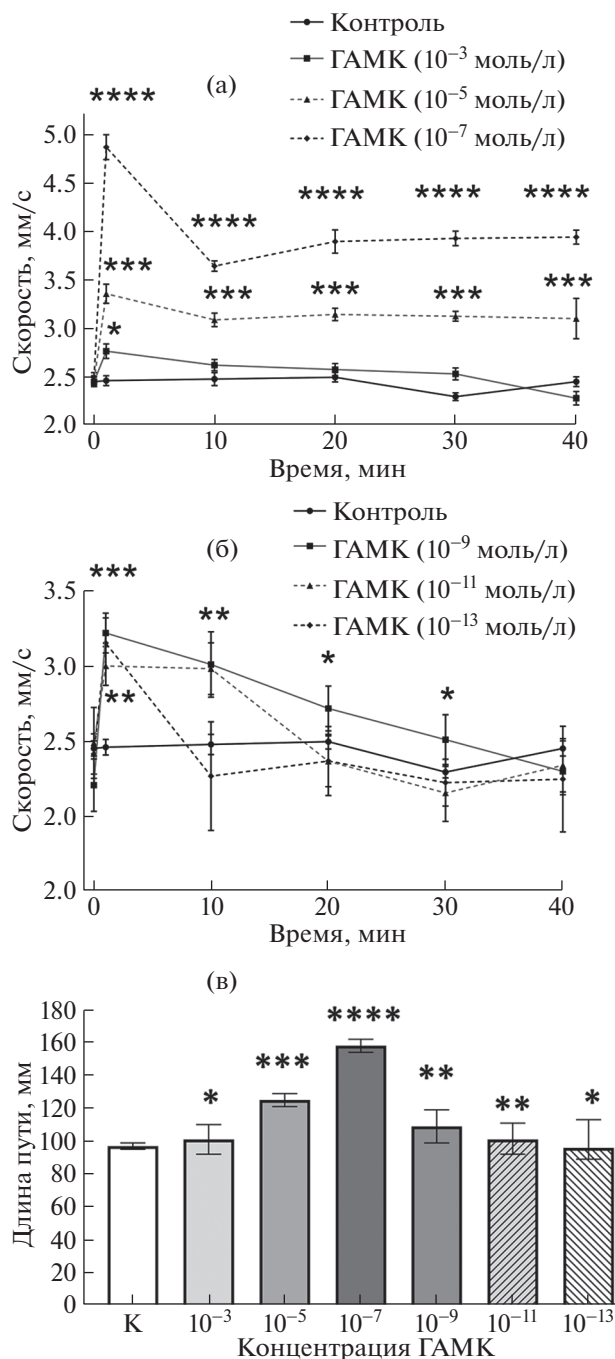


Рис. 1. Изменение скорости движения и активности *Paramecium caudatum* в ответ на предъявление ГАМК в концентрации (10^{-3} – 10^{-13} М в среде). а – График изменения скорости клеток после введения ГАМК в концентрации (10^{-3} – 10^{-7} М в среде). б – График изменения скорости клеток после введения ГАМК в концентрации (10^{-9} – 10^{-13} М в среде). в – График условного пройденного пути клетками за 1 мин с учетом изменения скорости клеток в течение 40 мин регистрации движения при разных концентрациях ГАМК в среде (10^{-3} – 10^{-13} М).

воздействие ГАМК в разных концентрациях от 10^{-3} – 10^{-13} М для определения наиболее эффективной концентрации из физиологического диапазона на основании наиболее выраженного влияния на изменение двигательной активности инфузорий.

Во второй серии эксперимента изучали свойства исследуемого **D-ГБ-115** (НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, Москва, Россия) в концентрации 10^{-7} М с помощью физиолого-фармакологического анализа с применением известного и хорошо изученного селективного агониста ГАМК-А рецепторов нембутала (минмедпра, Таллинский ХФЗ) в концентрации 10^{-7} М.

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 ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов было показано, что внесение в среду ГАМК в диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^{-13} М повышает скорость и двигательную активность *Paramecium caudatum* (рис. 1).

При регистрации характера движения парамеций наблюдается рост скорости клеток. Высокие концентрации ГАМК 10^{-3} М в среде не являются эффективными для данного объекта. Так, наибольшая скорость движения и пройденное расстояние наблюдались при использовании концентрации ГАМК 10^{-7} М (рис. 1 а), т.е. скорость клеток возросла в 2 раза с 2.5 до 5 мм/с в первую минуту и держалась до конца регистрации на уровне 4 мм/с (рис. 1 а). В то время как последующее разбавление вносимой концентрации ГАМК от 10^{-9} до 10^{-13} М приводило к меньшему повышению скорости клеток, чем при концентрации 10^{-7} М (рис. 1 б).

Проанализировав площадь под графиком (рассчитанный по формуле $S = dx * 0.5 * (y_1 + y_2)$, где y_n – значение скорости в разное время исследования, а dx – время между двумя точками измерения), мы определили условный путь, пройденный клетками за 1 мин с учетом изменения скорости движения клеток за все время регистрации, при этом статистическая значимость определяется из графиков, по которым считалась пло-

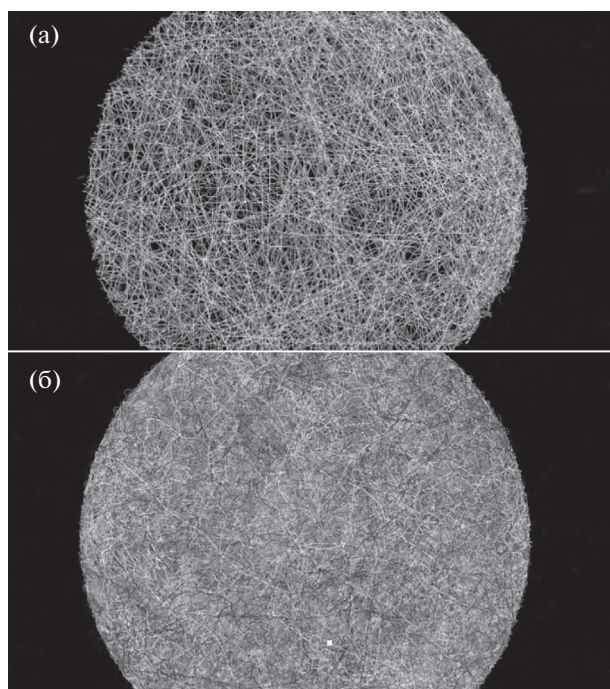


Рис. 2. Трек движения *Paramecium caudatum* за первую минуту регистрации после предъявления ГАМК в концентрации (10^{-7} М в среде). а – траектория плавания клеток контрольной группы (после внесения воды 0,1 мл). б – траектория плавания клеток после введения в среду ГАМК в концентрации (10^{-7} М).

щадь (рис. 1 в). Эти результаты показывают, что наличие ГАМК в среде при концентрациях 10^{-3} и 10^{-13} М не влияет на изменения скорости движения *Paramecium caudatum*. Таким образом, зависимость скорости клеток от концентрации ГАМК в среде имеет куполообразный характер, что характерно для многих сигнальных молекул [6]. Такая зависимость показывает, что границы физиологического диапазона доз у парамеций для ГАМК,

который находится в пределах 10^{-3} до 10^{-13} М. Использование наиболее высоких или наиболее низких концентраций не целесообразно для исследований ГАМКергических фармакологических препаратов в опытах на инфузориях. Также концентрация 10^{-7} моль/мл выбрана в качестве наиболее эффективной и будет использоваться во второй серии экспериментов с применением D-ГБ-115.

Повышение скорости движения клеток связано с действием ГАМК на ГАМК-А и ГАМК-Б рецепторы, расположенные на мембране *Paramecium caudatum* с последующей активацией этих рецепторов, приводящей к гиперполяризации мембраны (снижению потенциала) в область отрицательных значений. Это ускоряет биение ресничек в одном направлении, из-за чего клетки двигаются быстрее, но испытывают сложности на поворотах [7].

При отслеживании траектории движения *Paramecium caudatum* было продемонстрировано изменение характера трека (рис. 2). Так, при добавление в среду ГАМК наблюдается более интенсивное насыщение трека относительно контрольной группы за равный промежуток времени регистрации (1 мин) (рис. 2 б). Это указывает на рост скорости клеток, следовательно, расстояние, которое они успевают пройти, будет больше, чем пройденное расстояние клетками контрольной группы [8].

После определения физиологического диапазона действия ГАМК на парамеций, а так же выбора самой эффективной концентрации (10^{-7} М), переходим ко второй серии экспериментов для изучения свойств D-ГБ-115 (рис. 3).

При воздействии нембутала в концентрации 10^{-7} М наблюдается ожидаемое повышение скорости плавания клеток, аналогичное эффекту влияния ГАМК на инфузорий. Такой эффект

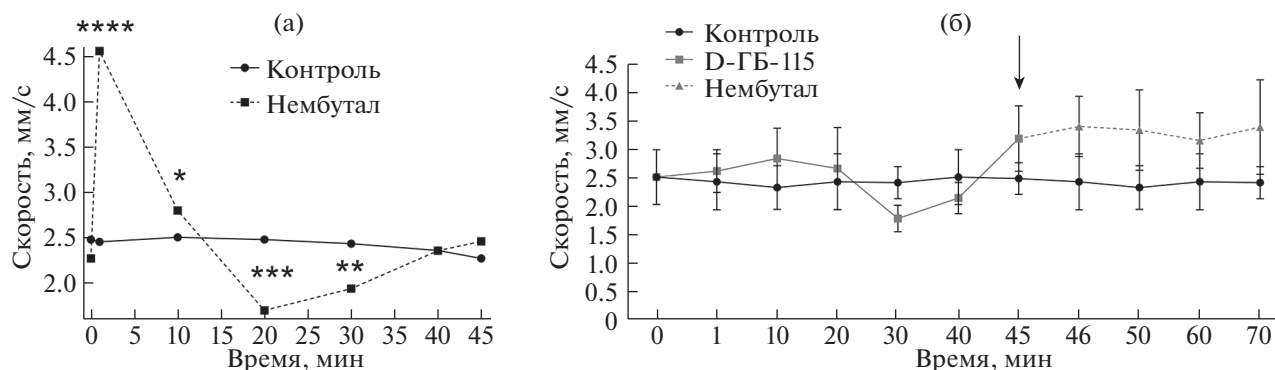


Рис. 3. Изменение скорости движения и активности *Paramecium caudatum* в ответ на предъявление селективного агониста и ГАМКА нембутала и D-ГБ-115 в концентрации (10^{-7} М в среде). а – График изменения скорости движения клеток (после введения нембутала). б – График изменения скорости движения клеток после введения D-ГБ-115 (1–45 мин) с последующим внесением в среду нембутала (45–70 мин).

обусловлен тем, что нембутал является агонистом ГАМК-А рецепторов [9], расположенных на мембране клеток. Однако этот эффект менее продолжительный (около 13 мин) и угасает, так как действует только один тип рецепторов (рис. 3 а) в отличие от ГАМК, который активирует ГАМК-А и ГАМК-Б рецепторы (рис. 1 а). После того как большая часть рецепторов десенситизируется, клетка будет стремиться к своему обычному мембранному потенциалу. Так как модельный объект *Paramecium caudatum* является открытой системой, способной к синтезу и экзоцитозу большинства нейромедиаторов в среду, способов для регуляции того или иного рода воздействия у нее не мало [10]. Именно поэтому, чем больше будет эффект после воздействия, тем сильнее будет “физиологический заброс” (рис. 3 а) прежде, чем параметры вернуться к исходным значениям.

Внесение в среду **Д-ГБ-115** незначительно влияло на двигательную активность клеток относительно контрольной группы с 1-й по 45-ю минуту регистрации (рис 3 б). На 45-й минуте регистрации в среду добавили нембутал, который должен был привести к резкому росту скорости клеток, однако эффект был заблокирован. Таким образом, предположительно проявляется блокада активации ГАМК-А рецепторов препаратом **Д-ГБ-115**. Полученные результаты позволяют определить наличие взаимосвязи ГАМКергической и холинэргической систем у *Paramecium caudatum* наравне с высшими позвоночными [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование метода скрининга фармакологических препаратов на клеточной модели *Paramecium caudatum* показало возможность определения физиологического диапазона концентраций ГАМК. Анализируя изменение двигательной активности клеток, был показан блокирующий эффект ГАМК-А рецепторов препарата **Д-ГБ-115**. Изученная эффективность данного препарата на парамециях позволяет рекомендовать его для иных исследований, направленных на фармакологическое изучение ГАМК-А рецепторов, как у одноклеточных, так и у высших животных. При использовании разных известных агонистов можно определять характер фармакологического воздействия, является ли исследуемый препарат селективным или не является таковым для каждого конкретного типа рецепторов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хотим выразить благодарность руководителю отдела химии лекарственных средств ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” д.б.н. член-корр. РАН Татьяне Александровне Гудашевой за предоставленную возможность работать с препаратом Д-ГБ-115.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121032500080-8), а также при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект” (Руководитель программы: академик РАН К.В. 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 Values*. 2018. V. 43. № 1. P. 671–693.
2. *Gruzdev G.A., Karpukhina O.V., Yakunin V.G., et al.* Effect of Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma on *Paramecium caudatum* Cell Culture // *Moscow Univ Biol Sci Bull*. 2022. V. 76. P. 244–248.
3. *Gruzdev G.A., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., et al.* Method for Primary Screening of Pharmaceuticals on the *Paramecium caudatum* Eukaryotic Cell Model // *Dokl Biochem Biophys*. 2022. V. 502. P. 36–39.
4. *Gudasheva T.A., Kir'yanova E.P., Kolik L.G., et al.* Design and synthesis of cholecystokinin-4 dipeptide analogues with anxiolytic and anxiogenic activities // *Russ J Bioorganic Chem*. 2007. V. 33. P. 383–389.
5. *Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. P. 676–682.
6. *Груздев Г.А., Карпукхина О.В., Иноземцев А.Н., et al.* Анализ двигательной активности инфузорий *Paramecium caudatum* как тест-система оценки свойств адреналина // *Экспериментальная и клиническая фармакология* V. 85. P. 41–45.
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. 82–6.
8. *Ramoino P., Milanese M., Candiani S., et al.* Gamma-amino butyric acid (GABA) release in the ciliated protozoan *Paramecium* occurs by neuronal-like exocytosis // *J Exp Biol*. 2010. V. 213. P. 1251–8.
9. *Germann A.L., Burbridge A.B., Pierce S.R., et al.* Activation of the Rat $\alpha 1\beta 2\epsilon$ GABA-A Receptor by Ortho-

- steric and Allosteric Agonists // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 1–16.
10. Csaba G. The hormonal system of the unicellular Tetrahymena: a review with evolutionary aspects // *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2012. V. 59. P. 131–156.
11. Siniscalchi A., Rodi D., Cavallini S., et al. Effects of cholecystokinin tetrapeptide (CCK4) and of anxiolytic drugs on GABA outflow from the cerebral cortex of freely moving rats // *Neurochem Int*. 2003. V. 42. P. 87–92.

THE EFFECT OF THE AGONIST CHOLECYSTOKININ-4 D-GB-115 ON THE CHARACTER OF MOTOR ACTIVITY OF *PARAMECIUM CAUDATUM*

G. A. Gruzdev^{a,#}, L. V. Soboleva^a, and A. A. Kamensky^a

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS K.V. Anokhin

The study investigated the effect of GABA in various concentrations and D-GB-115 at a concentration of 10^{-10} mol/ml on the behavior of *Paramecium caudatum*. It has been shown that GABA increases motor activity and changes the movement strategy of these protozoa, and the dose-effect relationship is domed, which can be explained by the presence of two types of GABA receptors in the outer membrane of paramecia: GABA-A and GABA-B. The range of active concentrations of GABA ranges from 10^{-6} to 10^{-16} mol/ml. The effect of pharmacological agents interacting with the GABA system on the behavior of infusoria: nembutal and D-GB-115.

Keywords: *paramecium caudatum*, comparative physiology, cellular model, neurotransmitters