

НЕЙРОПАРАЛИТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЭКСТРАКТОВ ИЗ МОРСКИХ ЧЕРВЕЙ ТИПА NEMERTEA: НАПРАВЛЕННЫЙ СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ АНТИБОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ

© 2015 О.А. Шокур¹, Т.Ю. Магарламов², А.С. Кротов¹, Е.А. Горобец¹, Д.И. Мельникова¹

¹Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток

²Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток

Статья поступила в редакцию 11.11.2015

Нейротоксины, представляющие собой соединения, блокирующие проведение нервного импульса, являются одним из важнейших направлений в разработке обезболивающих препаратов длительного действия. В настоящей работе проведен скрининг экстрактов тканей разных видов немуртин, обитающих в прибрежных зонах Японского моря: *Cephalothrix simula*, *Lineus alborostratus*, *Quasitetrastremma stimpsoni* и *Quasitetrastremma nigrifrons*, на наличие нейротоксического и анестезиологического действия. Экстракты из *C. simula* и *L. alborostratus* содержат высокое количество токсина, подавляющего проведение импульса в седалищном нерве лягушки *Rana chensinensis*, и являются перспективными объектами для изучения в качестве источника нейротоксинов – перспективных анестетиков.

Ключевые слова: немуртины, анестетики, нейротоксины, проводниковая анестезия

Быстрое развитие промышленности, энергетики и транспорта, химизация сельского хозяйства и быта, урбанизация и рост городов приводит к увеличению промышленных, сельскохозяйственных, транспортных и бытовых отходов, интенсивно загрязняющих окружающую среду. Под влиянием антропогенной деятельности происходит интенсивное изменение окружающей среды, которое оказывает как прямое, так и опосредованное влияние на здоровье и заболеваемость населения. На фоне экологического неблагополучия отмечается рост иммунных заболеваний, аллергий, сердечно-сосудистой патологии, а также онкозаболеваний. Симптомом многих заболеваний, вызванных ухудшением состояния экологической ситуации в мире, является боль. В частности, хроническая и невропатическая боль влияет на миллионы людей во всем мире в том числе такие случаи, как рак, остео- и ревматоидный артрит, операции и травмы. Боль является огромной глобальной проблемой здравоохранения [5]. Было подсчитано, что 20% взрослых страдают

от боли в глобальном масштабе, и диагноз хронической боли каждый год впервые ставят 10% новым пациентам. Таким образом, существует очевидная необходимость в поиске и разработке новых анальгетиков и анестетиков.

Одним из важных направлений в разработке обезболивающих препаратов длительного действия являются нейротоксины, частично или полностью подавляющие проведение нервного импульса. Среди известных ядов невропаралитического действия самым мощным природным нейротоксином является тетродотоксин (ТТХ). Из-за высокой частоты пищевых отравлений с последующим летальным исходом этот яд лучше всего изучен в рыбах фуру, но также найден в самых разнообразных организмах: в том числе в нескольких видах плоских червей, морских звезд, сине-кольчатых осьминогах, брюхоногих моллюсках, и даже в позвоночных, таких как Калифорнийский тритон и морской бычок [4]. Наиболее перспективными объектами для изучения тетродотоксина являются представители типа Nemertea, которые содержат экстремально высокое количество токсина, сами резистентны к нему, и используют токсин не только в качестве защиты, но и для нападения на жертву в качестве яда невропаралитического действия.

Цель работы: провести скрининг на наличие нейротоксинов из экстрактов тканей разных видов немуртин, обитающих в прибрежных зонах Японского моря: *Cephalothrix simula*, *Lineus alborostratus*, *Quasitetrastremma stimpsoni* и *Quasitetrastremma nigrifrons*.

Материал и методика. Образцы четырех видов немуртин - *Cephalothrix simula*, *Lineus*

Шокур Ольга Андреевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии и биотестирования. E-mail: olga_shokur@list.ru

Магарламов Тимур Юсифович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии. E-mail: biotimur@yandex.ru

Кротов Антон Сергеевич, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: as_krotov94@mail.ru

Горобец Екатерина Алексеевна, студентка

Мельникова Дарья Игоревна Мельникова, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: dashkamelnikova93@gmail.com

alborostratus, *QuasitetraSTEMMA stimpsoni*, и *QuasitetraSTEMMA nigrifrons* были собраны в ризоидах бурых водорослей *Saccharina sp.* в заливе Восток залива Петра Великого (Японское море) в июне-августе 2015 г. (табл. 1). Токсины выделяли методом, в основе которого лежала экстракция раствором уксусной кислоты [6]. Образцы промывали 3 раза стерильной морской водой, затем помещали в ручной гомогенизатор (EMS, USA) для тщательной гомогенизации тканей. В гомогенат добавляли 1% раствор уксусной кислоты в 80% метаноле до соотношения гомогенат :

экстрагент - 1:10. Суспензию помещали в ультразвуковой гомогенизатор (HD 2070, Bandelin Sonopuls, Germany) и производили дальнейшее разрушение тканей в течение 30 минут (20 kHz, амплитуда 228 мкм, рабочий цикл 0,8 секунд интервалом 0,2 секунды), а затем оставляли на кипящей водяной бане на 20 минут. Полученный экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g, отбирали супернатант и упаривали в роторном испарителе до объема 20-100 мкл. Остаток восстанавливали 0,1% водным раствором уксусной кислоты до 1 мл.

Таблица 1. Токсичность немертин, собранных в заливе Восток залива Петра Великого (Японское море).

Ленточный червь	Дата сбора	Кол-во собранных видов	Вес (мг)	Токсичность
<i>C. simula</i>	21.06.2015	3	60	+
<i>L. alborostratus</i>	16.06.2015	5	230	+
<i>Q. nigrifrons</i>	05.07.2015	4	195	±
<i>Q. stimpsoni</i>	05.07.2015	14	670	-

Примечание: + - ярко выраженная токсичность; ± - невыраженная токсичность; - токсичность не выявлена

Биологическую оценку токсичности производили при внутрибрюшинном введении экстракта на 25 мышках-самцах линии C57BL6, массой 18-20 гр., получавших стандартную виварную диету [3]. Контрольным животным вводили растворитель (0,1% раствор уксусной кислоты). Степень полученного токсического эффекта оценивалась по степени выраженности токсических симптомов.

Проводниковую анестезию исследовали в опытах на седалищном нерве лягушек *Rana chensinensis* [1]. О степени обезболивания судили по отсутствию сгибания конечности, раздражаемой 0,3% раствором серной кислоты. Изучение свойств центральной нервной системы проводили на препаратах лягушек, использовали спинальную лягушку с разрушенным головным мозгом и сохраненным спинным. Приготовление спинальной лягушки осуществляли посредством ее декапитации, затем лягушку подвешивали на штативе, приколов нижнюю челюсть булавкой к пробке штатива. Ожидали, пока у лягушки пройдет болевой шок (послеоперационное угнетение спинного мозга), в это время смачивали кожу лягушки водой для усиления кожного дыхания. При исследовании проводниковой анестезии определяли время рефлекса, для этого погружали кончики пальцев одной из лапок лягушки в стаканчик с 0,3% раствором серной кислоты, фиксировали время от момента погружения лапки в кислоту до появления ответной реакции на раздражение. Таким образом, определяли время

рефлекса в секундах. Повторяли определение времени рефлекса 2-3 раза, после каждого раздражения обмывали лапку водой. Повторное определение проводили через 2-3 мин. Подсчитывали среднее время рефлекса. При исследовании местноанестезирующего действия в качестве препарата сравнения был взят новокаин (Борисовский ЗМП, Беларусь).

Результаты. Наибольшая токсичность была выявлена в экстракте из *C. simula*: экстракт из 60 мг тканей цефалотрикса вызывал у животных паралич, судороги, нарушение дыхания (одышка) и затем летальный исход в течение 4 минут.

Экстракт из *L. alborostratus* вызывал генерализованные тонико-клонические судороги с летальным исходом в течение часа. Тонические судороги возникали чаще и длились продолжительнее, они затрагивали мышцы мордочки, шеи, туловища, лапок. Задние лапы разогнуты, передние лапы согнуты, мышцы напряжены, голова опрокинута назад, туловище вытянуто, зубы сжаты, сознание сохранено, при этом дыхание не нарушено. Тонические судороги сменялись фазой клонических судорог: животное вытягивало задние лапы, и возникали быстрые мышечные сокращения, следующие друг за другом, при этом наблюдались нарушение дыхательного цикла и непроизвольные акты мочеиспускания.

Экстракт из *Q. nigrifrons* показал краткосрочный нейротоксический эффект: животные активны, поведение обычное. У мышшей наблюдается частичный парез задних лапок. Возможно,

вследствие токсического воздействия на пояснично-крестцовый отдел спинного мозга. При этом наблюдалось затруднение в передвижении, а именно – животные не могли приподнять живот вследствие слабости мышц бедра и поясничного отдела позвоночника.

Экстракт из *Q. stimpsoni* не проявил токсического эффекта. Животные активны, видимых отклонений в поведении и двигательной сфере не было зафиксировано.

Проводниковая анестезия на седалищном нерве лягушки показала, что обезболивающим действием обладали экстракты из *C. simula* и *L. alborostratus* (табл. 2). Экстракты из *Q. nigrifrons* и *Q. stimpsoni* не проявляли подобного действия. Так, в условиях проводниковой анестезии время наступления обезболивающего эффекта под влиянием экстракта из *C. simula* составляла 7,2 мин, а экстракта из *L. alborostratus* – 20 мин. В сопоставлении с препаратом сравнения (новокаин) время наступления обезболивающего эффекта под влиянием экстракта из *C. simula* короче, а под влиянием экстракта из *L. alborostratus* – длиннее.

Продолжительность анестезии из экстрактов *C. simula* и *L. alborostratus* на данной модели проводникового обезболивания проследить не представлялось возможным, так как анестезирующий эффект не прекращался за весь период наблюдения.

Одновременно с анестезирующим эффектом у животных после нанесения веществ развивалось снижение мышечного тонуса. Время наступления и продолжительность атонии совпали с анестезией при использовании экстрактов из *C. simula* и *L. alborostratus* (табл. 2). Восстановление двигательной активности и чувствительности происходило только в опытах с применением раствора новокаина и экстракта *L. alborostratus*. Экстракты из *C. simula* приводили к полному подавлению двигательной активности и болевой чувствительности в течение всего периода наблюдения (более 60 минут).

Экстракты из *Q. nigrifrons* и *Q. stimpsoni* не вызывали атонии и проводниковой анестезии в эксперименте на седалищном нерве лягушек.

Таблица 2. Сравнительная характеристика биологических эффектов в опытах на седалищном нерве лягушек *Rana chensinensis*

Исследуемое соединение	Количество животных	Вес животных, г	Время наступления анестезии, мин	Продолжительность обезболивающего эффекта, мин	Снижение двигательной активности, мин	Восстановление двигательной активности, мин
экстракт из <i>C. simula</i>	5	2,2±0,2	7,2 ±1,8	> 60	4,4 ±2,2	не восстановилось
экстракт <i>L. alborostratus</i>	7	5,5±0,5	20±6,7	> 60	17±3,4	12±8.7
экстракт из <i>Q. nigrifrons</i>	5	6,6±0,6	–	–	–	–
экстракт из <i>Q. stimpsoni</i>	5	6,3±0,5	–	–	–	–
новокаин	5	3,5±0,8	12,3±3,05	34,3±6,1	20,7±7,25	24,3±4
растворитель (контроль)	5	2,95±0,8	–	–	–	–

Примечание: – эффект не возникал за весь период наблюдения (60 минут)

Обсуждение. К сожалению, сложность структуры нейротоксинов превышает разрешающую способность химических методов. Сведения об особенностях фармакологического эффекта дают дополнительную информацию о строении активного центра молекулы токсина. При биологической оценке токсического действия экстрактов, экстракт из цефалотоксина проявил типичные симптомы интоксикации тетродотоксином [7]: затрудненное дыхание, судороги и летальный исход в течение 4 мин. Таким образом, экстракт из *C. simula* содержит экстремально высокое количество токсина (табл. 1) и является перспективным объектом для изучения в качестве источника тетродотоксина – перспективного

анестетика и антиаритмика. Описанные токсические проявления, возникшие у экспериментальных животных, развились вследствие нарушения деятельности ЦНС. Согласно описанным проявлениям яд увеличивает частоту нервных импульсов в мышечной ткани, что приводит к судорогам у мышей. В результате поиска анестезирующей активности среди экстрактов немуртин установлено, что анестезирующим действием обладают 2 экстракта: из *C. simula* и *L. alborostratus*. Они индуцировали выраженное обезболивающее действие в условиях проводниковой анестезии. Экстракты из *Q. nigrifrons* и *Q. stimpsoni* не вызывали фармакологических эффектов, а значит в экстрактах отсутствовало достаточное количество

токсина, приводящих к видимым нейротоксическим и анестезиологическим эффектам. Стоит отметить, что Асакава и соавторы (2013) также показали отсутствие токсина у представителей рода *Quasitetrastemma*, выловленных в заливе Аккеши (Японское море) [2].

Выводы: экстракты из *C. simula* и *L. alborostratus* могут быть рекомендованы к дальнейшим исследованиям: очистке, выделению чистых соединений и доклиническому изучению анестезирующей активности.

Исследование выполнено при поддержке ДВФУ, проект №14-08-06-19 и. Работа поддержана грантом Программы фундаментальных научных исследований «Дальний Восток» №15-1-7-022 и 15-11-6-074.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Сокольников, Ю.Н. Физиология человека и животных: учебно-методическое пособие для студентов по выполнению лабораторных работ / Ю.Н. Сокольников, И.А. Кирсанова, С.М. Рыбалкина. – Владивосток: Дальневост. федерал. ун-т, 2014. 88 с.
2. Asakawa, M. Highly Toxic Ribbon Worm *Cephalothrix simula* Containing Tetrodotoxin in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan / M. Asakawa, K. Ito, H. Kajihara // *Toxins*. 2013. No 5. P. 376-395.
3. Hwang, D.F. Bioassay of tetrodotoxin using ICR mouse strain / D.F. Hwang, S.S. Jeng // *J. Chin. Biochem. Soc.* 1991. V. 20. P. 80-86.
4. Magarlamov, T.Y. Tetrodotoxin-producing *Bacillus* sp. from the ribbon worm (Nemertea) *Cephalothrix simula* (Iwata, 1952) / T.Y. Magarlamov, I.A. Beleneva, A.V. Chernyshev, A.D. Kuhlevsky // *Toxicon*. 2014. V. 85. P. 46-51.
5. Nieto, F.R. Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain / F.R. Nieto, E.J. Cobos, M.A. Tejada et al. // *Mar Drugs*. 2012. V. 10(2). P. 281-305.
6. Auawithoothij, W. *Shewanella putrefaciens*, a major microbial species related to tetrodotoxin (TTX)-accumulation of puffer fish *Lagocephalus lunaris* / W. Auawithoothij, A. Noomhorm // *Journal of Applied Microbiology*. 2012. V. 113. P. 459-465.
7. Yasumoto, T. Tetrodotoxin and the Haitian zombie / T. Yasumoto, C.Y. Kao // *Toxicon*. V. 24 (8). P. 747-749.

NEUROPARALYTIC EFFECT OF EXTRACTS FROM SEA WORMS LIKE NEMERTEA: THE DIRECTED SCREENING OF ANTI-PAINFUL ACTION SUBSTANCES

© 2015 O.A. Shokur¹, T.Yu. Magarlamov², A.S. Krotov¹, E.A. Gorobets¹, D.I. Melnikova¹

¹ School of biomedicine of Far Eastern Federal University, Vladivostok

² Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy FEB RAS, Vladivostok

The neurotoxins representing the compounds, blocking carrying out a nervous impulse, are one of the major directions in development the long-action anesthetic drugs. In the present work the screening of tissue extracts of several nemertean species, living in coastal zones of the Japan Sea is carried out: *Cephalothrix simula*, *Lineus alborostratus*, *Quasitetrastemma stimpsoni* and *Quasitetrastemma nigrifrons*, on existence of neurotoxic and anesthetic action. Extracts from *C. simula* and *L. alborostratus* contain high amount of the toxin suppressing carrying out an impulse in sciatic nerve of a frog of *Rana chensinensis* and are perspective objects for studying as a source of neurotoxins – perspective anesthetics.

Key words: *nemertean, anesthetics, neurotoxins*

Olga Shokur, Candidate of Biology, Research Fellow at the Laboratory of Pharmacology and Biotesting. E-mail: olga_shokur@list.ru

Timur Magarlamov, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Pharmacology Laboratory. E-mail: biotimur@yandex.ru

Anton Krotov, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: as_krotov94@mail.ru

Ekaterina Gorobets, Student

Daria Melnikova, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: dashkamelnikova93@gmail.com