

СТАТЬЯ

УДК 574.24:615.916

**НЕЙРОТОКСИЧНОСТЬ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ
ДЛЯ ПОЧВЕННОЙ НЕМАТОДЫ *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Егорова А.В., Гайнутдинов Т.М., Калининкова Т.Б., Гайнутдинов М.Х.

*Институт проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, Казань,
e-mail: tbkalinnikova@gmail.com*

Тяжелые металлы являются загрязнителями окружающей среды, опасными для человека и животных. Одной из самых чувствительных мишеней действия ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} на организмы человека и животных является нервная система. Целью этой работы явилось выявление нейротоксического действия ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} на организм *C. elegans* в условиях кратковременной (15–120 мин) экспозиции нематод к этим тяжелым металлам. После двухчасовой экспозиции *C. elegans* к ионам Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} в диапазоне их концентраций 30–120 мкМ все нематоды сохраняют способность к плаванию, но у 20–30% нематод выявляются ошибки моторной программы плавания, индуцированного механическим стимулом. Нарушения моторной программы плавания тяжелыми металлами усиливаются (до 60% нематод), если во время экспозиции к ним нематоды периодически (через 15, 30, 60 и 90 мин) подвергаются механическим стимулам. Дальнейшее увеличение чувствительности *C. elegans* к тяжелым металлам происходит, если нематоды до экспозиции к ним два часа инкубируются в отсутствие пищи (*E. coli*). Известно, что отсутствие пищи изменяет состояние системы нейронов, регулирующей локомоцию. Поэтому зависимость нарушений моторной программы плавания тяжелыми металлами от кратковременного голодания и периодической стимуляции плавания механическими стимулами свидетельствует о нейротоксическом действии тяжелых металлов, нарушающем интегративные функции нервной системы *C. elegans*.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, плавание, индуцированное механическим стимулом, нейротоксичность тяжелых металлов, ионы Cu^{2+} , ионы Pb^{2+} , ионы Cd^{2+}

**NEUROTOXICITY OF HEAVY METALS
FOR SOIL NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Egorova A.V., Gaynutdinov T.M., Kalinnikova T.B., Gaynutdinov M.Kh.

*Research Institute for Problems of Ecology and Mineral Wealth Use of Tatarstan Academy of Sciences,
Kazan, e-mail: tbkalinnikova@gmail.com*

Heavy metals are pollutants of environment harmful for human and animals organisms. One of the most sensitive targets of Pb^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions action on human and animals organisms is nervous system. The aim of this work was detection of neurotoxic action of Pb^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions on *C. elegans* organism in conditions of short-term (15–120 minutes) exposition of nematodes to these heavy metals. After 2-hours *C. elegans* exposition to Pb^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions in the range of their concentrations 30–120 μ M all nematodes maintained the ability to swimming, but 20–30% of nematodes had disturbances in motor programme of swimming as induced by mechanical stimulus. Disturbances in motor programme of swimming by heavy metals enhanced (till 60% of nematodes) if during exposition to metals nematodes from time to time (after 15, 30, 60 and 90 minutes) were subjected to mechanical stimuli. The subsequent increase of *C. elegans* sensitivity to heavy metals took a place if nematodes were incubated for two hours without food (*E. coli*) before exposure to metals. It is known that the absence of food alters the state of neurons' system which regulates locomotion. Therefore the dependence of disturbances of motor programme of swimming by heavy metals from short-term starvation and periodical stimulation of swimming by mechanical stimuli gives the evidence of neurotoxic action of heavy metals, which breaks integrative functions of *C. elegans* nervous system.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, swimming as induced by mechanical stimulus, neurotoxicity of heavy metals, Cu^{2+} ions, Pb^{2+} ions, Cd^{2+} ions

Тяжелые металлы на протяжении нескольких десятилетий рассматриваются как загрязнители окружающей среды, опасные для человека и животных. Одной из самых чувствительных мишеней токсического действия ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} на организмы человека и животных является нервная система [1–3]. В зависимости от продолжительности действия тяжелых металлов на организм и их дозы тяжелые металлы вызывают широкий спектр нарушений интегративных функций нервной системы, включающих в себя нарушения памяти, поведения

и индукцию процессов дегенерации нейронов [1–3]. В качестве основных механизмов действия тяжелых металлов на нервную систему рассматриваются их прямое негативное влияние на ионные каналы в мембранах нейронов [4, 5] и индукция процессов образования широкого спектра реактивных форм кислорода (окислительный стресс) [3, 6]. В связи с чрезвычайной сложностью организации нервных систем человека и грызунов многие годы для изучения механизмов как интегративных функций нервной системы, так и нарушения этих функций токсиканта-

ми в качестве удобной модели используется простая нервная система свободноживущей почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans*, состоящая всего из 302 нейронов. Основанием для использования этой модели является высокий консерватизм эволюции молекулярных и клеточных элементов нервной системы, многие из которых мало отличаются в нервных системах человека и *C. elegans*. *Caenorhabditis elegans* потенциально является удобной моделью и для исследования нейротоксического действия тяжелых металлов на организмы человека и позвоночных [3]. Поэтому целью работы явилась экспериментальная проверка гипотезы, предполагающей, что тяжелые металлы могут нарушать интегративные функции системы нейронов, осуществляющей регуляцию плавания *C. elegans*, индуцированного механическим стимулом.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили с *C. elegans* линии дикого типа N2, предоставленной Caenorhabditis Genetics Center. Нематод выращивали при 22 °С в чашках Петри со стандартной средой выращивания нематод и *E. coli* OP50 для кормления [7]. Эксперименты проводили с нематодами трехдневного возраста, инкубированными индивидуально в 1 мл NG буфера [7] при температуре 22 °С. Нарушения поведения, вызванные действием ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} , регистрировали с использованием стереоскопического микроскопа SMZ-05.

Эксперименты по изучению токсического действия тяжелых металлов на плавание нематод, индуцированное механическим стимулом, проводились в трех вариантах.

1. Нематод переносили индивидуально в 1 мл NG буфера, содержащего $CuSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ или $Cd(NO_3)_2$ в концентрациях 30, 60 и 120 мкМ, и регистрировали нарушения моторной программы плавания, индуцированного механическим стимулом (встряхиванием пробирки с нематодой), в течение 10 с после стимула. Эта процедура производилась через 15, 30, 60, 90 и 120 мин экспозиции нематод к тяжелым металлам. В каждом варианте этого эксперимента, проводившегося в трех повторностях, было использовано 50 нематод.

2. Исследование зависимости чувствительности поведения нематод к тяжелым металлам от их двигательной активности проводилось сравнением токсического действия ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} на поведение нематод, которые в ходе 90-минутной экспозиции к тяжелым металлам не подвергались стимуляции двигательной активности, и нематод, которые во время 90-минутной экспозиции к тяжелым металлам подвергались

действию механического стимула каждые 15 минут. Эксперименты проводили в трех повторностях при использовании 50 нематод в каждом варианте.

3. Для выяснения возможного влияния кратковременного голодания на чувствительность поведения *C. elegans* к токсическому действию тяжелых металлов в контрольном варианте нематод переносили в 1 мл NG буфера сразу после их отмывания от агара, а в опытном варианте нематод инкубировали в 1 мл NG буфера без тяжелых металлов в течение двух часов, после чего в среду с нематодами добавляли тяжелые металлы. В обоих вариантах нематод подвергали механическому стимулу для оценки нарушений поведения через 15, 30, 60 и 90 мин экспозиции к тяжелым металлам.

Результаты исследования и их обсуждение

Для проверки предположения о том, что тяжелые металлы оказывают негативное влияние на функции системы нейронов, регулирующей локомоцию *C. elegans*, нами были проведены эксперименты, в которых исследовалось влияние ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} на плавание нематод, индуцированное механическим стимулом.

Для проявления токсического действия тяжелых металлов на поведение *C. elegans* ключевое значение имеет особенность организмов нематод: на стадии круглых червей в ходе эволюции организмы Metazoa еще не приобрели многоклеточный барьер (гематоневральный барьер высших беспозвоночных и гематоэнцефалический барьер позвоночных), отделяющий нервную систему от общей внутренней среды организма; отсутствие этого барьера, защищающего интегративные функции нервной системы от действия тяжелых металлов и других токсикантов, у нематод компенсируется чрезвычайно низкой проницаемостью кутикулы, ограничивающей поступление токсикантов во внутреннюю среду организма. Из-за этих особенностей организмов нематод концентрации тяжелых металлов и многих других токсикантов, эффективные для нарушения поведения *C. elegans*, на порядки выше, чем для таких беспозвоночных, как *Daphnia magna*, но после проникновения во внутреннюю среду организма облегчено их прямое токсическое действие на нервную систему, которая обладает большей чувствительностью к действию токсикантов, чем внутренние органы. Из-за низкой проницаемости кутикулы для тяжелых металлов их токсическое действие проявляется при больших концентрациях (50–200 мкМ) и после длительной экспозиции к ионам Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} (4–6 ч) [3].

Таблица 1

Зависимость нарушений моторной программы плавания *C. elegans* от стимуляции плавания во время экспозиции нематод к тяжелым металлам

Условия эксперимента	Доля особей с нарушениями моторной программы плавания после 90-минутной экспозиции к тяжелым металлам, %								
	Концентрация тяжелых металлов, мкМ								
	CuSO ₄			Pb(NO ₃) ₂			Cd(NO ₃) ₂		
	30	60	120	30	60	120	30	60	120
Без стимуляции механическим стимулом	0	10 ± 1	25 ± 2	5 ± 1	15 ± 1	31 ± 2	15 ± 1	25 ± 2	33 ± 2
Механический стимул через 15, 30, 60 и 75 мин экспозиции	34 ± 1	52 ± 3	65 ± 4	28 ± 2	55 ± 3	72 ± 4	42 ± 3	59 ± 2	75 ± 4

Примечание. Эксперименты проводились в трех повторностях. В каждом варианте использовано 50 нематод.

Таблица 2

Нарушения моторной программы плавания *C. elegans* тяжелыми металлами

Условия эксперимента	Доля особей с нарушениями моторной программы плавания, %				
	Время экспозиции <i>C. elegans</i> к тяжелым металлам, мин				
	15	30	60	90	120
CuSO ₄					
30 мкМ	0	0	15 ± 1	21 ± 2	32 ± 2
60 мкМ	0	8 ± 1	18 ± 1	33 ± 2	51 ± 3
120 мкМ	0	16 ± 1	28 ± 2	45 ± 3	67 ± 4
Pb(NO ₃) ₂					
30 мкМ	0	0	8 ± 1	17 ± 2	35 ± 3
60 мкМ	0	11 ± 1	21 ± 2	35 ± 2	55 ± 3
120 мкМ	0	19 ± 1	33 ± 2	51 ± 3	72 ± 4
Cd(NO ₃) ₂					
30 мкМ	0	5 ± 1	19 ± 1	23 ± 2	41 ± 3
60 мкМ	0	13 ± 1	24 ± 1	34 ± 2	58 ± 3
120 мкМ	0	22 ± 1	35 ± 2	54 ± 3	72 ± 4

Примечание. Эксперименты проводились в трех повторностях. В каждом варианте использовано 50 нематод. Нематоды подвергались механической стимуляции через 15, 30, 60, 90 и 120 мин экспозиции к тяжелым металлам.

В соответствии с результатами этих работ в наших экспериментах с нематодами, инкубированными индивидуально два часа в жидкой среде, содержащей ионы Pb²⁺, Cd²⁺ и Cu²⁺ в диапазоне концентраций 30–120 мкМ при температуре 22 °С все нематоды сохраняли способность к плаванию, индуцированному механическим стимулом. В то же время после этой экспозиции к ионам Pb²⁺, Cd²⁺ и Cu²⁺ наблюдались достоверные нарушения моторной программы плавания у 25, 31 и 33% нематод при концентрации CuSO₄, Pb(NO₃)₂ и Cd(NO₃)₂, равной 120 мкМ. Эти нарушения проявлялись в нарушениях координации процессов сокращения и расслабления мышц, необходимой для синусоидальных движений тела при плавании в одном направлении в течение 10 с после стимула (табл. 1).

В этих экспериментах влияние тяжелых металлов на поведение оценивалось после двухчасовой экспозиции нематод к ним, во время которой нематоды не подвергались механическому стимулу. Напротив, в серии экспериментов, результаты которых представлены в табл. 1–2, нематоды во время экспозиции к тяжелым металлам каждые 15 мин подвергались механической стимуляции для оценки нарушений моторной программы плавания. Оказалось, что периодическая стимуляция двигательной активности нематод вызывает сильное увеличение чувствительности их поведения ко всем трем тяжелым металлам (Pb²⁺, Cd²⁺ и Cu²⁺). Как показано в табл. 1–2, тяжелые металлы в диапазоне концентраций 30–120 мкМ вызывают развивающиеся во времени (15–90 мин) нарушения моторной программы плавания, если

плавание нематоды периодически стимулируется, хотя в контрольных экспериментах без такой стимуляции нарушения поведения проявляются слабее (табл. 1). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о зависимости чувствительности поведения *C. elegans* к негативному влиянию тяжелых металлов от двигательной активности нематод.

Как показано в табл. 3, чувствительность поведения *C. elegans* к тяжелым металлам зависит не только от двигательной активности, но и от кратковременной (2 ч) предварительной инкубации нематод в жидкой среде без пищи (*E. coli*). Это кратковременное голодание *C. elegans* вызывает повышение чувствительности поведения к действию тяжелых металлов, проявляющегося при экспозиции нематод к ним в условиях периодической стимуляции двигательной активности механическим стимулом.

Плавание *C. elegans*, индуцированное механическим стимулом, является сложной формой поведения, осуществляемой механосенсорными нейронами и системой нейронов, регулирующей локомоцию, которая включает в себя командные и моторные нейроны и мышцы тела. Моторными нейронами *C. elegans* являются холинэргические нейроны, иннервирующие не только

мышцы, для которых ацетилхолин является возбуждающим нейротрансмиттером, но и моторные ГАМК-эргические нейроны, сигналы из которых вызывают расслабление мышц [8]. Очевидно, что мишенью действия тяжелых металлов на моторную программу плавания *C. elegans* являются нейроны, а не мышцы, так как в условиях нарушения этой программы нематоды полностью сохраняют способность к плаванию. Этому объяснению действия тяжелых металлов на поведение *C. elegans* соответствует зависимость чувствительности поведения к тяжелым металлам от периодической стимуляции двигательной активности нематод механическим стимулом. Одной из основных мишеней действия тяжелых металлов на нервную систему являются ионные каналы в мембранах нейронов [4], а функциональное состояние этих каналов изменяется в условиях стимуляции локомоции механическим стимулом. Поэтому очевидно, что чувствительность нейронов к действию тяжелых металлов на ионные каналы в мембранах может зависеть от активации системы нейронов, регулирующей локомоцию. Этим же можно объяснить и влияние предварительного голодания на чувствительность поведения *C. elegans* к тяжелым металлам (табл. 3).

Таблица 3

Влияние предварительного двухчасового голодания на чувствительность поведения *C. elegans* к тяжелым металлам

Условия эксперимента	Доля особей с нарушениями моторной программы плавания, %			
	Время экспозиции <i>C. elegans</i> к тяжелым металлам, мин			
	15	30	60	90
Без голодания				
CuSO ₄ 60 мкМ	0	10 ± 1	21 ± 2	38 ± 3
120 мкМ	0	17 ± 1	29 ± 2	47 ± 3
Pb(NO ₃) ₂ 60 мкМ	0	12 ± 1	19 ± 1	35 ± 2
120 мкМ	0	21 ± 2	31 ± 2	49 ± 3
Cd(NO ₃) ₂ 60 мкМ	0	12 ± 1	22 ± 2	35 ± 2
120 мкМ	0	21 ± 1	33 ± 2	52 ± 3
После двухчасового голодания				
CuSO ₄ 60 мкМ	10 ± 1	27 ± 2	42 ± 2	72 ± 4
120 мкМ	22 ± 2	36 ± 3	52 ± 3	85 ± 5
Pb(NO ₃) ₂ 60 мкМ	15 ± 1	31 ± 2	45 ± 3	81 ± 3
120 мкМ	24 ± 2	42 ± 3	56 ± 3	90 ± 5
Cd(NO ₃) ₂ 60 мкМ	16 ± 1	33 ± 2	47 ± 3	78 ± 4
120 мкМ	22 ± 2	45 ± 1	55 ± 3	95 ± 5

Примечание. Эксперименты проводились в трех повторностях. В каждом варианте использовано 50 нематод. Нематоды подвергались механической стимуляции через 15, 30, 60 и 90 мин экспозиции к тяжелым металлам.

Отсутствие пищи является одним из основных факторов, индуцирующих адаптивные изменения поведения животных [9–11]. Особенно сильно и быстро эти изменения поведения происходят у почвенных нематод, которые, в отличие от многих других животных с прерывистым питанием, питаются бактериями непрерывно. Отсутствие пищи вызывает у *C. elegans* целый комплекс адаптивных изменений поведения, проявляющихся через минуты и часы [10, 11]. Поэтому сенситизация поведения *C. elegans* к действию тяжелых металлов на нервную систему может быть следствием генерации нервной системой одной из адаптивных форм поведения, включающих в себя увеличение двигательной активности.

Два возможных объяснения нейротоксического действия тяжелых металлов на организм *C. elegans*, выявленного в этой работе, заключаются в следующем.

Известно, что тяжелые металлы оказывают влияние на поведение *C. elegans* (избегание сред, содержащих тяжелые металлы) в результате активации нейронов ADL, ASE и ASH, дендриты которых ориентированы непосредственно в окружающую среду [12]. Избегание нематодами сред с тяжелыми металлами индуцируется уже через несколько секунд введения ионов Pb^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} в среду [12]. Ранее нами показано, что компонентой реакции нервной системы *C. elegans* на активацию ноцицептивных нейронов ионами Cd^{2+} и Cu^{2+} является активация холинергической синаптической трансмиссии в системе нейронов, регулирующей локомоцию [13]. Эта активация происходит не в результате увеличения скорости секреции ацетилхолина, а в результате сенситизации никотиновых рецепторов ацетилхолина (н-холинорецепторов) к действию ацетилхолина и других агонистов этих рецепторов [13]. Гиперактивация н-холинорецепторов аномальным повышением уровня эндогенного ацетилхолина или действием агониста н-холинорецепторов левамизола вызывает нарушения моторной программы плавания, сходные с теми, которые выявляются при действии тяжелых металлов в наших экспериментах (табл. 1–2). Поэтому одним из возможных объяснений нарушений моторной программы плавания *C. elegans* тяжелыми металлами является гиперактивация н-холинорецепторов в системе нейронов, регулирующей плавание, сигналами из ноцицептивных нейронов, активируемых тяжелыми металлами [12].

Вторым из возможных объяснений этого нарушения интегративных функций нервной системы *C. elegans* тяжелыми металлами является прямое действие этих

металлов на ионные каналы, регулирующие локомоцию. В пользу этого объяснения свидетельствуют результаты исследований влияния тяжелых металлов на ионные каналы позвоночных [4] и усиление нарушений поведения *C. elegans* увеличением времени экспозиции к тяжелым металлам (табл. 3), которое может быть объяснено постепенным увеличением концентрации тяжелых металлов во внутренней среде организма.

Для выяснения механизма нейротоксического действия тяжелых металлов на организм *C. elegans* необходимы дополнительные исследования. Тем не менее результаты работы показывают, что *C. elegans* может быть использована как удобный модельный организм для изучения механизмов нейротоксичности тяжелых металлов.

Список литературы

1. Wang Bo, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effect. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013. vol. 2013. P. 1–12. DOI: 10.1155/2013/898034.
2. Sanders T., Liu Y., Buchner V., Tchounwou P.B. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: A review. *Rev. Environ. Health.* 2009. vol. 24. no. 1. P. 15–45. DOI: 10.1515/reveh.2009.24.1.15.
3. Chen P., Martinez-Finley E.J., Bomhorst J., Chakraborty S., Aschner M. Metal-induced neurodegeneration in *C. elegans*. *Front. Aging Neurosci.* 2013. vol. 5. P. 1–11. DOI: 10.3389/fnagi.2013.00018.
4. Vijverberg H.P.M., Oortgiesen M., Leinders T., van Kleef R.G.D.M. Metal interactions with voltage- and receptor-activated ion channels. *Environ. Health. Perspect.* 1994. vol. 102 (Suppl. 3). P. 153–158. DOI: 10.2307/3431780.
5. Zhang Y., Ye B., Wang D. Effects of metal exposure on associative learning behavior in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2010. vol. 59. P. 129–136. DOI: 10.1007/s00244-009-9456-y.
6. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005. vol. 12. P. 1161–1208. DOI: 10.2174/0929867053764635.
7. Kalinnikova T.B., Kolsanova R.R., Belova E.B., Shagidullin R.R., Gainutdinov M.Kh. Opposite responses of the cholinergic nervous system to moderate heat stress and hyperthermia in two soil nematodes. *J. Therm. Biol.* 2016. vol. 62. P. 37–49. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2016.05.007.
8. Pereira L., Kratsios P., Serrano-Saiz E., Sheftel H., Mayo A.E., Hall D.H., White J.G., LeBoeuf B., Garcia L.R., Alon U., Hobert O. A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *eLife.* 2015. vol. 4. P. e12432. DOI: 10.7554/eLife.12432.
9. Gruninger T.R., LeBoeuf B., Liu Y., Garcia L.R. Molecular signaling involved in regulating feeding and other motivated behaviors. *Mol. Neurobiol.* 2007. vol. 35. P. 1–20. DOI: 10.1007/bf02700621.
10. Hoffer C., Koelle M.R. AGS-3 alters *C. elegans* behavior after food deprivation via RIC-8 activation on the neural G protein $G\alpha_q$. *J. Neurosci.* 2011. vol. 31. P. 11553–11562. DOI: 10.1523/jneurosci.2072-11.2011.
11. Suo S., Culotti J.G., Van Tol H.H.M. Dopamine counteracts octopamine signalling in a neural circuit mediating food response in *C. elegans*. *The EMBO J.* 2009. vol. 28. P. 2437–2448. DOI: 10.1038/emboj.2009.194.
12. Sambongi Y., Nagae T., Liu Y., Yoshimizu T., Takeida K., Wada Y., Futai M. Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans*. *NeuroReport.* 1999. vol. 10. P. 753–757. DOI: 10.1097/00001756-199903170-00017.
13. Егорова А.В., Калининкова Т.Б., Колсанова Р.Р., Гайнутдинов М.Х., Шагидуллин Р.Р. Сенситизация никотиновых рецепторов ацетилхолина почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* Маурас ионами Cu^{2+} и Cd^{2+} // Современная наука. Естеств. и техн. науки. 2019. № 3. С. 19–24.