

Егорова Анастасия Васильевна

младший научный сотрудник

Гатиятуллина Алсу Фоатовна

младший научный сотрудник

Калинникова Татьяна Борисовна

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Институт проблем экологии и недропользования

ГНБУ «Академия наук Республики Татарстан»

г. Казань, Республика Татарстан

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА ОРГАНИЗМ ПОЧВЕННОЙ НЕМАТОДЫ *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Аннотация: проведено исследование токсического действия нитрата кадмия на организм почвенной нематоды *C. elegans*. Двухчасовая экспозиция нематод к 10 и 20 мМ $Cd(NO_3)_2$ и 30-минутная экспозиция с последующим восстановлением в течение 24 часов повышали чувствительность моторной программы плавания к агонисту никотиновых рецепторов ацетилхолина левамизолу. Предполагается, что экспозиция нематод к $Cd(NO_3)_2$ индуцирует изменения в холинергических и ГАМК-ергических нейронах в системе нейронов, реализующей плавание *C. elegans*.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, тяжелые металлы, кадмий, нейротоксичность.

Кадмий был открыт Фридрихом Штроемeyerом в 1817 году в качестве примеси к оксиду цинка [14]. В земной коре кадмий содержится в виде примеси ко многим минералам, в основном к минералам цинка [12]. Кадмий входит в состав многих сплавов, пигментов, химических источников тока, защитных покрытий, полупроводниковых материалов и люминофоров [14]. Наряду с такими металлами как хром, никель, медь, цинк, свинец и др. кадмий рассматривается в качестве загрязнителя окружающей среды. Например, в почве Федеральной

земли Северный Рейн-Вестфалия в Германии содержание кадмия составляет 258 мг/кг, а в поровой воде лесных почв его содержание может достигать 25 мкг/л [12]. Кадмий, как многие другие тяжелые металлы, способен накапливаться в живых организмах. Его содержание в надземных частях растений может превышать содержание в почве в десять раз [12]. Человек подвергается действию кадмия вследствие своей профессиональной деятельности (при вдыхании воздуха, загрязненного кадмием). Кроме этого, кадмий может попадать в организм человека с пищей, водой и при курении табака. Период полувыведения кадмия из организма человека составляет от 17 до 30 лет. Накопление кадмия в организме приводит к пневмонии, отеку легких, остеопорозу, анемии, заболеваниям почек и хроническому риниту. Длительное употребление в пищу риса и рыбы, загрязненных кадмием, привело к вспышке заболевания итай-итай среди жителей японской префектуры Тояма. Это заболевание сопровождается болями в суставах и позвоночнике и почечной недостаточностью, включая протеинурию и глюкозурию [14].

Основным механизмом токсического действия кадмия является индукция окислительного стресса, что, в свою очередь, приводит к повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера и изменению эффективности синаптической трансмиссии [8; 11–12; 14].

Удобным модельным организмом для исследований в нейротоксикологии и экотоксикологии является свободноживущая почвенная нематода *Caenorhabditis elegans*. Преимуществами *C. elegans* перед другими модельными организмами является простота и дешевизна выращивания в лаборатории, безопасность для исследователя, быстрая смена поколений и высокая плодовитость [4; 7; 9]. Организм *C. elegans* состоит из 959 соматических клеток, включая 302 нейрона [7]. В нервной системе *C. elegans* имеется 890 электрических синапсов, 1410 нервно-мышечных синапсов и 6393 химических синапса, использующих нейротрансмиттеры, присутствующие в организмах позвоночных (ацетилхолин, дофамин, серотонин, глутамат, γ -аминомасляная кислота) [4].

При этом у нематоды отсутствуют циркуляторная система и орган внешнего дыхания [7], что значительно облегчает интерпретацию результатов токсикологических экспериментов. Целью данной работы явилось изучение последствий кратковременного действия ионов кадмия на нервную систему *C. elegans*.

Эксперименты проводили с молодыми половозрелыми нематодами линии дикого типа N2, предоставленной Caenorhabditis Genetics Center. *C. elegans* выращивали по стандартной методике при 22°C [7]. Эксперименты проводили в NG буфере (pH 7,0) [7]. Перед каждым экспериментом нематод отмывали от среды выращивания, бактерий и метаболитов: два раза 10 мл NG буфера и один раз 85 мМ NaCl. После этого *C. elegans* переносили по 200 особей в стеклянные центрифужные пробирки, в которые добавляли 1 мл раствора Cd(NO₃)₂ в концентрации 10 или 20 мМ. В контрольные пробирки добавляли 1 мл дистиллированной воды. В первом варианте эксперимента нематод инкубировали в растворе нитрата кадмия в течение двух часов при 22°C, отмывали их 10 мл 85 мМ NaCl и рассаживали поодиночке в пробирки с 1мл NG буфера с добавлением левамизола в концентрации 2, 4 и 8 мкМ. Во втором варианте эксперимента *C. elegans* после 30-минутной инкубации с нитратом кадмия отмывали 10 мл 85 мМ NaCl, переносили в чашки Петри со средой выращивания нематод и *E. coli* OP50 и инкубировали при 22°C. Через 24 часа нематод отмывали как описано выше и рассаживали по одной особи в пробирки с 1 мл NG буфера, куда добавляли левамизол. В качестве критерия токсического действия Cd(NO₃)₂ на организм *C. elegans* использовали потерю нематодами способности поддерживать плавание в течение 10 секунд после механического стимула. Плавание нематод фиксировали с использованием стереоскопического микроскопа SMZ-05. Эксперименты проводили в пяти повторностях с использованием 40 нематод в каждом варианте. Статистическую обработку результатов проводили с использованием углового преобразования Фишера ϕ^* .

Известно, что нервная система является самой чувствительной мишенью действия токсикантов на организмы беспозвоночных. Нервная система *C.*

C. elegans состоит из 302 нейронов, две трети которых являются холинергическими. В реализации моторной программы плавания *C. elegans* принимают участие как холинергические нейроны, так и нейроны, секретирующие γ -аминомасляную кислоту (ГАМК-ергические) [13]. Ранее нами было показано, что $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ в концентрации до 120 мкМ не оказывает негативного влияния на поведение нематод, но усиливает токсическое действие агониста никотиновых рецепторов ацетилхолина (н-холинорецепторов) левамизола и ингибитора ацетилхолинэстеразы алдикарба [1–3]. Для выяснения вопроса о том, как долго сохраняются изменения в нервной системе, вызванные кратковременным действием $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ мы провели эксперименты, в которых исследовали чувствительность плавания *C. elegans* к левамизолу после кратковременной экспозиции нематод к ионам кадмия.

Двухчасовая инкубация в среде без $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ не изменяла чувствительность *C. elegans* к левамизолу в концентрации 2 и 4 мкМ в течение 60 мин. В этот период все нематоды сохраняли способность к плаванию, индуцированному механическим стимулом. Увеличение времени экспозиции к левамизолу до 120 минут приводило к незначительному снижению доли нематод, сохранивших способность к плаванию (Табл. 1). В условиях этого эксперимента левамизол в концентрации 8 мкМ приводил к снижению доли нематод, сохранивших способность к плаванию, до 97,5 и 75% через 30 и 120 мин соответственно (табл. 1).

Предварительная двухчасовая инкубация с 10 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ существенно повышала чувствительность *C. elegans* к левамизолу. Уже через 30 мин инкубации в среде с 2, 4 и 8 мкМ левамизола доля нематод, сохранивших способность к плаванию, снижалась до 75, 65 и 47,5% соответственно. Через 120 мин доля нематод, способных к плаванию, снижалась до 15–27,5% (Табл. 1). Преинкубация в среде с 20 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ еще сильнее повышала чувствительность *C. elegans* к левамизолу. Доля нематод, сохранивших способность к плаванию,

снижалась в среде с левамизолом по сравнению с контролем в два раза через 30 мин и в 8–10 раз через 120 мин (Табл. 1).

Таблица 1

Чувствительность *Caenorhabditis elegans* к левамизолу
после двухчасовой экспозиции нематод к $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$

Условия эксперимента	Доля нематод сохранивших способность к плаванию			
	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
	10 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$			
Левамизол 2 мкМ	75,0±6,8	57,5±7,8	42,5±7,8	27,5±7,8
Левамизол 4 мкМ	65,0±7,5	45,0±7,9	25,0±6,8	17,5±6,0
Левамизол 8 мкМ	47,5±7,9	35,0±7,5	22,5±6,6	15,0±5,6
	20 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$			
Левамизол 2 мкМ	52,5±7,9	37,5±7,6	22,5±6,6	12,5±5,2
Левамизол 4 мкМ	40,0±7,7	30,0±7,2	25,0±6,8	10,0±4,7
Левамизол 8 мкМ	40,6±8,6	31,3±8,2	25,0±7,6	9,4±5,2
	Без кадмия			
Левамизол 2 мкМ	100	100	95,0±3,4	92,5±4,2
Левамизол 4 мкМ	100	100	100	100
Левамизол 8 мкМ	97,5±2,5	92,5±4,2	87,5±5,2	75,0±6,8

Таблица 2

Чувствительность *Caenorhabditis elegans* к левамизолу
после 30-минутной экспозиции нематод к $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$
с последующим восстановлением в течение 24 часов

Условия эксперимента	Доля нематод сохранивших способность к плаванию			
	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
	10 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$			
Левамизол 2 мкМ	100	97,9±2,0	91,7±3,9	81,3±5,6
Левамизол 4 мкМ	100	95,8±2,9	87,5±4,8	77,1±6,1
Левамизол 8 мкМ	100	77,5±6,0	62,5±6,9	40,0±7,1
	20 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$			
Левамизол 2 мкМ	83,3±5,4	72,9±6,4	68,7±6,7	58,3±7,1
Левамизол 4 мкМ	77,1±6,1	64,6±6,9	60,4±7,1	43,8±7,2
Левамизол 8 мкМ	43,8±7,2	28,1±6,5	21,9±5,9	9,4±4,2
	Без кадмия			
Левамизол 2 мкМ	100	100	100	100

Левамизол 4 мкМ	100	100	100	100
Левамизол 8 мкМ	100	100	100	100

30-минутная инкубация в среде с $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ также приводила к повышению чувствительности *C. elegans* к левамизолу, которое сохранялось в течение 24 часов. Как показано в Табл. 2, инкубация в среде с 10 мМ нитрата кадмия с последующим восстановлением в течение 24 часов приводила к снижению доли нематод, сохранивших способность к плаванию, через 60–120 мин инкубации в среде с левамизолом. После предварительной 30-минутной инкубации в среде с 20 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ и восстановления в течение 24 часов нарушения плавания нематод отмечались уже через 30 мин экспозиции к левамизолу. Доля нематод, сохранивших способность к плаванию, в этом случае была ниже, чем после экспозиции к 10 мМ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Инкубация в среде без нитрата кадмия не оказывала влияния на чувствительность моторной программы плавания нематод к левамизолу после 24-часового восстановления (табл. 2).

Ионы Cd^{2+} вызывают у *C. elegans* адаптивную реакцию избегания сред с высоким содержанием этих ионов в результате активации полимодальных ноцицептивных нейронов ADL, ASE и ASH [16]. Сигналы, поступающие из ноцицептивных нейронов, потенциально могут оказывать влияние на холинергическую трансмиссию в синапсах между нейронами или между моторными нейронами и мышцами тела для увеличения скорости избегания сред с тяжелыми металлами. Свинец, кадмий, железо и медь могут изменять активность ацетилхолинэстеразы. Экспозиция *Danio rerio* к хлориду кадмия в течение 30 мин снижала активность ацетилхолинэстеразы на 20 и на 100% при концентрации CdCl_2 0,01 и 20 мМ соответственно [10]. Ацетат кадмия в концентрации 200 мг/л, наоборот, повышал активность ацетилхолинэстеразы в пищеварительной железе коричневой мидии *Perna perna* [5]. У крыс кадмий повышает чувствительность центральной нервной системы к серотонину и подавляет секрецию ацетилхолина [15].

Большинство тяжелых металлов оказывают негативное действие на нервную систему. В первую очередь они изменяют функции холинергической системы, поскольку ацетилхолин является наиболее распространенным нейромедиатором. Токсическое действие тяжелых металлов проявляется и в нарушении дофаминергической, серотонинергической и ГАМК-ергической синаптической трансмиссии [11]. Клиническая картина хронического отравления кадмием сходна с последствиями нарушений метаболизма таких нейротрансмиттеров как серотонин и γ -аминомасляная кислота (ГАМК) [11].

Поэтому возможным объяснением выявленного нами повышения чувствительности плавания *C. elegans* к левамизолу после кратковременного действия $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ может быть изменение нитратом кадмия функций холинергических и ГАМК-ергических нейронов в системе нейронов, участвующей в реализации моторной программы плавания нематод [13]. Для проверки этого объяснения необходимы дополнительные исследования.

Список литературы

1. Егорова А.В. Нейротоксичность тяжелых металлов для почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* / А.В. Егорова, Т.М. Гайнутдинов, Т.Б. Калининкова, М.Х. Гайнутдинов // Научное обозрение. – 2019. – №3. – С. 17–21.

2. Егорова А.В. Сенситизация никотиновых рецепторов ацетилхолина почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* Маурас ионами Cu^{2+} и Cd^{2+} / А.В. Егорова, Т.Б. Калининкова, Р.Р. Колсанова, М.Х. Гайнутдинов, Р.Р. Шагидуллин // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2019. – №3. – С. 19–24.

3. Егорова А.В. Токсическое действие меди, кадмия и свинца на свободноживущих почвенных нематод *Caenorhabditis elegans* и *Caenorhabditis briggsae* / А.В. Егорова, Т.Б. Калининкова, Р.Р. Шагидуллин // Токсикологический вестник. – 2021. – №1. – С. 43–46.

4. Avila D., Helmcke K., Aschner M. The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology // *Human. Exp. Toxicol.* 2012. Vol. 31. P. 236–243.

5. Bairy A.C.D., de Medeiros M.H.G., Mascio P.D., de Almeida E.A. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity on the *Perna perna* mussel's digestive gland // *Revista Biotemas.* 2006. Vol. 19. P. 35–39.

6. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* // *Genetics.* 1974. Vol. 77. P. 71–94.

7. Chen P., Martinez-Finley E.J., Bornhorst J., Chakraborty S., Aschner M. Metal-induced neurodegeneration in *C. elegans* // *Front. Aging Neurosci.* 2013. Vol. 5. Article 18. P. 1–11.

8. Choi J. *Caenorhabditis elegans* as a biological model for multilevel biomarker analysis in environmental toxicology and risk assessment // *Toxicol. Res.* 2008. Vol. 24. P. 235–243.

9. de Lima D., Roque G.M., de Almeida E.A. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*) // *Marine Environ. Res.* 2013. Vol. 91. P. 45–51.

10. Gupta V.K., Singh S., Agrawal A., Siddiqi N.J., Sharma B. Phytochemicals mediated remediation of neurotoxicity induced by heavy metals // *Biochem. Res. Int.* 2015. Article 534769. P. 1–9.

11. Kim R.-Y., Yoon J.-K., Kim T.-S., Yang J.E., Owens G., Kim K.-R. Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation – a critical review // *Environ. Geochem. Health.* 2015. Vol. 37. P. 1041–1061.

12. Sambongi Y., Nagae T., Liu Y., Yoshimizu T., Takeda 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.

13. Sharma B., Singh S., Siddiqi N.J. Biomedical implication of heavy metals induced imbalances in redox systems // *BioMed. Res. Int.* 2014. Vol. 2014. Article 640754. P. 1–26.

14. Wang. Bo, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effects // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013. Vol. 2013. Article 898034. P. 1–12.

15. Zhang Y., Ye B., Wang D. Effects of metal exposure on associative learning behavior in nematode *Caenorhabditis elegans* // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2010. V. 59. P. 129–136.