

# ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 574.24+615.916

DOI: 10.36946/0869-7922-2021-1-43-46.

## ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕДИ, КАДМИЯ И СВИНЦА НА СВОБОДНОЖИВУЩИХ ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД *CAENORHABDITIS ELEGANS* И *CAENORHABDITIS BRIGGSAE*

А.В. Егорова,  
Т.Б. Калининкова,  
Р.Р. Шагидуллин

Институт проблем экологии и  
недропользования Академии  
наук Республики Татарстан  
(обособленное подразделение  
ГНБУ «Академия наук Республики  
Татарстан»), 420087, г. Казань,  
Российская Федерация

**Т**яжелые металлы являются одними из самых распространенных загрязнителей окружающей среды. Целью работы явилась проверка гипотезы, предполагающей, что одним из механизмов токсического действия меди, свинца и кадмия на организмы беспозвоночных является адаптивная активация холинергической синаптической трансмиссии. В экспериментах с двумя видами свободноживущих почвенных нематод – *Caenorhabditis elegans* и *Caenorhabditis briggsae* – показано, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  в концентрации 60 и 120 мкМ усиливали негативное действие агониста никотиновых рецепторов ацетилхолина левамизола на организм нематод. При совместном действии левамизола и тяжелых металлов на организм *C. elegans* и *C. briggsae* сокращалось среднее время наступления паралича нематод – полной потери способности к плаванию. Результаты работы показывают, что нематоды *C. elegans* и *C. briggsae* могут использоваться в качестве модельных организмов при изучении механизмов токсического действия тяжелых металлов.

**Ключевые слова:** *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, никотиновые рецепторы ацетилхолина, левамизол, токсическое действие меди, свинца и кадмия.

Цит: А.В. Егорова, Т.Б. Калининкова, Р.Р. Шагидуллин. Токсическое действие меди, кадмия и свинца на организмы свободноживущих почвенных нематод *Caenorhabditis elegans* и *Caenorhabditis briggsae*. Токсикологический вестник. 2021; 1:43-46.

**Введение.** Тяжелые металлы являются одними из самых распространенных загрязнителей окружающей среды. Несмотря на большое количество данных об острой и хронической токсичности тяжелых металлов для животных разных таксономических групп и для человека, накопленных к настоящему времени, вопрос о механизмах негативного действия этих токсикантов во многом остается открытым. Общим механизмом токсичности всех тяжелых металлов является их способность вызывать окислительный стресс образованием реактивных форм кислорода в организме [1–2]. Известно также, что тяжелые метал-

лы могут влиять на синаптическую трансмиссию и вызывать нейродегенерацию [1, 3]. Одной из поведенческих реакций животного на действие токсиканта является избегание неблагоприятной среды [4]. Эта реакция хорошо изучена у свободноживущей почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* в настоящее время широко используется в качестве модельного организма для токсикологических исследований и обладает целым рядом преимуществ перед млекопитающими. К этим преимуществам относятся маленькие размеры тела, короткий жизненный цикл, простота и дешевизна культивирования в лаборато-

**Егорова Анастасия Васильевна (Egorova Anastasia Vasil'evna)**, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, [egorovanastassia@gmail.com](mailto:egorovanastassia@gmail.com);  
**Калининкова Татьяна Борисовна (Kalinnikova Tatiana Borisovna)**, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной экологии Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, [tbkalinnikova@gmail.com](mailto:tbkalinnikova@gmail.com);  
**Шагидуллин Рифгат Роальдович (Shagidullin Rifgat Roal'dovich)**, доктор химических наук, член-корреспондент АН РТ, директор Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, [shagidullin@mail.ru](mailto:shagidullin@mail.ru).

рии, простота строения тела и безопасность организма для исследователей [1, 5]. Нервная система у гермафродитов *C. elegans* состоит всего из 302 нейронов, более половины которых являются холинергическими [6]. Целью работы явилась проверка гипотезы, предполагающей, что механизмом токсического действия ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  на организм *C. elegans* является адаптивная активация холинергической синаптической трансмиссии. Дополнительно было проведено сравнительное исследование токсического действия ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  на организм близкородственного *C. elegans* вида почвенных нематод *Caenorhabditis briggsae*.

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты проводили в июне – июле с нематодами *C. elegans* линии дикого типа N2 и *C. briggsae* линии дикого типа AF16, предоставленными *Caenorhabditis Genetics Center*. Нематод выращивали при 22°C в чашках Петри со стандартной средой выращивания (3 г/л NaCl, 17 г/л бактоагар, 2,5 г/л бактопептон, 5 мг/л холестерин, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 25 мМ калийфосфатного буфера (pH = 6.0)) при кормлении *E. coli* OP50 [5]. Эксперименты проводили с нематодами трехдневного возраста, инкубированными индивидуально в 1 мл NG буфера (3 г/л NaCl, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgSO}_4$ , и 25 мМ калийфосфатного буфера (pH=7.0)) [5] с добавлением  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  или  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  при 22°C. В качестве критерия токсического действия ионов  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$  на организм *C. elegans* и *C. briggsae* было выбрано среднее время наступления паралича нематод. Паралич проявлялся в полной потере нематодами способности к плаванию, индуцированному механическим стимулом. Паралич нематод регистрировали с использованием стереоскопического микроскопа SMZ-05. Эксперименты проводили в трех повторностях с использованием 30 нематод в каждом варианте. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Для проверки предположения о том, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  активируют в организме *C. elegans* и *C. briggsae* холинергическую синаптическую трансмиссию нами были проведены эксперименты, в которых исследовалось влияние ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  на чувствительность локомоции нематод к токсическому действию агониста никотиновых рецепторов ацетилхолина (н-холинорецепторов) левамизола. Особенностью организма почвенных нематод рода *Caenorhabditis* является низкая проницаемость кутикулы для веществ из окружающей среды. Поэтому негативный эффект токсикантов на организм *C. elegans* проявляется либо при действии очень высоких их концентраций, либо при длительной (несколько часов) инкубации нематод в среде с токсикантами [1].

В наших экспериментах левамизол в концентрациях 60 и 120 мкМ вызывал паралич нематод. Среднее время наступления паралича при действии левамизола варьировало от 88,2 до 107,6 мин у *C. elegans* и от 60,0 до 73,4 мин у *C. briggsae* (табл. 1–3). Тяжелые металлы в концентрации 60 и 120 мкМ не вызывали паралич нематод в течение 240 мин. Ионы  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  усиливали токсическое действие левамизола на организм *C. elegans* и *C. briggsae*, что проявлялось в уменьшении времени наступления паралича нематод при совместном действии ионов металлов и левамизола (табл. 1–3). Добавление в среду инкубации *C. elegans* с левамизолом ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  снижало время наступления паралича до 65,6–101,2 мин. При совместном действии ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  и левамизола на организм *C. briggsae* паралич нематод проявлялся уже через 33,8–73,4 мин (табл. 1–3).

Одной из основных мишеней токсического действия тяжелых металлов на организм животных является нервная система [1, 3]. Хорошо известно нейротоксическое действие тяжелых металлов и их влияние на когнитивные функции нервной системы [1, 3, 7]. Тяжелые металлы могут оказывать прямое действие на ионные каналы в мембранах

Таблица 1

**Влияние свинца на чувствительность *C. elegans* и *C. briggsae* к левамизолу**

	Среднее время наступления паралича нематод, мин			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>		<i>Caenorhabditis briggsae</i>	
	Левамизол, мкМ		Левамизол, мкМ	
	60	120	60	120
Без металлов	95,3±1,7	95,2±1,6	62,8±1,1	60,0±1,9
60 мкМ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	96,8±1,9	87,8±1,8**	54,3±1,7***	44,1±0,9***
120 мкМ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	88,7±1,9**	65,6±1,2***	49,7±0,8***	33,8±0,7***

Примечание: \*\*\* – достоверность разницы между контролем (среда без свинца) и опытом (среда с добавлением свинца). \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

Таблица 2

Влияние меди на чувствительность *C. elegans* и *C. briggsae* к левамизолу

	Среднее время наступления паралича нематод, мин			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>		<i>Caenorhabditis briggsae</i>	
	Левамизол, мкМ		Левамизол, мкМ	
	60	120	60	120
Без металлов	107,6±2,4	95,2±1,8	87,1±1,3	72,2±1,4
60 мкМ Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	101,2±2,2**	92,3±1,6**	65,6±1,7***	64,7±1,2***
120 мкМ Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	99,5±2,9**	90,0±1,4***	73,1±1,6***	45,9±0,6***

Примечание: \*\*\* - достоверность разницы между контролем (среда без меди) и опытом (среда с добавлением меди).  
\*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$

Таблица 3

Влияние кадмия на чувствительность *C. elegans* и *C. briggsae* к левамизолу

	Среднее время наступления паралича нематод, мин			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>		<i>Caenorhabditis briggsae</i>	
	Левамизол, мкМ		Левамизол, мкМ	
	60	120	60	120
Без металлов	97,7±2,8	88,2±2,3	73,4±2,8	60,6±1,8
60 мкМ Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	78,4±1,9***	72,5±2,7***	61,5±2,1***	50,3±1,4***
120 мкМ Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	84,3±2,2***	74,2±2,6***	55,3±1,7***	48,0±0,9***

Примечание: \*\*\* - достоверность разницы между контролем (среда без кадмия) и опытом (среда с добавлением кадмия).  
\*\*\* -  $p < 0,001$

нейронов [8, 9]. Кроме этого тяжелые металлы вызывают образование реактивных форм кислорода, вызывающих нейродегенерацию [1, 2]. *C. elegans* является удобным модельным организмом для изучения дегенерации нейронов при длительном действии тяжелых металлов на организм. При этом нельзя исключать острое токсическое действие тяжелых металлов на организм *C. elegans*, приводящее к изменению функций нейронов.

Важной функцией нервной системы является восприятие информации об изменениях окружающей среды и формирование адаптивных реакций организма. Ключевую роль в регуляции функций организма *C. elegans* играет холинергическая система, поскольку более половины из 302 нейронов этой нематоды используют ацетилхолин в качестве нейромедиатора [6]. Выявленная в этой работе активация холинергической системы *C. elegans* и *C. briggsae* ионами Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> и Pb<sup>2+</sup> может быть как следствием токсического действия этих ионов на холинергические нейроны, так и адаптивной реакцией организма на появление токсикантов в окружающей среде. Второе из этих объяснений более вероятно, поскольку в наших экспериментах ионы Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> и Pb<sup>2+</sup> не вызывали паралича нема-

тод даже после четырехчасовой инкубации в среде, содержащей 60 или 120 мкМ этих ионов. Это свидетельствует об отсутствии острой токсичности ионов Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> и Pb<sup>2+</sup> для *C. elegans* и *C. briggsae*.

Принято считать, что активация холинергической синаптической трансмиссии является механизмом увеличения скорости локомоции для избегания потенциально опасных условий среды. Известно, что избегание нематодами сред с высоким содержанием ионов Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> и Pb<sup>2+</sup> индуцируется этими ионами не в результате их проникновения во внутреннюю среду организма, а вследствие активации ноцицептивных сенсорных нейронов [4]. Локомоция нематод регулируется сложной сетью нейронов, включающей в себя командные нейроны, холинергические интернейроны AVA, AVB, AVD и PVC, холинергические моторные нейроны и ГАМК-ергические моторные нейроны, которые иннервируются холинергическими моторными нейронами [7, 10]. Известно, что у *C. elegans* адаптивная реакция избегания сред с высоким содержанием ионов Cu<sup>2+</sup> и Cd<sup>2+</sup> индуцируется активацией полимодальных ноцицептивных нейронов ADL, ASE и ASH [9, 11]. Сигналы из этих нейронов могут оказывать влияние на холинер-

гическую трансмиссию в системе нейронов, регулирующей плавание нематод. Следовательно, одним из возможных механизмов нарушения ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  локомоции нематод, включая полное отсутствие способности к плаванию, у *C. elegans* и *C. briggsae* может быть гиперактивация н-холинорецепторов в системе нейронов, регулирующей плавание, сигналами из ноцицептивных нейронов, активируемых тяжелыми металлами.

Ранее нами была показана более высокая, по сравнению с *C. elegans*, чувствительность нематоды *C. briggsae* к действию агонистов н-холинорецепторов [12]. Исходя из этого можно было предположить более сильное влияние ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  на токсичность левамизола для *C. briggsae*. Результаты экспериментов, в которых исследовалось влияние ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  на чувствительность *C. briggsae* к токсическому действию левамизола, подтвердили эту гипотезу. При добавлении тяжелых металлов в среду инкубации нематод с левамизолом время наступления паралича у

*C. elegans* уменьшается на 9–14% по сравнению со средней без ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ , а время наступления паралича *C. briggsae* снижается более чем на 20% (табл. 1–3). Это позволяет сделать вывод о том, что холинергическая система *C. briggsae* более чувствительна не только к действию агонистов н-холинорецепторов, но и к действию ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ .

**Заключение.** Результаты наших экспериментов позволяют сделать вывод о том, что экспозиция *C. elegans* и *C. briggsae* к ионам  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  в концентрации 60 и 120 мкМ повышает чувствительность моторной программы плавания нематод, индуцированного механическим стимулом, к гиперактивации н-холинорецепторов левамизолом.

Результаты нашей работы показывают, что почвенные нематоды *C. elegans* и *C. briggsae* могут использоваться в качестве модельных организмов для изучения механизмов токсического действия тяжелых металлов на организмы беспозвоночных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Chen P., Martinez-Finley E.J., Bomhorst J., Chakraborty S., Aschner M. Metal-induced neurodegeneration in *C. elegans*. *Front. Aging Neurosci.* 2013; 5: 1–11.
2. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12: 1161–1208.
3. Sanders T., Liu Y., Buchner V., Tchounwou P.B. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: A review. *Rev. Environ. Health.* 2009; 24: 15–45.
4. Sambongi Y., Nagae T., Liu Y., Yoshimizu T., Takeda K., Wada Y. et al. Sensing of cadmium and copper ions by externally exposed ADL, ASE, and ASH neurons elicits avoidance response in *Caenorhabditis elegans*. *NeuroReport.* 1999; 10: 753–757.
5. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974; 77: 71–94.
6. Pereira L., Kratsios P., Serrano-Saiz E., Sheftel H., Mayo A.E., Hall D.H. et al. A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *eLife.* 2015; 4: e12432.
7. Wang Bo, Du Y. Cadmium and its neurotoxic effect. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013; 2013: 1–12.
8. 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; 102 (Suppl. 3): 153–158.
9. Zhang Y., Ye B., Wang D. Effects of metal exposure on associative learning behavior in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2010; 59: 129–136.
10. Leung M.C.K., Williams P.L., Benedetto A., Au K., Helmcke K.J., Aschner M. et al. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.* 2008; 106: 5–28.
11. Hilliard M.A., Apicella A.J., Kerr R., Suzuki H., Bazzicalupo P., Schafer W.R. In vivo imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents. *The EMBO J.* 2005; 24: 63–72.
12. 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; 62: 37–49.

A.V. Egorova, T.B. Kalinnikova, R.R. Shagidullin

## TOXIC ACTION OF COPPER, CADMIUM AND LEAD ON FREE-LIVING SOIL NEMATODES CAENORHABDITIS ELEGANS AND CAENORHABDITIS BRIGGSAE

Research Institute for Problems of Ecology and Mineral Wealth Use of Tatarstan Academy of Sciences, 420087, Kazan, Russian Federation

Heavy metals are one of the most common pollutants in environment. The aim of this work was to test the hypothesis assuming that one of mechanisms of toxic action of copper, cadmium and lead on invertebrates' organisms is adaptive activation of cholinergic synaptic transmission. In experiments with two free-living soil nematodes, namely *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*, it has been shown that  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  ions at concentrations of 60 and 120  $\mu\text{M}$  enhanced the negative effects of the nicotinic acetylcholine receptors agonist levamisole on the nematodes' organisms. Under combined action of levamisole and heavy metals on organisms of *C. elegans* and *C. briggsae* the mean time of nematodes paralysis (complete loss of the ability to swim) was reduced. The results of this work show that nematodes *C. elegans* and *C. briggsae* can be used as model organisms to study mechanisms of toxic action of heavy metals.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, nicotinic acetylcholine receptors, levamisole, toxic action of copper, lead and cadmium.

Quote: A.V. Egorova, T.B. Kalinnikova, R.R. Shagidullin. Toxic action of copper, cadmium and lead on free-living soil nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Toxicological Review.* 2021; 1:43–46.

Переработанный материал поступил в редакцию 04.02.2021 г.