УДК 574.24/ 57.044

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАЛЛ-ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

[1,2]Карпухина О.В., [1]Гумаргалиева К.З., [2]Иноземцев А.Н.

[1]Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва;
[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: olgakarp@newmail.ru

Проведено исследование токсичности солей кадмия и свинца как наиболее опасных и распространенных экотоксикантов. Влияние солей тяжелых металлов и перекиси водорода – индукторов перекисного окисления липидов – изучали на культуре клеток Paramecium caudatum. Установлено, что эти вещества вызывают дозао-зависимое и время-зависимое снижение численности популяции парамеций. Эксперименты показали, что реакции одноклеточных гидробионтов эффективны для получения первичной информации о цитотоксичности солей тяжелых металлов, перекисей и т.п. На фоне действия аскорбиновой кислоты и соединения с мембраностабилизирующим антиоксидантным действием – пирацетама, толерантность клеток к тяжёлым металлам существенно возрастает, что подтверждает важную роль антиоксидантов в процессах свободнорадикального окисления в клетке организма. Изучение индуцированного перекисного окисления липидов и активности антиоксидантных соединений в водных организмах как биомаркеров загрязнения окружающей среды имеют большое диагностическое значение.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, окислительный стресс, антиоксиданты, биомаркеры, инфузории Paramecium caudatum

ANALISIS OF METAL-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN UNICELLULAR ORGANIMS

[1,2]Karpukhina O.V., [1]Gumargalieva K.Z., [2]Inozemtsev A.N.

[1]N.N. Semenov Institute of Chemical Physics, Moscow;
[2]M.V. Lomonosov MSU, Moscow, e-mail: olgakarp@newmail.ru

A study of the toxicity of cadmium and lead salts, as the most dangerous and common toxicants. Effect of heavy metal salts and hydrogen peroxide – lipid peroxidation inducers – was studied on the culture of Paramecium caudatum cells. Found that these substances cause a dose-dependent and time-dependent decrease in population paramecium. The experiments performed have shown that responses of unicellular aquatic organisms are effective for obtaining primary information on cytotoxicity of heavy metal salts, peroxides, etc. Ascorbic acid and membrane-stabilizing antioxidant substance – piracetam significantly increase cell non responsiveness to heavy metals that proves the important role of antioxidant compounds in free-radical oxidation processes in the organism cell. The study of induced lipid peroxidation and antioxidant activity in aquatic organisms as biomarkers of environmental pollution has been proven to have a high diagnostic value.

Keywords*:* **heavy metals, oxidative stress, antioxidants, biomarkers, Paramecium caudatum**

Тяжёлые металлы – широко распространённые экотоксиканты, потенциально опасные для всех живых организмов. Одной из причин токсических эффектов тяжёлых металлов является индуцированный ими окислительный стресс – процесс повреждения клеток организма в результате окислительных реакций [9]. Ионы свинца, кадмия, кобальта и других тяжёлых металлов способны инициировать генерацию избыточного количества активных форм кислорода (АФК) [5–6, 9]. Повышенный уровень АФК в клетке способствует запуску цепных реакций окислительной деградации биомолекул, в частности, инициируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран, что способствует нарушению их структуры и повышению проницаемости. В клетке существуют специализированные ферментные и неферментные антиоксидантные системы защиты от свободных радикалов [5]. Определение веществ, чье действие направлено на нормализацию метаболических процессов, на блокаду патологических свободнорадикальных процессов, является важным звеном в исследованиях механизмов адаптации организмов к воздействию токсикантов. Хорошо известно, что аскорбиновая кислота способна реагировать с супероксидным и гидроксильным радикалами и тем самым снижать их концентрацию в клетке, препятствуя развитию оксидантного стресса [4]. В частности, в опытах на крысах аскорбиновая кислота оказывала протекторное антиоксидантное действие при формировании условных реакций в условиях токсического действия солей тяжёлых металлов (Co, Pb и Cd) и нейротропного препарата пирацетама [1–3]. Было установлено, что каталитическое действие солей тяжелых металлов влияет на структурные характеристики пирацетама, и, как следствие, искажает его лечебный эффект [3, 8]. In vitro показано, что аскорбиновая кислота предотвращает взаимодействие солей тяжёлых металлов со структурой лекарственного препарата [2].

В основе комплекса ответных реакций организма, имеющих защитный характер

и обеспечивающих адаптацию к меняющимся условиям в ответ на воздействие различных неблагоприятных факторов, в том числе и токсических агентов, лежат единые фундаментальные механизмы. Одноклеточные инфузории имеют относительно их размеров большую поверхность соприкосновения с внешней средой, сразу же вступают в контакт с токсикантом, реагируя на химическое действие целым комплексом биологических, физиологических и биохимических изменений: хемотаксисом, реверсией ресничной активности, скоростью размножения. Многие гидробионты к тому же обладают фильтрационным типом питания, что повышает вероятность накопления ими веществ-токсикантов и повышает эффект их воздействия на организм.

Цель данной работы – исследование влияния токсических веществ – индукторов оксидантного стресса и защитного действия антиоксидантных соединений на клетку – организм *Paramecium caudatum*.

Материалы и методы исследования

Культуру клеток *Paramecium caudatum* (дикий штамм) выращивали на среде Лозина–Лозинского, с добавлением дрожжей питательной среды, содержащей дрожжи *Saccharomyces cerevisiae.* Для индукции окислительного стресса использовались соли тяжёлых металлов: хлорид кадмия, ацетат свинца и для сравнения перекись водорода (H2O2). Чувствительность инфузорий к токсичным веществам определяли по времени их гибели, которую фиксировали по прекращению движения простейших, часто сопровождающемуся деформацией и лизисом клетки. Время экспозиции составило 2 часа. Число клеток в 10 мл среды, содержащей интактную культуру инфузорий (без индукции окислительного стресса), служило контролем во всех опытах. Подсчет общего количества клеток в 10 мл среды, содержащей инфузории, определяли в счетной камере Горяева. Клетки, взятые в стационарной фазе роста, инкубировались при температуре 20 ± 2 °C в среде с добавлением химического вещества в течение 15 суток (хронический опыт). Действие токсических веществ исследовалось в нескольких концентрациях (0,05; 0,025; 0,005; 0,0025; 0,00125 мг/л); влияние веществ с антиоксидантными свойствами (аскорбиновая кислота, пирацетам) исследовались при концентрациях 1, 10, 50 мкМ и 1 мМ.

Результаты исследования и их обсуждение

В проведённых экспериментах установлено, что хлорид кадмия и ацетат свинца (0,05 мг/л) в первые 30 мин инкубирования вызывали мгновенную остановку движения инфузорий. Внесение в среду с инфузориями перекиси водорода (0,05 мг/л) привело к тому, что в первую минуту опыта число особей уменьшилось в 3 раза по сравнению с контролем. Микроскопические исследования показали многочисленные грубые морфологические изменения клеток инфузорий от воздействия H2O2, в том числе структурные нарушения мембран и цилиарные аномалии («вакуолизация» клеточной стенки), которые приводили к гибели микроорганизма. Снижение численности опытных клеток в результате деструктивной мембранной патологии свидетельствовали об интенсификации процессов свободно-радикального окисления. 100 % смертность инфузорий от действия перекиси водорода отмечено к 60 мин опыта. В контроле число особей не изменяется на протяжении всего опыта (рис. 1). Токсическое действие солей тяжёлых металлов было менее выраженным.

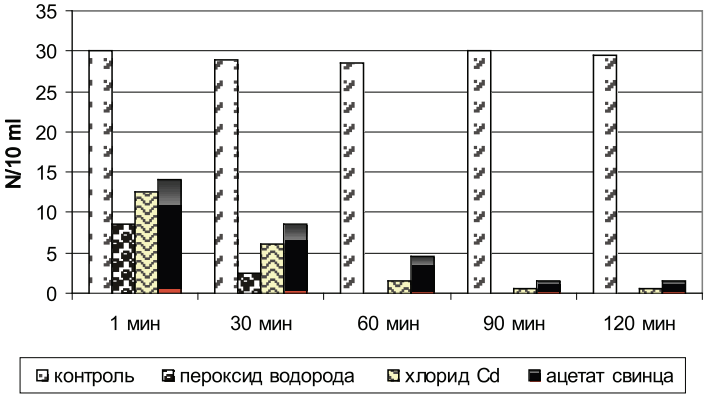

Рис. 1. Токсическое действие химических веществ на культуру клеток Paramecium caudatum (по абсциссе – длительность опыта; по ординате: N – число особей в 10 мл опытной среды)

Задачей следующего опыта являлось изучение влияния перекиси водорода и солей тяжёлых металлов на воспроизведение клеток парамеций. Поскольку при концентрациях 0,05 и 0,025 мг/л отмечалась гибель культуры клеток, для исследования воспроизведения клеток концентрации токсических веществ были уменьшены в 20 раз. При этой концентрации в первые сутки опыта (рис. 2) выживала значительная часть

клеток. При инкубировании клеток в течение 15 суток установлено, что наиболее токсичными оказались среды с содержанием пероксида водорода и хлорида кадмия, в которых инфузории не воспроизвели даже первого поколения (рис. 2).

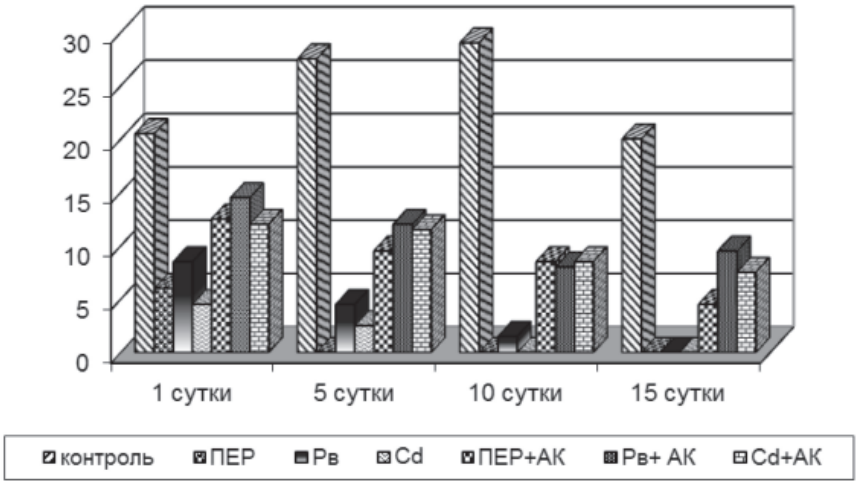

Рис. 2. Динамика роста популяции Paramecium caudatum в среде с содержанием различных химических веществ: контроль – физ. раствор; ПЕР – пероксид водорода; Рв – диацетат свинца; АК – аскорбиновая кислота

Добавление аскорбиновой кислоты (1 мМ) в среду с клетками, подвергшимися действию перекиси водорода, увеличило в первые сутки число особей почти вдвое. К 5 суткам инфузории, которые инкубировались в среде с перекисью водорода, погибли. В то же время аскорбиновая кислота предотвратила гибель культуры клеток, что отмечалось во все опытные дни (рис. 2, 3).

В среде с добавлением соли тяжёлого металла 100 % смертность культуры зафиксирована на 15 сутки.

При добавлении аскорбиновой кислоты в культуре клеток, ацетата свинца, к 15-м суткам отмечалось незначительное снижение числа особей. Таким образом, аскорбиновая кислота проявила аналогичную антиоксидантную активность, что и против перекиси водорода.

Для доказательства эффективности антиоксидантного соединений с механизмом действия, отличным от аскорбиновой кислоты, мы исследовали Paramecium caudatum в среде с добавлением пирацетама – соединения с неспецифической антиоксидантной активностью [3, 7] (рис. 3).

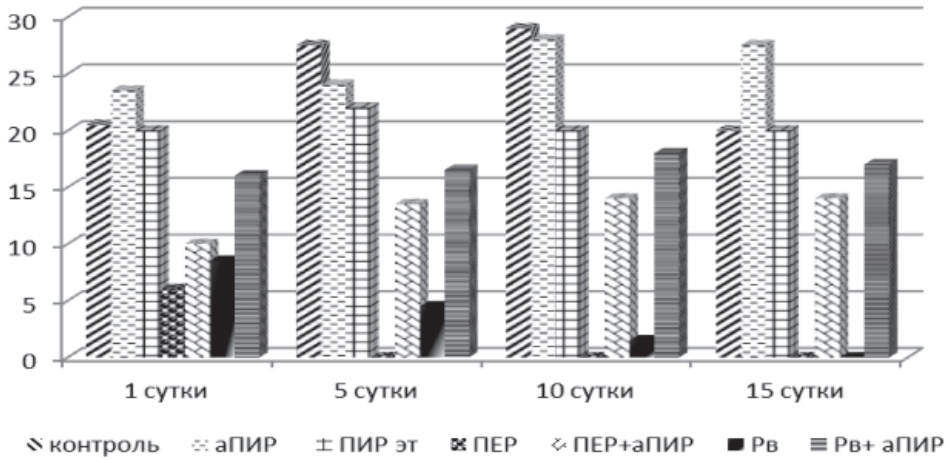

Рис. 3. Динамика роста популяции Paramecium caudatum в среде с содержанием различных химических веществ: контроль – физ. раствор; ПЕР – пероксид водорода; Рв – диацетат свинца; ПИР эт – раствор пирацетама (лекарственная форма); аПИР – раствор структурно-модифицированного пирацетама

В наших опытах мы исследовали эффективность лекарственной формы пирацетама (ПИР эт) и её структурно-модифицированной формы (аПИР). Оба вещества предотвратили гибель клеток инфузорий от действия перекиси водорода и соли тяжёлого металла. Антиоксидантный эффект пирацетама был менее выражен по сравнению с защитным действием аскорбиновой кислоты. Тем не менее к 15-м суткам выживаемость особей при внесении в среду с инфузориями аПИР составила 100 %.

Заключение

Проведённые эксперименты свидетельствуют о высокой чувствительности одноклеточных микроорганизмов к действию таких распространённых экотоксикантов, как соли кадмия и свинца, что позволяет использовать инфузории в биотестах для оценки токсичности сред, содержащих тяжёлые металлы. Как известно, антиоксидантная система организма многокомпонентна, она способна предотвращать образование активных форм кислорода и разрушать как свободные радикалы, так и первичные и вторичные продукты реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ). В данной работе аскорбиновая кислота и структурно-модифицированный нейротропный препарат – пирацетам – оказались эффективными протекторами от возникших под воздействием солей тяжёлых металлов и перекиси водорода процессов ПОЛ у одноклеточных организмов.

Список литературы

1. Бокиева С.Б., Карпухина О.В., Гумаргалиева К.З., Иноземцев А.Н. Комбинированное воздействие тяжёлых металлов и пирацетама нарушает формирование адаптивных реакций. // Изв. Горск. гос. аграр. ун.. – 2012. – Т. 49, № 4-4. – С. 194–200.

2. Карпухина О.В., Гумаргалиева К.З., Бокиева С.Б. и др. Аскорбиновая кислота защищает организм от токсического воздействия кадмия // «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» – СПб.: Изд-во политех. университета, 2011 – Т. 2.– С. 161–163.

3. Карпухина О. В., Гумаргалиева К.З., Бокиева С.Б. и др. Исследование особенностей структурного полиморфизма пирацетама // Вест. Казан. Техн. ун. – 2012. – Т. 15. № 15. – С. 165–168.

4. Davies M.B., Austin J., David A. Partridge D. Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry, Royal Society of Chemistry. London. UK. 1991. 154 p.

5. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage // Curr. Top Med. Chem. – 2001. – Vol. 1, № 6 – P. 529–539.

6. Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress: its possible reversal by chelation therapy // Indian. J. Med. Res. – 2008. – Vol. 128, № 4. – P. 501–523.

7. Gouliaev A.H., Senning A. Piracetam and other structurally related nootropics // Brain Res. Brain Res. Rev. – 1994. – Vol.19, № 2. – P. 180–222

8. Karpukhina O.V., Gumargalieva K.Z., Soloviev A.G., Inozemtsev A.N. Effects of lead diacetate on structure transformation and functional properties of piracetam // J. of Env. Prot. and Ecol. – 2004. – Vol. 5, № 3. – P. 577.

9. Pryor W.A. Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes and Reactions. // Ann. Rev. of Phys. – 1986. – Vol. 48. – P. 657–667.

References

1. Bokieva S. A., Karpukhina O.V., Gumargalieva K.Z.. Combined effects Of Heavy metals and Piracetam destroying the adaptive behavior formation // Pr. Gors. Stat. Univ.of Agrical. 2012. Vol. no. 4 pp. 194–200.

2. Karpukhina O.V., Gumargalieva K.Z., Bokieva S.B et al. Ascorbic acid protects the body from toxic effects of cadmium // «High Technology, basic and applied researches in physiology and medicine» Saint-Petersburg, Russia. 2011. Vol. 2. pp. 161–163.

3. Karpukhina O.V., Gumargalieva K.Z., Bokieva S.B. et al. Investigation of structural polymorthism of piracetam/ //Bull. of Kazan. Stat. Technol. Univ. 2012. Vol 15. no. 15. pp. 165–167.

4. Davies M.B., Austin J., David A. Partridge D. Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry, Royal Society of Chemistry. London. UK. 1991. 154 p.

5. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage // Curr. Top Med. Chem. 2001. Vol.1. no. 6 pp. 529–539.

6. Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress: its possible reversal by chelation therapy // Indian. J. Med. Res. 2008. Vol. 128. no. 4. pp. 501–523.

7. Gouliaev A.H., Senning A. Piracetam and other structurally related nootropics.//Brain Res. Brain Res. Rev. 1994. Vol. 19 no. 2 pp. 180–222.

8. Karpukhina O.V., Gumargalieva K.Z., Soloviev A.G., Inozemtsev A.N. Effects of lead diacetate on structure transformation and functional properties of piracetam // J. of Env. Prot. and Ecol. 2004. Vol. 5 no. 3 pp. 577.

9. Pryor W.A. Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes and Reactions // Ann. Rev. of Phys. 1986. Vol. 48. pp. 657–667.

Рецензенты:

Заиков Г.Е., д.х.н., профессор, руководитель отдела биологической и химической физики полимеров Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва;

Зорина З.А., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией и генетики поведения, биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 04.11.2013.