

РЕГУЛЯЦИЯ ДОФАМИНОМ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛИНИЙ CAENORHABDITIS ELEGANS N2 И CB1112 (CAT-2 (E1112) II) К ТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ НИТРАТА СВИНЦА

DOPAMINE REGULATES SENSITIVITY OF CAENORHABDITIS ELEGANS N2 AND CB1112 (CAT-2 (E1112) II) STRAINS TO TOXIC ACTION OF LEAD NITRATE

A. Egorova
A. Gatiyatullina
T. Kalinnikova

Summary. Toxic action of Pb²⁺ ions on two *C. elegans* strains, namely wild type N2 strain and CB1112 (cat-2 (e1112) II) strain which is lack of endogenous dopamine was investigated. Low sensitivity of cat-2 strain nematodes to toxic action of lead nitrate in the concentration range 0.25–1.0 mM in comparison with such of N2 strain made it possible to assume that the target of negative effects of lead nitrate on *C. elegans* organism is dopaminergic system. The most likely mechanism of disturbances of dopaminergic system functions by Pb²⁺ ions may be a disturbance of dopamine synthesis by dopaminergic neurons. This assumption is verified by the repair of the ability to swimming of N2 strain nematodes under joint action of lead nitrate and dopamine. The absence of therapeutic dopamine effect on locomotion of nematodes of cat-2 strain disturbed by lead nitrate may be associated with specific functioning of neuronal circuit, which regulates *C. elegans* locomotion, in the absence of dopamine.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, lead ions, dopamine, neurotoxicity, behavior.

Егорова Анастасия Васильевна

Младший научный сотрудник, Институт проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, г. Казань
egorovanastassia@gmail.com

Гатиятуллина Алсу Фоатовна

Младший научный сотрудник, Институт проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, г. Казань
gaf9212@gmail.com

Калинникова Татьяна Борисовна

Кандидат биологических наук, зав. лабораторией, Институт проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан, г. Казань
tbkalinnikova@gmail.com

Аннотация. Исследовано токсическое действие ионов Pb²⁺ на *C. elegans* двух линий: линии дикого типа N2 и линии и CB1112 (cat-2 (e1112) II), у которой отсутствует эндогенный дофамин. Низкая, по сравнению с линией N2, чувствительность нематод линии cat-2 к токсическому действию нитрата свинца в концентрации 0.25–1.0 mM позволила предположить, что мишенью негативного действия свинца на организм *C. elegans* является дофаминергическая система. Наиболее вероятным механизмом нарушения функций дофаминергической системы ионами Pb²⁺ может быть нарушение синтеза дофамина дофаминергическими нейронами. В пользу этого предположения свидетельствует восстановление способности нематод линии дикого типа N2 к плаванию при совместном действии нитрата свинца и дофамина. Отсутствие терапевтического действия дофамина на локомоцию нематод линии cat-2, нарушенную нитратом свинца, может быть связано с особенностями функционирования нейронной сети, регулирующей локомоцию, в отсутствие дофамина.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, ионы свинца, дофамин, нейротоксичность, поведение.

Введение

Одним из распространенных загрязнителей окружающей среды является свинец. Токсическое действие свинца на организмы человека и животных во многом определяется его способностью замещать двухвалентные катионы (Ca²⁺, Zn²⁺ и другие) в биологических молекулах [1–3]. Известно, что ионы Pb²⁺ способны вызывать окислительный стресс, нарушать синтез гема и оказывать токсическое действие на нервную систему [3–5]. Нейротоксическое дей-

ствие свинца в настоящее время активно изучается. Свинец нарушает ГАМКергическую, холинергическую и дофаминергическую синаптическую трансмиссию [2, 5]. В концентрации 10 мкг/100 мл крови свинец вызывает нарушения когнитивных и моторных функций у детей и взрослых [5–6]. Токсическое действие ионов Pb²⁺ на нервную систему во многом сходно с действием ионов Mn²⁺. Механизмом нейротоксического марганца является дегенерация дофаминергических нейронов [7–9]. Сходство нарушений функций нервной системы, вызванных свинцом и марганцем, позволяет

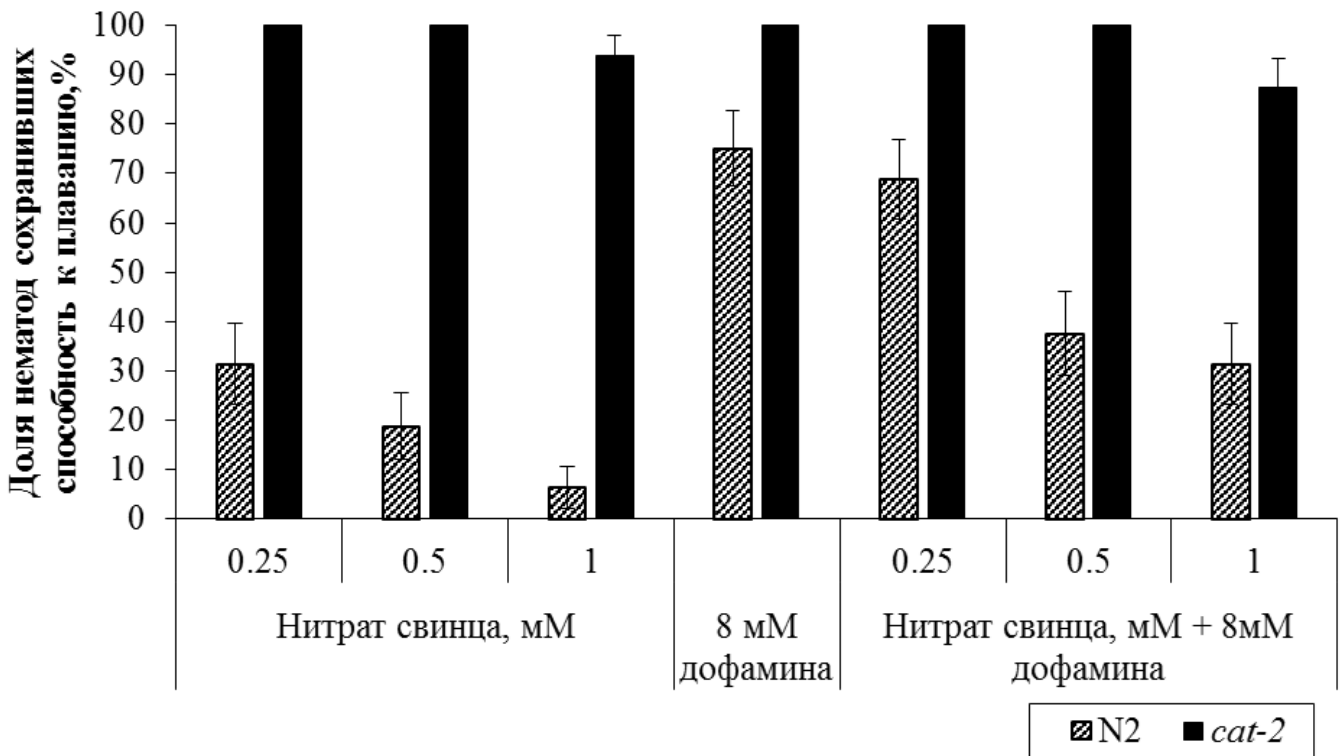


Рис. 1. Доля нематод, сохранивших способность к плаванию после 30-минутной инкубации с нитратом свинца и/или дофамином

предположить, что одним из механизмов нейротоксического действия ионов Pb^{2+} является нарушение функций дофаминергической системы. Целью настоящей работы явилась экспериментальная проверка этой гипотезы с использованием в качестве модельного организма свободноживущей почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* на протяжении нескольких десятилетий используется в биологических, в том числе токсикологических исследованиях благодаря простоте строения тела и удобству выращивания в лаборатории. Нервная система *C. elegans*, состоящая всего из 302 нейронов, хорошо изучена методами молекулярной и клеточной биологии [10–11].

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали молодых половозрелых *Caenorhabditis elegans* двух линий: линии дикого типа N2 и CB1112 (*cat-2 (e1112) II*). Обе линии были получены из *Caenorhabditis Genetics Center*. У нематод линии *cat-2* отсутствует фермент тирозингидроксилаза — ключевой фермент синтеза дофамина [1, 12].

Нематод выращивали при 22 °C в стеклянных чашках Петри диаметром 10 см на стандартной среде выращивания нематод (3 г/л NaCl, 17 г/л бактоагар, 2.5 г/л бак-

топептон, 5 мг/л холестерин, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 25 mM калийфосфатный буфер (pH 6.0)) [10]. Для кормления нематод использовали *E. coli* OP50 [10]. Эксперименты проводили в NG буфере (pH 7.0), состав которого соответствует составу среды выращивания нематод, из которой исключены агар, пептон и холестерин [10]. При подготовке эксперимента нематод переносили с поверхности агара в стеклянную центрифужную пробирку объемом 10 мл и дважды отмывали 10 мл NG буфера от агара, бактерий и экзосометаболитов. В третий раз *C. elegans* отмывали 10 мл 85 mM NaCl.

Все эксперименты проводили при 22 °C с нематодами, инкубированными индивидуально в стеклянных стаканчиках с нитратом свинца, дофамином и NG буфером. Конечный объем среды инкубации — 1 мл. Критерием действия химических веществ служила способность нематод поддерживать спонтанную локомоцию. Поведение нематод фиксировали каждые 30 минут с использованием стереоскопического микроскопа SMZ-05. Эксперименты проводили в четырех повторностях, для каждой концентрации свинца и в контрольном варианте использовали 30 нематод.

Статистическую обработку проводили с использованием углового преобразования Фишера ϕ^* .

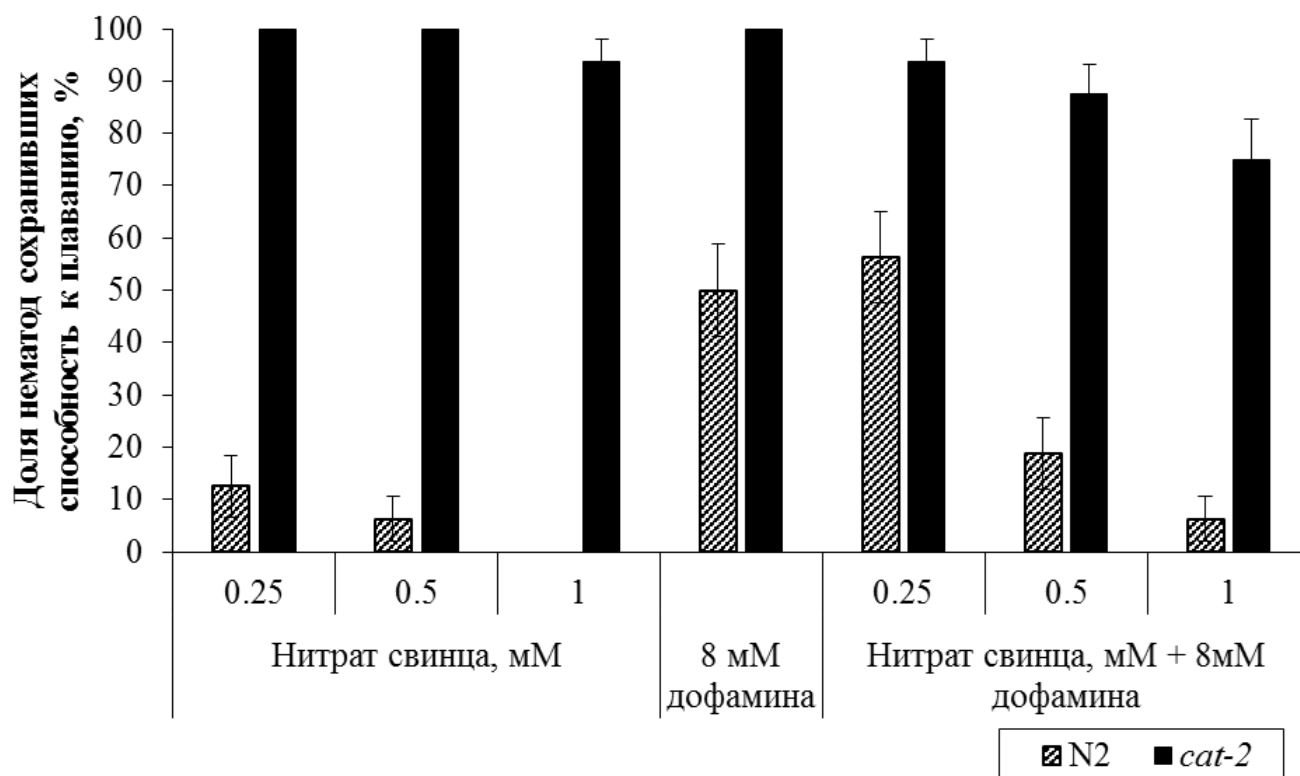


Рис. 2. Доля нематод, сохранивших способность к плаванию после 60-минутной инкубации с нитратом свинца и/или дофамином

Результаты и обсуждение

Для выяснения возможности участия дофаминергической системы в модуляции чувствительности к ионам свинца были проведены эксперименты по совместному действию дофамина и $Pb(NO_3)_2$ на *C. elegans* двух линий — линии дикого типа N2 и линии CB1112 (*cat-2(e1112) II*) с мутацией гена *cat-2*, кодирующего ключевой фермент синтеза дофамина тирозингидроксилазу.

Введение в среду инкубации дофамина в концентрации 8 мМ уже через 30 минут приводило к потере способности к плаванию у 25% нематод линии N2 (рис. 1). При увеличении времени экспозиции до 120 минут спонтанная локомоция сохранялась у 37.5% *C. elegans* этой линии (рис. 4). Нитрат свинца в концентрации 0.25, 0.5 и 1 мМ вызывал снижение доли нематод, сохранивших спонтанную локомоцию. Негативное действие $Pb(NO_3)_2$ на поведение нематод усиливалось при увеличении концентрации и времени экспозиции к нему (рис. 1–4). Добавление в среду инкубации 8 мМ дофамина ослабляло негативное действие нитрата свинца на спонтанную локомоцию нематод линии N2. Это проявлялось в увеличении доли нематод, способных к плаванию (рис. 1–4).

C. elegans линии *cat-2* были менее чувствительны как к дофамину, так и к нитрату свинца. При инкубации в среде с 8 мМ дофамина все нематоды этой линии сохраняли спонтанную локомоцию в течение 60 минут. В последующие 60 минут доля нематод, сохранивших способность к плаванию, уменьшилась незначительно (рис. 1–4). $Pb(NO_3)_2$ в концентрации 0.25 мМ не оказывал токсического действия на поведение *C. elegans* линии *cat-2*. Нитрат свинца в концентрации 0.5 мМ вызывал потерю способности к плаванию у части нематод этой линии только после 90-минутной экспозиции к нему. В концентрации 1 мМ нитрат свинца не вызывал значительных нарушений поведения в первые 60 минут экспозиции; достоверное уменьшение доли нематод, сохранивших способность к плаванию, наблюдалось через 90 и 120 минут. Добавление в среду инкубации 8 мМ дофамина не оказывало терапевтического действия на поведение *C. elegans* линии *cat-2* (рис. 1–4).

Ионы свинца оказывают негативное действие на локомоцию, развитие, продолжительность жизни и способность к обучению *C. elegans*. Ионы свинца могут вызывать нарушения локомоции нематод и их способность к термотаксису [11, 13–14]. В этой работе показана низкая, по сравнению с *C. elegans* линии N2, чувствительность спонтанной локомоции нематод

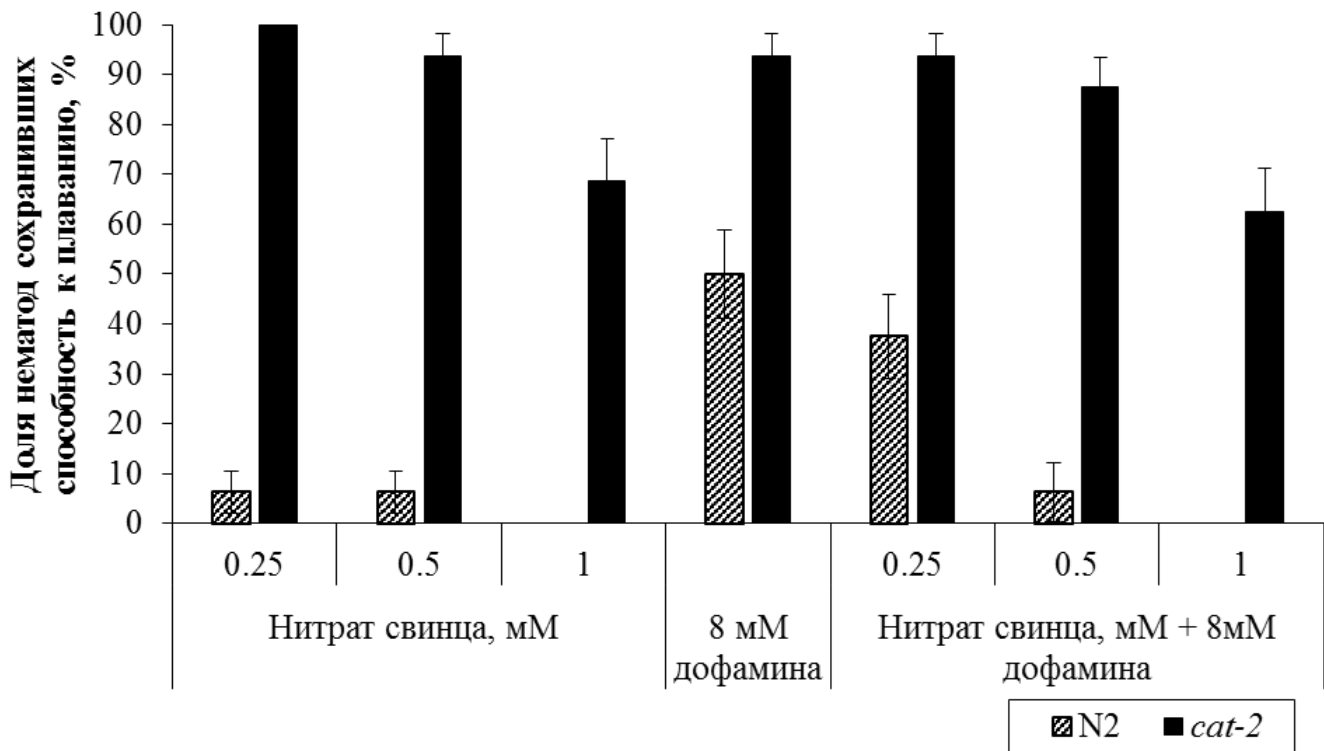


Рис. 3. Доля нематод, сохранивших способность к плаванию после 90-минутной инкубации с нитратом свинца и/или дофамином

линии *cat-2* к токсическому действию $Pb(NO_3)_2$ в концентрации 0.25–1.0 мМ (рис. 1–4). В работе Akiyem et al. [1] показано, что однократная обработка личинок *C. elegans* первого возраста L1 ацетатом свинца в концентрации 2.5 и 5 мМ вызывает дегенерацию 40 и 80% дофаминергических нейронов соответственно. При этом уровень эндогенного дофамина снижается с 3 нг/мг белка у необработанных личинок до 2 и 1 нг/мг белка у личинок, обработанных соответственно 2.5 и 5 мМ ацетата свинца. У *C. elegans* линии *cat-2* эндогенный дофамин выявлен не был [1].

Возможным объяснением различий чувствительности нематод линий N2 и *cat-2* к нитрату свинца, выявленных в нашей работе, может быть разный уровень эндогенного дофамина. Дофамин необходим для реализации многих форм поведения беспозвоночных, таких как локомоция, восприятие химических и механических стимулов, откладка яиц, обучение и память. У *C. elegans* одной из главных функций дофамина является регуляция локомоции. Известно, что дофамин участвует в уменьшении скорости спонтанной двигательной активности и полном ее прекращении у нематод при контакте с пищей и в период линьки. Действие экзогенного дофамина на нервную систему *C. elegans* имитирует состояние организма с повышенным уровнем

нем эндогенного дофамина. В наших экспериментах введение в среду инкубации 8 мМ дофамина повышало его концентрацию во внутренней среде организмов нематод и вызывало снижение спонтанной двигательной активности у 25–62.5% нематод линии N2 и почти не оказывало влияния на локомоцию нематод линии *cat-2* (рис. 1–4). Возможным объяснением отсутствия чувствительности спонтанной двигательной активности *C. elegans* линии *cat-2* к экзогенному дофамину может быть сохранение пониженного уровня дофамина во внутренней среде организма из-за низкой проницаемости кутикулы.

При совместном введении в среду инкубации $Pb(NO_3)_2$ и дофамина у части нематод линии N2 восстанавливалась способность к плаванию. У *C. elegans* линии *cat-2* экзогенный дофамин не оказывал достоверного влияния на чувствительность плавания к нитрату свинца (рис. 1–4). Ионы свинца не только вызывают гибель дофаминергических нейронов, но и повышают активность транспортного белка DAT-1, осуществляющего обратный захват дофамина, что приводит к повышению уровня дофамина в пресинаптических нейронах и снижению его содержания в межклеточном пространстве [1]. Возможным объяснением отсутствия терапевтического действия экзогенного дофамина на нематод

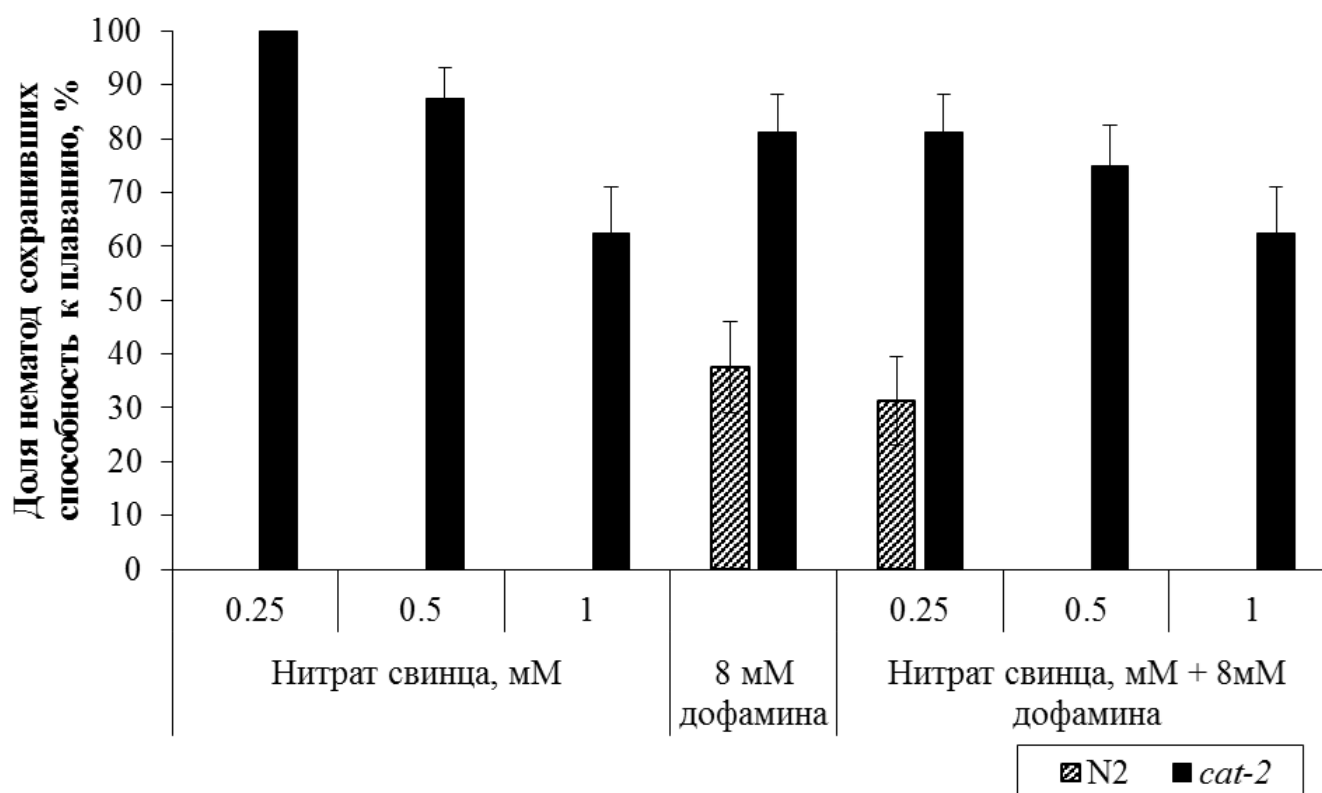


Рис. 4. Доля нематод, сохранивших способность к плаванию после 120-минутной инкубации с нитратом свинца и/или дофамином

линии *cat-2* является сохранение низкого уровня дофамина во внутренней среде организма вследствие слабой его проницаемости через кутикулу.

Известно, что дофамин модулирует скорость секреции ацетилхолина холинергическими моторными нейронами AVA, AVB, AVD и PVC в сети нейронов, регулирующих локомоцию нематод [15–17]. Активность этих нейронов модулируется дофамином и серотонином. Ранее было показано снижение уровня эндогенного дофамина ацетатом свинца у нематод линии дикого типа N2 [1]. В наших экспериментах снижение уровня эндогенного дофамина нитратом свинца выражалось в нарушениях моторной программы плавания *C. elegans* линии N2 (рис. 1–4). В регуляции локомоции нематод принимают участие два типа рецепторов дофамина — DOP-1 и DOP-3. Эти рецепторы необходимы как для начальной фазы плавания, так и для длительного его поддержания. Активация разных рецепторов дофамина может оказывать противоположное действие на скорость локомоции [15, 18–19]. Возможное объяснение результатов наших экспериментов заключается в следующем. Введение в среду инкубации экзогенного дофамина компенсирует снижение содержания эндогенного дофамина нитратом свинца в организмах

C. elegans линии N2 и, как следствие, повышает дофаминергическую трансмиссию и активирует рецепторы, повышающие скорость локомоции. Функционирование нейронной сети, контролирующей локомоцию нематод, подробно изучено у *C. elegans* линии дикого типа N2. Каким образом осуществляется регуляция локомоции у нематод мутантных линий с нарушенным синтезом биогенных аминов, в частности, у линии *cat-2*, в научной литературе не описано.

Заключение

В работе исследовано токсическое действие ионов Pb^{2+} на *C. elegans* двух линий: линии дикого типа N2 и линии *cat-2*, у которой отсутствует эндогенный дофамин. Показана низкая, по сравнению с линией N2, чувствительность нематод линии *cat-2* к токсическому действию нитрата свинца в концентрации 0.25–1.0 мМ. Это позволило сделать вывод о том, что мишенью негативного действия свинца на организм *C. elegans* является дофаминергическая система. Наиболее вероятным механизмом нарушения функций дофаминергической системы ионами Pb^{2+} может быть нарушение синтеза дофамина дофаминергическими нейронами. В пользу этого предположения свидетельствует вы-

явленное нами восстановление способности нематод линии дикого типа N2 к плаванию при совместном действии нитрата свинца и дофамина. Отсутствие терапевтического действия дофамина на локомоцию

нематод линии *cat-2*, нарушенную нитратом свинца, может быть связано с особенностями функционирования нейронной сети, регулирующей локомоцию, в отсутствие дофамина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akinyemi A.J., Miah M.R., Ijomone O.M., Tsakic A., Soares F.A.A., Tinkov A.A., Skalny A.V., Venkataramani V., Aschner M. Lead (Pb) exposure induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*: involvement of the dopamine transporter // *Toxicology Reports*. 2019. V. 6. P. 833–840. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.001>
2. Lidsky T.I., Schneider J.S. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates // *Brain*. 2003. V. 126. P. 5–19. DOI: 10.1093/brain/awg014
3. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B., Beeregowda K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals // *Interdisciplinary Toxicology*. 2014. V. 7. P. 60–72. doi: 10.2478/intox-2014-0009
4. Nemsadze K., Sanikidze T., Ratiani L., Gabunia L., Sharashenidze T. Mechanisms of lead-induced poisoning // *Georgian Medical News*. 2009. V. 172–173. P. 92–96.
5. Sanders T., Liu Y., Buchner V., Tchounwou P.B. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: A review // *Reviews on Environmental Health*. 2009. V. 24. P. 15–45. <https://doi.org/10.1515/reveh.2009.24.1.15>
6. Garza A., Vega R., Soto E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity // *Medical Science Monitor*. 2006. V. 12. P. RA 57–65.
7. Bouchard M., Laforest F., Vandellac L., Bellinger D., Mergler D. Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water // *Environmental Health Perspectives*. V. 115. 2007. P. 122–127. <https://doi.org/10.1289/ehp.9504>
8. Fitsanakis V.A., Au C., Erikson K.M., Aschner M. The effects of manganese on glutamate, γ -aminobutyric acid, and dopamine regulation // *Neurochemistry International*. 2006. V. 48. P. 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.10.012>
9. Oulhote Y., Mergler D., Barbeau B., Bellinger D.C., Bouffard T., Brouder M. — E. Saint-Amour D., Legrand M., Sauv e S., Bouchard M.F. Neurobehavioral function in school-age children exposed to manganese in drinking water // *Environmental Health Perspectives*. V. 122. 2014. P. 1343–1350. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307918>
10. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* // *Genetics*. 1974. V. 77. P. 71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
11. Chen P., Martinez-Finley E.J., Bomhorst J., Chakraborty S., Aschner M. Metal-induced neurodegeneration in *C. elegans* // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2013. V. 5. P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00018>
12. Chase D.L., Koelle M.R. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans* / *Wormbook*, ed. 2007. The *C. elegans* Research Community // URL: http://wormbook.org/chapters/www_monoamines/monoamines.pdf (дата обращения 25.07.2022). doi/10.1895/wormbook.1.132.1
13. Wang D., Xing X. Assessment of locomotion behavioral defects induced by acute toxicity from heavy metal exposure in nematode *Caenorhabditis elegans* // *Journal of Environmental Sciences*. 2008. V. 20. P. 1132–1137. doi: 10.1016/S1001-0742(08)62160-9
14. Zhang Y., Ye B., Wang D. Effects of metal exposure on associative learning behavior in nematode *Caenorhabditis elegans* // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010. V. 59. P. 129–136. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9456-y>
15. Chase D.L., Pepper J.S., Koelle M.R. Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans* // *Nature Neuroscience*. 2004. Vol. 7. P. 1096–1103. doi: 10.1038/nn1316
16. Han B., Bellemer A., Koelle M.R. An evolutionary conserved switch in response to GABA affects development and behavior of the locomotor circuit of *Caenorhabditis elegans* // *Genetics*. 2015. V. 199. P. 1159–1172. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173963>
17. Jospin M., Qi Y.B., Stawicki T.M., Boulin T., Schuske K.R., Horvitz H.R., Bessereau J. — L., Jorgensen E.M., Jin Y. A neuronal acetylcholine receptor regulates the balance of muscle excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans* // *PLoS Biology*. 2009. V. 7. P. e1000265. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000265>
18. Sawin E.R., Ranganathan R., Horvitz H.R. *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway // *Neuron*. 2000. V. 26. P. 619–631. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81199-x
19. Vidal-Gadea A.G., Pierce-Shimomura J.T. Conserved role of dopamine in the modulation of behavior // *Communicative & Integrative Biology*. 2012. V. 5. P. 440–447. doi: 10.4161/cib.20978

© Егорова Анастасия Васильевна (egorovanastassia@gmail.com), Гатиятуллина Алсу Фоатовна (gaf9212@gmail.com),

Калинникова Татьяна Борисовна (tbkalinnikova@gmail.com).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»