

CAENORHABDITIS ELEGANS В ТОКСИКОЛОГИИ И НАНОТОКСИКОЛОГИИ

Р. Т. Минуллина, Р. Ф. Фахруллин, Д. Г. Ишмухаметова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Поступила в редакцию 25.10.2011 г.

Аннотация. Почвенная свободноживущая нематода *Caenorhabditis elegans* является популярным модельным объектом в различного рода биологических исследованиях. Данный обзор направлен на знакомство читателя с использованием нематоды в аспекте токсикологических и нанотоксикологических исследований. Подробно рассматривается возможность использования *C. elegans* в экотоксикологии и нейротоксикологии, а также отдельно обсуждается взаимодействие наноматериалов с организмом нематоды. Особое внимание мы уделили вопросу разработки высокопроизводительных методов для оценки токсического влияния различных соединений с использованием *C. elegans* в качестве модельного тест-организма.

Ключевые слова: *Caenorhabditis elegans*, экотоксикология, нейротоксикология, нанотоксикология, токсичность тяжелых металлов, высокопроизводительные методы оценки токсичности.

Abstract. *Caenorhabditis elegans* is a free-living soil nematode. This organism is a very popular model in the different biological studies. In this review we try to give comprehensive information about use of *C. elegans* in toxicological and nanotoxicological research. We consider an employment of the nematode in ecotoxicology and nanotoxicology in detail, next, separately discuss interaction between nematodes and nanomaterials. Finally, we focus our attention on the development of high throughput approaches for several substances toxicity assessment, when *C. elegans* is used as model organism.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, ecotoxicology, neurotoxicology, nanotoxicology, toxicity of heavy metals, high throughput approaches.

ВВЕДЕНИЕ

Caenorhabditis elegans — свободноживущая нематода размером около 1 мм в длину, предпочтительно обитающая в почве, богатой бактериями, которыми она питается. В качестве модельного объекта впервые она была использована Сидни Бреннером еще в 70-х годах 20 века при генетических исследованиях. Он разработал метод культивирования нематоды в лабораторных условиях на плотной питательной среде с *E. coli* в качестве питательного субстрата [1]. Дикий тип нематоды был выделен из садового компоста в г. Бристоль (Великобритания) и был назван N2 Bristol. Позднее *C. elegans* была обнаружена практически на всех континентах планеты и активно используется в качестве модельного объекта при самых различных исследованиях.

Начало 21 века по праву можно считать «эпохой *Caenorhabditis elegans*». Ряд открытий, сделанных при помощи *C. elegans* были удостоены Нобелев-

ских премий. В 2002 году Джон Салстон (John E. Sulston), Сидни Бреннер (Sydney Brenner) и Роберт Хорвитц (H. Robert Horvitz) получили премию «за открытия, посвященные генетической регуляции развития органов и программированной клеточной гибели», в 2006 году «за открытие РНК-интерференции — эффекта гашения активности определенных генов» премии были удостоены Эндрю Файер (Andrew Z. Fire) и Крейг Мелло (Craig C. Mello), а в 2008 году Нобелевскую премию за работу по исследованию зеленого флуоресцентного белка (GFP) получили Осаму Симомура (Osamu Shimomura), Мартин Чалфи (Martin Chalfie) и Роджер Тсиен (Roger Tsien).

Геном нематоды был полностью секвенирован в 1998 году [2]. Используя биоинформационные подходы, была выявлена высокая степень гомологии (60—80 %) многих генов нематоды с генами человека [3]. Кроме того было установлено, что 12 из 17 известных сигнальных путей, среди которых тирозинкиназный, серин-треониновый пути и другие консервативны как у человека, так и у *C. elegans* [4]. В связи с этим *C. elegans* является ценным модельным объектом для изучения токсичности.

ЭКОТОКСИКОЛОГИЯ И *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Многие исследования по изучению токсичности тех или иных соединений проводятся на водных организмах, таких как *Daphnia magna*, *Oncorhynchus mykiss*, *Chlorella kessleri*. Очень мало работ посвящено исследованию токсичности на организмах, обитающих на суше [5].

Нематоды являются распространенными животными в почвенной экосистеме, они также обнаружены в воде и осадочных породах. Чрезвычайно высокая распространенность нематод свидетельствует о том, что они играют важную роль в переработке питательных веществ и в поддержании постоянства окружающей среды. Эти свойства делают их удобными объектами для использования их в экотоксикологических исследованиях.

С конца 90-х годов *C. elegans* стал основным видом нематод, который используется в токсикологических исследованиях. Вероятно, это связано с тем, что к данному моменту времени накопилось достаточно много знаний о биологии *C. elegans*. Большинство экотоксикологических исследований проводится в водной среде из-за простоты проведения экспериментов. Также существуют методы определения токсичности с использованием образцов почвы или осадочных пород водоемов. Помимо лабораторных исследований проводились исследования образцов воды, почвы и осадочных пород, выделенных из загрязненных природных источников в некоторых европейских странах [6–8].

Впервые *C. elegans* в качестве предсказательной модели была использована для оценки токсического влияния тяжелых металлов на организм человека.

Исторически сложилось, что сначала исследователи пользовались методами оценки токсичности на физиологическом уровне, так как это менее трудоемкий способ [9, 10]. Позднее стали использовать методы, позволяющие выявить механизмы токсического действия на молекулярном уровне, которые включали в себя определение активности ферментов и экспрессии ряда генов-маркеров стресса [11, 12]. Совместное использование этих методов позволяет оценить воздействие токсических веществ на различных уровнях и составить наиболее полную картину о спектре их действия.

Существует два основных подхода для определения токсичности различных веществ. Один из них заключается в расчете одного параметра. Так, например, некоторые авторы используют параметр

летальности, основываясь на расчете LC_{50} [13, 14]. Другой подход заключается в многоуровневой оценке токсического влияния веществ, а именно оценка двух и более параметров [15, 16].

Anderson с сотрудниками сравнивали влияние токсических веществ относящимся к трем различным классам: органические растворители, органические пестициды и тяжелые металлы [17]. Целью данного исследования было сравнить чувствительность теста на острую токсичность нейротоксичных и ненейротоксичных соединений, основанный на измерении показателя движения нематод. В каждый класс входили по 3 вещества, 2 из которых заведомо обладали нейротоксичным действием: хлорпирифос и лемамизол, Pb и Al, этанол и ацетон у органических пестицидов, тяжелых металлов и органических растворителей соответственно. Токсическое действие других веществ (мебендазол, DMSO и Cu) на нервную систему животных не доказано. В данной работе использовали 4-часовой тест на токсичность. Далее определяли скорость движения нематод. Для этого после инкубации червей помещали на свежеприготовленную агаровую пластинку, сформированную на предметном стекле. Затем образцы помещали в поток увлажненного воздуха и подсвечивали светом так, чтобы нематоды были видны как светящиеся объекты на темном фоне и записывали видео в течение 100 циклов по 1,5 минуты. Показатель движения рассчитывали как процент от контроля. Практически для всех соединений наблюдалась прямая корреляция между их концентрацией и ингибированием движения. Кроме того, в данной работе исследовалось восстановление движения червей в течение 20 часов после теста на токсичность. Было показано, что после инкубации нематод в ионах Cu и Pb восстановление движения у них происходит на 16 и 50 % соответственно.

Большинство тестов на токсичность различных агентов базируется на исследовании нематоды на уровне организма. Roh с соавторами предложили использовать в качестве индикатора токсичности экспрессию генов-маркеров в ответ на стресс [11]. Исследовали экспрессию 14 генов-маркеров стресса в ответ на экспозицию нематод в растворах солей тяжелых металлов, а именно: экспрессию генов шаперонов (*hsp-16.1*, *hsp-16.2*, *hsp-16.48*, *hsp-70*), металлотионеина — небольшого белка, участвующего в транспорте ионов и детоксикации (*mt-1* и *mt-2*), вителлогена (*vit-2* и *vit-6*) участвующего в формировании яиц, цитохрома P450 35A2 (*cyp35a2*), глутатион-S-трансферазы 4 (*gst-4*), су-

пероксиддисмутазы 1 (*sod-1*), каталазы (*ctl-2*), энхансера апоптоза (*ape-1*) и p53-подобного белка (*serp-1*).

Позднее данный метод был применен авторами при оценке токсичности фосфорорганического инсектицида хлорпирифоса [18] и ди (2-этилгексил) фталата [19]. В данных работах использовались трансгенные нематоды штамма *hsp-16.2::gfp* и *hsp-16.48::gfp*, в которых экспрессия шаперонов сопряжена с экспрессией зеленого флуоресцентного белка. При экспозиции таких нематод в загрязненной почве увеличивалась интенсивность флуоресценции GFP, что указывало на повышенную экспрессию шаперонов под воздействием смеси загрязнителей. Авторы также исследовали ацетилхолинэстеразную активность у нематод, подвергавшихся воздействию хлорпирифоса. Таким образом, оценивая ответ на биохимическом уровне. Было показано, что хлорпирифос ингибирует ацетилхолинэстеразную активность у нематоды, что приводит к накоплению ацетилхолина (АХ) в синаптической щели. Известно, что ацетилхолин важнейший возбуждающий медиатор вовлеченный в реализацию двигательных функций у нематоды [20]. Ацетилхолинэстераза (AChE) — фермент, расщепляющий ацетилхолин в синаптической щели до холина и уксусной кислоты, что приводит к расслаблению мышечных клеток. У *C. elegans* было обнаружено и охарактеризовано 4 гена, кодирующих различные изоформы фермента [21]. Мутанты по гену ацетилхолинэстеразы (*ase-1* и *ase-2*) характеризуются нарушением движения, что проявляется в виде судорог из-за гиперактивации миоцитов.

Wang с сотрудниками изучали совместное влияние Ca и Cd на продолжительность жизни *C. elegans* [22]. Экспозиция нематод дикого типа в присутствии смеси ионов Ca (25 mM) и Cd (200 μM) значительно снижала продолжительность жизни по сравнению с экспозицией в среде только с Cd (200 mM). Используя мутантные штаммы нематод, авторы показали, что токсичность этих двух металлов обусловлена их влиянием на экспрессию окислительных ферментов (СОД и сукцинатдегидрогеназа, цитохром b) и нарушением регуляции сигнального пути инсулина.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ

По оценкам Агентства по защите окружающей среды (ЕРА, США) на сегодняшний день существует около 10000 потенциально опасных веществ, которые требуют дальнейшего тестирования на

токсичность [23]. Исследование токсичности на вивальных моделях, которые используются фармакологическими компаниями являются трудоемкими и дорогими. Это является препятствием для широкомасштабного скрининга токсических веществ. Поэтому актуальной задачей является разработка высокопроизводительных подходов для более дешевого и менее трудоемкого скрининга токсического действия веществ. Высокопроизводительные подходы необходимы как для расширения спектра исследуемых веществ на геном тест — объектов для поиска мишеней токсических веществ, так и для быстрого скрининга большого количества химических соединений, необходимого для проверки их потенциальной токсичности.

Основная цель разработки высокопроизводительных методов состоит в том, чтобы ограничить перечень особо токсичных веществ, для которых требуется дальнейшее тестирование на вивальных моделях млекопитающих.

Чрезвычайно удобной моделью для разработки таких подходов является нематода *C. elegans* так как ее легко можно выращивать в лабораторных условиях на твердых и жидких средах на чашках Петри, культуральных планшетах и в пробирках. Разработаны автоматизированные методы по визуализации нематод, основанные на измерении оптического поглощения и флуоресценции, а также морфометрических параметров и параметров движения [24—26]. На сегодняшний день проточные цитофлуориметры адаптированы для сортировки червей на основании морфометрических параметров или на основании экспрессии флуоресцентных белков, что используется в крупномасштабном скрининге лекарственных препаратов [27—29]. Недавно был разработан сортер, в основе которого лежит микрофлюидное устройство, предназначенный для сортировки нематод [30], позволяющий сортировать нематод в соответствии с их морфологическими параметрами. Микрофлюидное устройство состоит из системы микроканалов, камер, в которых осуществляется манипуляция с нематодами, и клапанов. По микроканалам в потоке жидкости проходят нематоды, а также среда и реагенты. В отсеках, которые запираются клапанами, осуществляется иммобилизация червей, инкубация в исследуемых веществах и последующая визуализация посредством двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии. После визуализации следует стадия обработки изображения с помощью компьютера в автоматическом режиме, затем нематода направляется в канал для сборки в

стандартные многолуночные планшеты. Преимущество данного метода заключается в том, что с его помощью возможна одновременная инкубация, иммобилизация, визуализация на субклеточном уровне и независимый скрининг множества нематод на 1 чипе.

CAENORHABDITIS ELEGANS КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ

Нервная система *Caenorhabditis elegans* хорошо изучена. На сегодняшний день известно, что нервная система *C. elegans* состоит из 302 нейронов 118 подтипов [31], 6393 химических, 890 электрических и 1410 нейромышечных синапсов [32]. Были также составлены карты всех нейронов различных клеточных линий нематоды [33]. Совокупность этих знаний делает *C. elegans* удобным объектом для нейротоксикологических исследований.

Нейротоксичность различных соединений определяется по изменению следующих параметров: поведенческие (подвижность, хемотаксис, питание), молекулярные (экспрессия генов, активность ферментов), морфологические

Cole с соавторами при исследовали изменение подвижности нематоды при экспозиции их в присутствии таких органических фосфатов как: дихлорфос, этилпараоксон, метилпаратион, ометоат и другие. Авторы при помощи компьютерной программы оценивали дистанцию, которую проходили нематоды за определенное время до и после экспозиции в различных органических фосфатах, а также определяли ацетилхолинэстеразную активность в экстрактах гомогената нематод. Было показано, что органофосфаты снижают подвижность нематод, что коррелировало со снижением активности холинэстеразы [34]. Снижение активности холинэстеразы, как уже отмечалось выше, приводит к нарушению координации движения нематод и смерти от тонических судорог.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧНОСТИ

Благодаря использованию в качестве модели *Caenorhabditis elegans* ученые сделали прорыв в определении молекулярных механизмов развития токсичности. Немаловажную роль в этом процессе сыграли два обстоятельства. Во-первых, открытие явления РНК-интерференции, а, во-вторых, развитие ДНК-технологий, а именно метода ДНК микроанализа и мечение генов GFP.

РНК интерференция основана на гибридизации коротких одноцепочечных фрагментов РНК с ком-

плиментарными участками мРНК с последующим вырезанием этого гетеродуплекса из мРНК, либо ингибированием трансляции. Эти события приводят к снижению экспрессии того или иного гена. За открытие этого явления в 2006 году была присуждена Нобелевская премия Craig Mello и Andrew Fire по физиологии и медицине. Позднее явление РНК интерференции стали использовать для получения животных с выключенными генами (knockout — КО), которые интересуют исследователя. Данный инструмент является незаменимым в том случае, когда необходимо определить участие того или иного гена в ответ на действие токсического вещества.

Доступность и способность создания КО нематод объединяясь с такими методами как РНК интерференция, ДНК микроанализ и мечение GFP сыграло немаловажную роль в этом процессе. Используя метод ДНК микроанализа Reichert и Menzel показали, что экспозиция нематод в флуорантене в концентрации 0,5 мг/л приводит к увеличению экспрессии 203 индуцибельных генов, кодирующих различные классы ферментов, среди них ферменты детоксикации — цитохром P450, УДФ — глюкозилтрансфераза, глутатитион-S-трансфераза, а также гены карбоксилэстеразы, коллагеназы и другие. Атразин в концентрации 25 мг/л снижает экспрессию 153 генов [35]. Авторы показали принципиальную возможность использования ДНК микроанализа для развития систем экотоксикологических тестов. Основным преимуществом данного подхода является то, что можно подвергнуть быстрому скринингу множество генов и определить наиболее регулируемый маркерный ген для дальнейшего детального изучения.

Menzel с сотрудниками использовали совместно ДНК микроанализ и метод РНК интерференции для определения того, какие гены задействованы в ответе нематод на экспозицию в полихлорированных бифенилах (ПХБФ), которые являются мощными иммунотоксикантами и обладают канцерогенным эффектом. С помощью ДНК микроанализа было показано, что изменяется экспрессия генов CYP 450. Прижизненное окрашивание красителем Nile Red (Ex:485 нм, Em: 525 нм), который позволяет визуализировать липидные капли в клетках позволило исследователям сделать заключение о том, что экспозиция нематод в ПХБФ приводит к активации липидного метаболизма и снижению запаса жира, в чем, по-видимому, и заключается токсичность ПХБФ [36].

Braungart с соавторами использовали *C. elegans*

в качестве модели для исследования воздействия дофаминергических нейронов, дегенерация которых у человека ассоциирована с болезнью Паркинсона. Известно, что у нематод всего 8 нейронов, работающих на дофамине [37]. Изменения в них наиболее просто увидеть при использовании трансгенного штамма *dat-1::gfp*. Ген *dat-1* кодирует транспортер обратного захвата дофамина из синаптической щели. На мутантных нематодах было показано, что 1-метил-4-фенилпиридин вызывает дегенерацию дофаминергических нейронов и тем самым индуцирует ненаследственную форму болезни Паркинсона [38].

Использование флуоресцентных нематод штамма *skn-1::gfp* позволило выяснить возможные молекулярные причины воздействия таких веществ как паракват, азид и арсенит натрия. Известно, что эти вещества генерируют образование АФК в нейронах [39, 40]. Ген *skn-1*, кодирует фактор транскрипции, который запускает экспрессию генов антиоксидантов и ферментов второй фазы детоксикации [41]. Этот фактор транскрипции постоянно присутствует в ядрах ASI нейронов (мнимый гипоталамус у нематод) у взрослых нематод и его экспрессия индуцируется в клетках кишечника [42]. После экспозиции трансгенных нематод в параквате, азиде натрия и арсените натрия *skn-1* накапливается в ядрах клеток кишечника, но не в нейронах. Таким образом, авторы показали, что блокируется экспрессия антиоксидантных ферментов и ферментов детоксикации именно в нейронах нематоды, которые остаются незащищенными от окислительного стресса. Что может явиться молекулярной причиной дегенерации нейронов.

Результаты по использованию трансгенных нематод показали, что они являются чрезвычайно удобным объектом для токсикологических исследований. Мечение GFP определенных маркерных генов стало не просто удобным, но и явилось чрезвычайно важной вехой в развитии молекулярно-генетического анализа, что позволяет сегодня исследовать токсическое влияние различных веществ на совершенно новом уровне и выявить молекулярные причины их влияния.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *CAENORHABDITIS ELEGANS* С НАНОМАТЕРИАЛАМИ И НАНОТОКСИКОЛОГИЯ

В последние годы пристальное внимание многих ученых привлекает проблема токсичности наноматериалов. Актуальной задачей на сегодняшний день является разработка подходов для скри-

нинга потенциально опасных видов наночастиц. Основным преимуществом применения *Caenorhabditis elegans* в качестве модельного объекта является то, что можно наблюдать токсический эффект на разных уровнях, начиная с молекулярного и заканчивая на уровне организма.

Так, Roh с соавторами изучали действие серебряных наночастиц на организм *Caenorhabditis elegans* [43]. Было показано что, экспозиция нематод в суспензии серебряных наночастиц кардинально меняет профиль экспрессии многих генов. Повышается уровень экспрессии митохондриальной изоформы супероксиддисмутазы *sod-3* и аномального белка *daf-12*, который кодирует ядерный рецептор, регулирующий переход *C. elegans* в стадию Дауэровской личинки. В этой работе применялись микроскопические методы для визуализации распределения наночастиц в теле нематоды. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) дает информацию о размерах и форме наночастиц, но не дает информации о степени агрегации тестируемой суспензии, так как метод предполагает длительную пробоподготовку, в результате которой степень агрегации наночастиц может претерпеть изменения. Было показано, что наночастицы серебра в основном накапливаются в области репродуктивных органов. Наночастицы в большей степени снижают репродуктивный потенциал нематод, чем ионы серебра, что выражается в уменьшении количества потомков в расчете на одну взрослую особь.

Wang с соавторами исследовали токсичность для *C. elegans* наночастиц оксидов Zn, Al, Ti. и сравнивали с токсичностью ионов соответствующих металлов [44]. Были определены LC_{50} для различных видов используемых наночастиц и их ионов при 24 часовой инкубации. Летальные дозы ZnO и Zn^{2+} не отличались, а в случае Al и Ti летальные дозы ионов статистически значимо превышали летальные дозы для наночастиц. Несмотря на это токсичность наночастиц находится на достаточно высоком уровне. Исследователи связывают это с ингибированием роста *E. coli*, которая является пищевым ресурсом для нематоды.

Ну с сотрудниками изучали эффект ZnO и TiO_2 на дождевых червях *Eisenia fetida* [45]. Тест на острую токсичность проводился в течение недели и включал в себя экспозицию червей в почве содержащей различные концентрации наночастиц. с последующим определением следующих параметров: повреждение митохондрий, активность антиоксидантных ферментов, степень повреждения

ДНК, содержание Zn и Ti в теле червей. Данные по повреждению ДНК и активности антиоксидантных ферментов свидетельствуют о значительных повреждениях при высокой дозе наночастиц (1 г/кг). Было также показано, что Ti и Zn накапливаются в теле червей при концентрации наночастиц в почве 5 г/кг, что приводит к повреждению митохондрий. Дезорганизация митохондрий была показана с помощью ПЭМ. На электронных фотографиях контрольных образцов отчетливо видны электронно-плотные интактные митохондрии, в то время как на фотографиях опытных образцов на месте локализации митохондрий они отсутствуют. Такие клетки не способны обеспечивать себя достаточным количеством энергии и погибают, вероятно, посредством апоптоза.

Daniels с соавторами вводили инертные полистереновые наночастицы в гонады *C. elegans*. С помощью флуоресцентно меченных наночастиц было показано, что они проникают в созревающие ооциты, которые затем оплодотворяются и покрываются непроницаемой скорлупой из хитина [46]. Жизнеспособность эмбрионов, содержащих наночастицы, оценивалась при помощи микроскопии. Судьбу зиготы прослеживали до стадии восьми клеток. Таким образом, было показано, что процедура микроинъекции не оказывала видимого влияния на раннее развитие эмбриона. Позднее Mohan с сотрудниками наряду с микроинъекцией наноматериалов в гонады нематоды, кормили червей флуоресцентными наноалмазами [47]. Авторами было показано, что наноалмазы, модифицированные декстраном и БСА, проникают в клетки кишечника, а немодифицированные наноалмазы остаются в просвете кишечника. При микроинъекции суспензии наноалмазов, наблюдалось накопление их в эмбрионах, которые в дальнейшем развились в полноценные личинки. В данной работе использовались физиологические (продолжительность жизни, репродуктивный потенциал) и молекулярные (экспрессия генов факторов транскрипции *daf-16* и *skn-1*, уровень АФК) маркеры токсичности. *daf-16* является фактором транскрипции, который при нормальных физиологических условиях локализован в цитоплазме, а при стрессовом воздействии транспортируется в ядро и активирует экспрессию генов СОД, каталазы и шаперонов, тем самым увеличивая толерантность организма к стрессу [48]. Фактор транскрипции *skn-1* регулирует гены системы детоксикации, защищая, таким образом, организм от АФК и внешних токсинов. Хорошо охарактеризованной мишенью *skn-1* явля-

ется ген *gcs-1*, кодирующий тяжелую цепь γ -глутамилцистеин синтетазы (*gcs-1*), фермента, который участвует в синтезе глутатиона и экспрессируется в клетках кишечника нематоды в ответ на стресс [41]. В данной работе было показано, что при кормлении нематод наноалмазами уровень и локализация *daf-16* и *gcs-1* не изменялся, что, по мнению авторов, свидетельствует о низкой токсичности этого наноматериала. При экспозиции червей в среде с наночастицами оксида кремния и полистереновыми наночастицами происходит увеличение в популяции особей с фенотипом BOW (bag of worms), который характеризуется задержкой сформировавшихся яиц в репродуктивных органах гермафродитов. Исследователи связывают это с тем, что наночастицы индуцируют преждевременную возрастную дегенерацию тканей репродуктивной системы нематоды [49]. Схожий эффект наблюдался при исследовании влияния углеродных нанотрубок и фуллеренов C_{60} на репродуктивные функции дождевого червя *Eisenia veneta* [50]. Продолжительность жизни и выживаемость червей при этом не изменялась.

Lim с соавторами синтезировали наночастицы на основе эрбия, иридия и иттрия размером 50—250 нм в диаметре, флуоресцирующие при облучении в инфракрасной области спектра. Авторы показали возможность использования таких наночастиц для визуализации пищеварительной системы нематоды *C. elegans*. В условиях отсутствия питательного субстрата флуоресценция наночастиц в пищеварительной трубке нематоды изменялась незначительно в течение 24 часов. При добавлении питательного субстрата квантовый выход флуоресценции снижался спустя 2 часа. Таким образом, авторы показали, что черви не перестают нормально питаться, следовательно, наночастицы являются биосовместимыми [51]. Позднее эта же группа синтезировала оксидные наночастицы Y_2O_3 и также изучила их влияние на жизнеспособность *C. elegans* в сравнении с коммерческими препаратами наночастиц. Был сделан вывод о низкой токсичности синтезированных наночастиц [52].

Kim с соавторами показали, что платиновые наночастицы (Pt НЧ) обладают антиоксидантной активностью и увеличивают продолжительность жизни короткоживущих из-за чрезмерного окислительного стресса мутантов нематод *mev-1(kn1)* [53]. Более того 0.5 mM Pt НЧ уменьшали накопление липофусцина — эндогенного автофлуоресцентного маркера белкового происхождения, который накапливается при старении у некоторых организ-

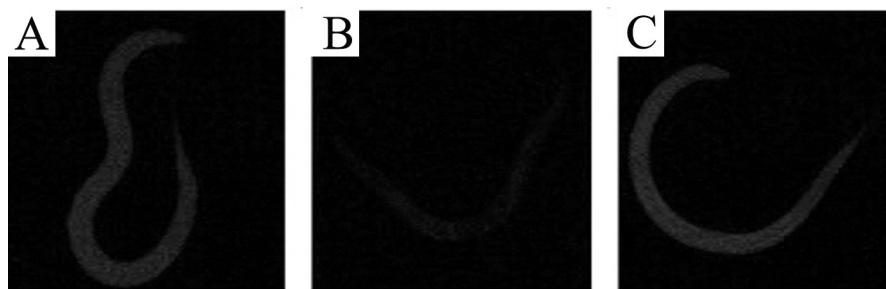


Рис. 1. Накопление липофусцина в клетках нематоды: *A* — контроль, *B* — после обработки 0,5 мМ Pt НЧ, *C* — после обработки 0,5 мМ EUK-8. Воспроизведено из [53] с разрешения издательства Elsevier

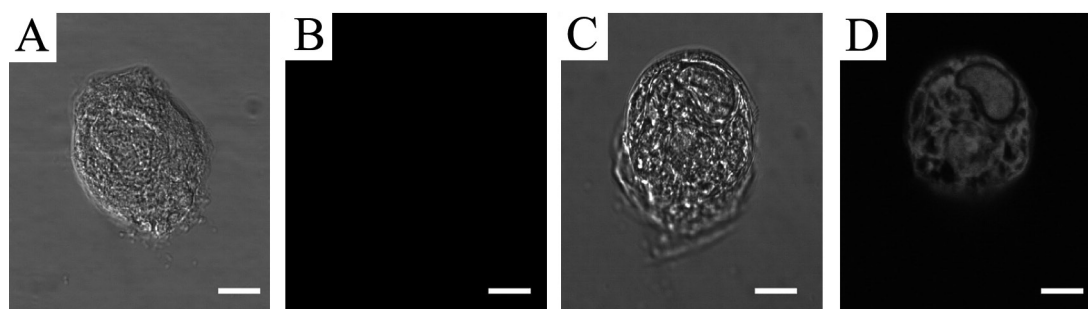


Рис. 2. Поперечный оптический срез тела *C. elegans*. Интернализация родамин-Pt НЧ в организм *C. elegans*. *A* — светлое поле контрольный образец, *B* — соответствующая флуоресцентная микрофотография, *C, D* — опытный образец, нематода, обработанная 5 мМ TAT-конъюгированных Pt НЧ. Шкала — 25 мкм. Воспроизведено из [56] с разрешения издательства Elsevier

мов (Ex: 351 нм, Em: 420 нм) в том числе и у *C. elegans*. Ранее было показано, что у *C. elegans* увеличивается накопление липофусцина при окислительном стрессе [54, 55]. В данной работе флуоресценцию липофусцина измеряли на 10 день культивирования нематод. Как видно на рис. 1, квантовый выход флуоресценции липофусцина значительно снижен при обработке нематод Pt НЧ. В данной работе не рассматривалась проблема эффективности проникновения наночастиц внутрь клеток *C. elegans*. Эта же группа исследователей модифицировали поверхность Pt НЧ TAT-пептидом вируса ВИЧ-1, что увеличивало проницаемость липидного бислоя для наночастиц [56]. Связующим звеном между TAT и Pt НЧ является пептид DRTSTWR, который обладает сродством к Pt [57]. Интернализация наночастиц была показана с использованием Pt НЧ, модифицированных TAT-пептидом, меченым родамином В (Ex: 575 нм; Em: 595 нм) по N-концу TAT-пептида. На рис. 2 представлены конфокальные микрофотографии в режиме светлого поля и в режиме флуоресценции, которые демонстрируют интернализацию наночастиц в тело нематоды. Об этом свидетельствует интенсивная флуоресценция родамина В (Рис. 2D). Накопление АФК в клетках было показано при помощи двух флуорофоров CM-H₂DCFDA (DCF) и

MitoSOX Red (Ex: 488 нм; Em: 510 нм для DCF, Ex: 510 нм; Em: 580 нм для MitoSOX). С помощью DCF идентифицировали общее содержание АФК в цитоплазме. Этот краситель не флуоресцирует в восстановленной форме, после окисления АФК и удаления ацетатной группы цитозольными эстеразами становится флуоресцентным. MitoSOX Red целенаправленно проникает в митохондрии и начинает интенсивно флуоресцировать после окисления O₂^{•-} (супероксидом) и связывания с гидрофобной матрицей (например, ДНК).

Как видно из предыдущих работ, особое внимание исследователи уделяли исследованиям, связанным с длительной экспозицией нематод в наноматериалах, либо направленного введения последних в организм червей. Исследования, проведенные нашей группой, преследовали целью биосовместимую иммобилизацию наночастиц исключительно на поверхности нематод. Это позволило нам придать новые свойства нематодам. Так, например, иммобилизация магнитных наночастиц на поверхность нематод позволила нам управлять нематодами в пространстве при помощи внешнего магнитного поля [58]. На рис. 3 представлены оптические и электронные микрофотографии, демонстрирующие наличие магнитных наночастиц на поверхности нематод.

Таблица 1

Изучение влияния различных наноматериалов на *Caenorhabditis elegans*

Наночастицы	Изучаемые параметры	Условия эксперимента	Комментарии	Ссылка
Ag НЧ	летальность (24 ч) рост (24 ч) размножение (72 ч) экспрессия генов	экспозиция в суспензии НЧ в К-среде	Использовались N2 и <i>mtl-2, sod-3, daf-12</i> мутанты	[43]
CeO ₂ (15, 45 нм) TiO ₂ (7, 20 нм)	летальность рост размножение экспрессия генов	экспозиция в суспензии НЧ в К-среде	Повышается экспрессия гена <i>sur35a2</i> . Снижается фертильность нематод	[59]
ZnO Al ₂ O ₃ TiO ₂	летальность рост (длина) число яиц в яйцеводах число потомков на особь	экспозиция в суспензии НЧ в воде	Проводили сравнение влияния ионов соответствующих металлов и наночастиц	[44]
Полистерен (100нм)		микроинъекция суспензии наночастиц в гонады беременных гермафродитов	Оценивали вязкоэластичные свойства развивающихся эмбрионов нематоды	[46]
Наноалмазы	продолжительность жизни репродуктивный потенциал	микроинъекция в гонады кормление	Было показано, что наноалмазы не обладают острой токсичностью	[47]
Наночастицы оксида кремния полистерен	продолжительность жизни репродуктивный потенциал содержание АФК	кормление	Наблюдалась линейная корреляция между увеличением концентрации НЧ и снижением репродуктивного потенциала нематод	[49]
Оксидные флуоресцентные наночастицы эрбий/иттрий/иридий	квантовый выход флуоресценции наночастиц	кормление; Буфер для NGM с <i>E. coli</i>	Показали, что наночастицы остаются в пищеварительной системе нематоды, лишенной еды по меньшей в течение 24 часов	[51]
Y ₂ O ₃ Au-COOH	выживаемость	кормление; Буфер для NGM с <i>E. coli</i>	Показали, что все использованные наночастицы Y ₂ O ₃ и Au — COOH обладают низкой токсичностью	[52]
Pt НЧ TAT-Pt НЧ	продолжительность жизни устойчивость к окислительному стрессу накопление липофусцина уровень АФК (в ответ на обработку паракватом) СОД/каталазная активность	инкубация в суспензии НЧ	Показали, что инкубация в Pt НЧ увеличивает продолжительность жизни, снижает накопление липофусцина и увеличивает устойчивость к окислительному стрессу	[53, 56]

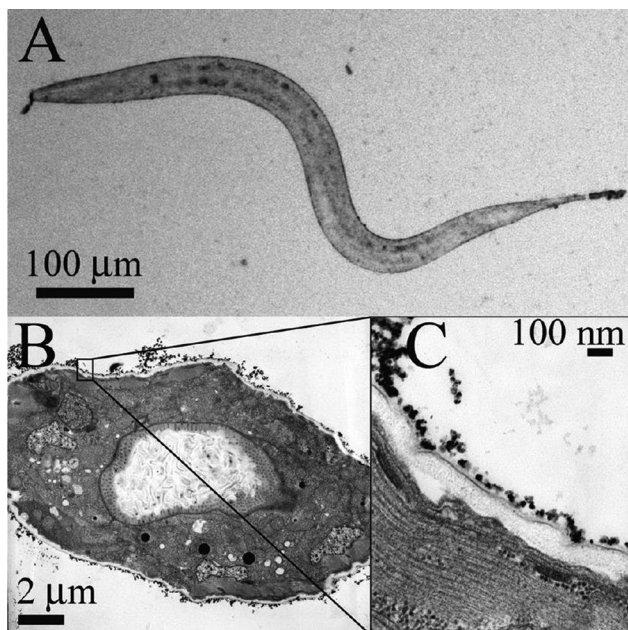


Рис. 3. А — оптическая микрофотография нематоды, кутикула которой модифицирована магнитными наночастицами. В, С — просвечивающая электронная микрофотография поперечного среза нематоды с иммобилизованными на ее поверхности магнитными наночастицами. Воспроизведено из [58] с разрешения Американского химического общества

Это приобретенное свойство может быть использовано для извлечения нематод из исследуемых образцов при проведении теста на токсичность. Помимо практического применения, подобного рода исследования интересны с фундаментальной точки зрения. До настоящего момента в литературе нет данных о влиянии наноматериалов, иммобилизованных на поверхностных структурах, на организм многоклеточных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы попытались дать исчерпывающую информацию о *Caenorhabditis elegans* как о модельном объекте токсикологических исследований. Мы рассмотрели более ранние исследования, связанные с изучением токсичности ионов тяжелых металлов и ксенобиотиков, которые не потеряли актуальности и по сей день, а также современные работы по изучению взаимодействия наноматериалов с организмом нематоды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brenner S. / The genetics of *Caenorhabditis elegans* / S. Brenner // Genetics. — 1974. — Vol. 77 — P. 71—94.
2. Consortium (The C. elegans Sequencing Consortium) Genome sequence of the nematode C. elegans: a

platform for investigating biology // Science. — 1998. — Vol. 282. — P. 2012—2018.

3. Helmcke K. J. / Utility of *Caenorhabditis elegans* in high throughput neurotoxicological research/ D.S. Avila, M. Aschner, K.J. Helmcke // Neurotoxicology and Teratology. — 2010. — Vol. 32 — P. 62—67.

4. Leung M. C. / *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology / M. C. Leung [et al.] // Toxicol. Sci. — 2008. — Vol. 106. — P. 5—28.

5. Hund-Rinke K. / Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids / K. Hund-Rinke, M. Simon // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. — 2006. — Vol. 13. — P. 225—232.

6. Black M. C. / Preliminary assessment of metal toxicity in the middle Tisza River (Hungary) flood plain / M. C. Black, P.L. Williams // J. Soils Sediments. — 2001. — Vol. 1 — P. 203—206.

7. Hoss S. / Growth and fertility of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in unpolluted freshwater sediments: Response to particle size distribution and organic content / S. Hoss [et al.] // Environ. Toxicol. Chem. — 1999. — Vol. 18. — P. 2921—2925.

8. Traunspurger W. / Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda). A method for testing liquid medium and whole sediment samples / W. Traunspurger [et al.] // Environ. Toxicol. Chem. — 1997. — V. 16. P. 245—250.

9. Dhawan R. / A comparison of metal-induced lethality and behavioral responses in the nematode *Caenorhabditis elegans* / R. Dhawan, D.B. Dusenbery, P.L. Williams // Environ. Toxicol. Chem. — 2000. — Vol. 19. — P. 3061—3067.

10. Anderson G. L. / Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans* / G. L. Anderson, W. A. Boyd, P. L. Williams // Environ. Toxicol. Chem. — 2001. — Vol. 20. — P. 833—838.

11. Roh J.-Y. / Assessment of stress — related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: a potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment / J.-Y. Roh, J. Lee, J. Choi // Environmental Toxicology and Chemistry. — 2006. — Vol. 25, № 11. — P. 2946—2956.

12. Wang D.-Y. / Phenotypic and behavioral defects caused by barium exposure in nematode *Caenorhabditis elegans* / D.-Y. Wang, Y. Wang // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 2008. — Vol. 54. — P. 447—453.

13. Ura K. / Aquatic acute toxicity testing using nematode *Caenorhabditis elegans* / K. Ura, [et al.] // Journal of Health Science. — 2002. — Vol. 48, №6. — P. 583—586.

14. Freeman M. N. / A soil bioassay using the nematode *Caenorhabditis elegans* / M. N. Freeman, C. L. Peredney, P. L. Williams // Environmental Toxicology and Risk Assessment. — 2000. — Vol. 9. — P. 305—318.

15. Boyd W. A. / The effects of metals and food availability on the behavior of *Caenorhabditis elegans* / W. A. Boyd [et al.] // Environ. Toxicol. Chem. — 2003. — Vol. 22. — P. 3049—3055.

16. Graves A. L. / Using transgenic *Caenorhabditis elegans* in soil toxicity testing / A. L. Graves, W. A. Boyd, P. L. Williams // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 2005. — Vol. 48. — P. 490—494.
17. Anderson G. L. / Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans* / G. L. Anderson, R. D. Cole, P. L. Williams // Environmental Toxicology and Chemistry. — 2004. — Vol. 23, №5. — P. 1235—1240.
18. Roh J.-Y. / Ecotoxicological evaluation of chlorpyrifos exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans* / J.-Y. Roh, J. Choi // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 2008. — Vol. 71. — P. 483—489.
19. Roh J.-Y. / Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans* / J.-Y. Roh [et al.] // Toxicology. — 2007. — Vol. 237. — P. 126—133.
20. Riddle D. L. / *C. elegans* II / D.L.Riddle [et al.] // NY: Cold Springs Harbor Laboratory Press. — 1997. — P. 611—644.
21. Combes D. / Acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans* / D. Combes, Y. Fedon, J. Toutant // Int. Rev. Cytol. — 2001. — Vol. 209. — P. 207—239.
22. Wang D. / Formation of a combined Ca/Cd toxicity on lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* / D. Wang, P. Liu, Y. Yang, L. Shen // Ecotoxicology and Environmental Safety. — 2010. — Vol. 73, №6. — P. 1221—1230.
23. Dix D. J. / The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals / D.J. Dix [et al.] // Toxicol. Sci. — 2007. — Vol. 95. — P. 5—12.
24. Baek J. H. / Using machine vision to analyze and classify *Caenorhabditis elegans* behavioral phenotypes quantitatively / J.H. Baek [et al.] // J. Neurosci. Methods. — 2002. — Vol. 118. — P. 9—21.
25. Hoshi K. / Computer-driven automatic identification of locomotion states in *Caenorhabditis elegans* / K. Hoshi, R. Shingai // J. Neurosci. Methods. — 2006. — Vol. 157. — P. 355—363.
26. Simonetta S. H. / An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application / S. H. Simonetta, D. A. Golombek // J. Neurosci. Methods. — 2007. — Vol. 161. — P. 273—280.
27. Burns A. R. / High-throughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in *Caenorhabditis elegans* / A. R. Burns [et al.] // Nat. Protoc. — 2006. — Vol. 1. — P. 1906—1914.
28. Dupuy D. / Genomescale analysis of in vivo spatiotemporal promoter activity in *Caenorhabditis elegans* / D. Dupuy [et al.] // Nat. Bio. technol. — 2007. — Vol. 25. — P. 663—668.
29. Pulak R. / Techniques for analysis, sorting, and dispensing of *C. elegans* on the COPAS flow-sorting system / R. Pulak // Methods Mol. Biol. — 2006. — Vol. 351. — P. 275—286.
30. Rohde C. B. / Microfluidic system for on-chip high-throughput whole-animal sorting and screening at subcellular resolution / C. B. Rohde [et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 13891—13895.
31. Hobert O. / Specification of the nervous system / O. Hobert // WormBook. — 2005. — P. 1—19.
32. Helmcke K. J. / Utility of *Caenorhabditis elegans* in high throughput neurotoxicological research / K. J. Helmcke, D. S. Avila, M. Aschner // Neurotoxicology and Teratology. — 2010. — Vol. 32. — P. 62—67.
33. Sulston J. E. / Neuronal cell lineages in the nematode *Caenorhabditis elegans* / J.E. Sulston // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1983. — Vol. 48. — P. 443—452.
34. Cole R. D. / The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity / R. D. Cole [et al.] Toxicol. Appl. Pharmacol. — 2004. — Vol. 194. — P. 248—256.
35. Reichert K. / Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray / K. Reichert, R. Menzel // Chemosphere. — 2005. — Vol. 61. — P. 229—237.
36. Menzel R. / Cytochrome P450s and short-chain dehydrogenases mediate the toxicogenomic response of PCB52 in the nematode *Caenorhabditis elegans* / R. Menzel [et al.] // J. Mol. Biol. — 2007. — Vol. 370. — P. 1—13.
37. Sulston J. / Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans* / J. Sulston, M. Dew, S. Brenner // J. Comp. Neurol. — 1975. — Vol. 163. — P. 215—226.
38. Braungart E. / *Caenorhabditis elegans* MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings / E. Braungart [et al.] // Neurodegener. Dis. — 2004. — Vol. 1. — P. 175—183.
39. Lynn S. / NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells / S. Lynn [et al.] // Circ. Res. — 2000. — Vol. 86. — P. 514—519.
40. Szabados T. / A chronic Alzheimer's model evoked by mitochondrial poison sodium azide for pharmacological investigations / T. Szabados [et al.] // Behav. Brain Res. — 2004. — Vol. 154. — P. 31—40.
41. An J. H. / SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response / J. H. An, T.K. Blackwell // Genes Dev. — 2003. — Vol. 17. — P. 1882—1893.
42. Bishop N. A. / Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans* / N.A. Bishop, L. Guarente // Nature. — 2007. — V. 447. — P. 545—549.
43. Roh J.-Y. / Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics / J.-Y. Roh [et al.] // Environ. Sci. Technol. — 2009. — Vol. 43. — P. 3933—3940.
44. Wang H. / Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans* / H. Wang, R. L. Wick, B. Xing // Environmental Pollution. — 2009. — Vol. 157. — P. 1171—1177.
45. Hu C. W. / Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida* / C.W.Hu [et al.] // Soil Biology & Biochemistry. — 2010. — Vol. 42. — P. 586—591.

46. Daniels B. R. / Probing single-cell micromechanics in vivo: the microrheology of *C. elegans* developing embryos / B. R. Daniels, B. C. Masi, D. Wirtz // Biophysical Journal. — 2006. — Vol. 90. — P. 4712—4719.
47. Mohan N. / In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans* / N. Mohan [et al.] // Nano Letters. — 2010. — Vol. 10. — P. 3692—3699.
48. Baumeister R. / Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity / R. Baumeister, E. Schaffitzel, M. Hertweck // J. Endocrinol. — 2006. Vol. 190. — P. 191—202.
49. Pluskota A. / In *Caenorhabditis elegans* nanoparticle-bio-interactions become transparent: silica-nanoparticles induce reproductive senescence / A. Pluskota [et al.] // PLoS ONE. — 2009. — Vol. 4, № 8. — P. 6622.
50. Scott-Fordsmand J. J. / The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms / J. J. Scott-Fordsmand [et al.] // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 2008. — Vol. 71, № 3. — P. 616—619.
51. Lim S. F. / In vivo and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in *Caenorhabditis elegans* / S. F. Lim [et al.] // Nano Letters. 2006. V. 6, № 2. P. 169—174.
52. Lim S. F. / Upconverting nanophosphors for bioimaging / S. F. Lim [et al.] // Nanotechnology. — 2009. — Vol. 20. — P. 405701.
53. Kim J. / Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* / J. Kim [et al.] // Mechanisms of Ageing and Development. — 2008. — Vol. 129. — P. 322—331.
54. Hosokawa H. / Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant mev-1 of *Caenorhabditis elegans* / H. Hosokawa [et al.] // Mech. Ageing Dev. — 1994. — Vol. 74. — P. 162—170.
55. Terman A. / Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress / A. Terman, N. Abrahamsson, U.T. Brunk // Exp. Gerontol. — 1999. — Vol. 34. — P. 755—770.
56. Kim J. / The effect of TAT conjugated platinum nanoparticles on lifespan in a nematode *Caenorhabditis elegans* model / J. Kim, T. Shirasawa, Y. Miyamoto // Biomaterials. — 2010. — Vol. 31. — P. 5849—5854.
57. Sarikaya M. / Molecular biomimetics: nanotechnology through biology / M. Sarikaya [et al.] // Nat. Mater. — 2003. — Vol. 2. — P. 577—585.
58. Minullina R. T. / Interfacing multicellular organisms with polyelectrolyte shells and nanoparticles: a *Caenorhabditis elegans* study / R. T. Minullina [et al.] // Langmuir. — 2011. — Vol. 27. — P. 7708—7713.
59. Roh J.-Y. / Ecotoxicological investigation of CeO₂ and TiO₂ nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints / J.-Y. Roh [et al.] // Environmental Toxicology and Pharmacology. — 2010. — Vol. 29. — P. 167—172.

Минуллина Рената Тавкилевна — аспирант кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета; e-mail: mirenata1612@gmail.com

Ишмухаметова Диляра Галимовна — доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета

Фахруллин Равиль Фаридович — кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета

Minullina Renata T. — postgraduate student at the Department of Biochemistry of Kazan (Volga region) federal university; e-mail: mirenata1612@gmail.com

Ishmukhametova Dilara G. — professor at the Department of Biochemistry of Kazan (Volga region) federal university

Fakhrullin Rawil F. — PhD, senior lecturer of the Department of Microbiology of Kazan (Volga region) federal university