

УДК 57.01

О. В. Карпухина, К. З. Гумаргалиева, А. Н. Иноземцев,  
Г. Е. Заиков

## БИОТЕСТИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМАХ

*Ключевые слова:* тяжёлые металлы, антиоксиданты, *Paramecium caudatum*, пирарцетам, полиморфизм.

*Исследовано влияние антиоксидантов после воздействия тяжёлых металлов на культуру клеток Paramecium caudatum. Данные свидетельствуют о том, что антиоксиданты могут играть важную роль в ослаблении токсического эффекта некоторых опасных тяжёлых металлов.*

*Keywords:* heavy metal, antioxidant, *Paramecium caudatum*, piracetam, polymorphism.

*Effect of antioxidants after exposure to heavy metals was investigated. The evidence suggests that antioxidants may play an important role in easing some of the dangerous heavy metals.*

### Введение

Ионы тяжёлых металлов играют существенную роль во многих физиологических процессах. В следовых количествах, некоторые из металлов необходимы для обмена веществ, роста и развития организма. Однако их избыток приводит к повреждению клеток, в частности, катионы тяжёлых металлов, реагируя с различными функциональными группами белков, инициируют нарушение их структурной организации [1].

Основным механизмом токсического действия тяжёлых металлов на клетки является процесс образования свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) путем прямого переноса электрона с участием катионов металлов или опосредованного ингибирования метаболических реакций. Следует подчеркнуть, что реактивные формы кислорода непрерывно производятся на определённом уровне при нормальных процессах в организме. Увеличение синтеза АФК является одной из начальных реакций на различные стрессовые факторы в биологических системах, которые являются причиной многих патологий [2].

Антиоксиданты непосредственно или косвенно защищают клетки от токсичных радикальных реакций [2-3]. Одним из фармакологических препаратов, которые способны ограничивать активность процессов свободнорадикального окисления является пирарцетам (2-оксо-1-пирролидинаацетамид). Согласно «мембранной гипотезе» [4], механизм действия пирарцетама неспецифичен в отношении клеток или органов и является не столько биохимическим, сколько «механическим». Молекулы препарата связываются с полярными головками фосфолипидов мембраны, в результате чего повышается подвижность липидов относительно друг друга и, как следствие, эластичность мембраны клетки. При этом препарат воздействует на мембрану лишь в том случае, если

ее эластичность нарушена (например, в результате старения), и не влияет на мембраны с нормальной эластичностью [4].

Целью данной работы стало исследование влияния антиоксидантных соединений на патологические процессы в клетке, инициируемые действием тяжёлых металлов.

### Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования влияния химических веществ выбрана инфузория *Paramecium caudatum*, которая обладает морфологическими признаками клетки и реагирует на внешнюю среду подобно многоклеточным организмам. Клетки *Paramecium caudatum* инкубировали до 30 суток при температуре  $21 \pm 1$  °C. Эффекты антиоксидантных соединений - мексидола и двух структурных форм пирарцетама - изучали в конечных концентрациях 1, 10, 25, мкМ, 50 мкМ и 1 мМ. При оценке выживаемости контролем являлись интактные клетки инфузорий. В опытах к 1 мл среды с парамециями добавляли 1 мл антиоксиданта и 1 мл токсиканта. Для регистрации числа инфузорий использовали счётную камеру Горяева. В данной работе исследовалось цитотоксичность хлорида кадмия, ацетата свинца и сульфата меди. *Paramecium caudatum* обладают высокой чувствительностью к действию токсикантов, т. к. способны реагировать на металлы при их концентрации в диапазоне от 0,1 до 0,0001 мг/мл. Одним из механизмов токсического действия металлов является изменение внутриклеточных условий из-за нарушения проницаемости мембраны. Ионы Cd, Pb и Cu вызвали набухание органелл цитоплазмы, влекущее за собой разрыв мембраны клетки *Paramecium caudatum*. Гибель клеток отмечалась через 10-20 минут после внесения в среду соли тяжёлого металла. Предварительное внесение в среду антиоксидантного соединения способствовало выживаемости клеток (рис.1-2, 4).

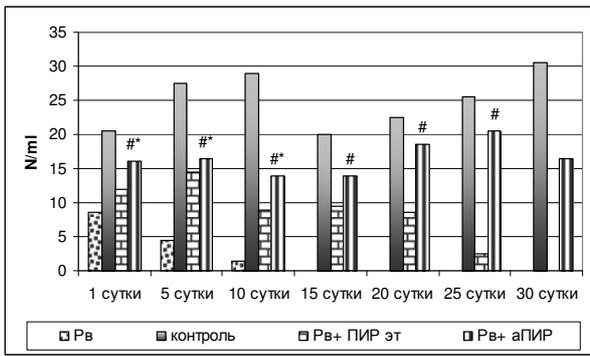


Рис. 1 – Динамика роста культуры *Paramecium caudatum* при внесении в среду ацетата свинца и пирacetама

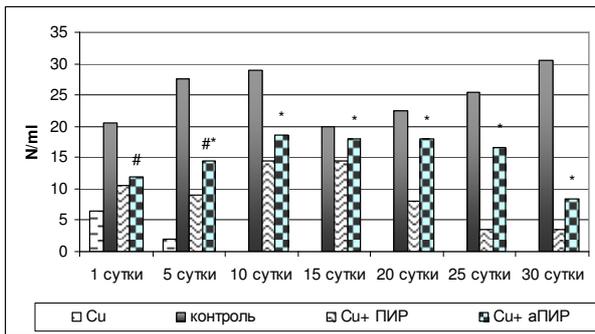


Рис. 2 – Динамика роста культуры *Paramecium caudatum* при внесении в среду сульфата меди и пирacetама

Ранее нами установлено, что диацетат свинца и хлорид кадмия в водном растворе выступают в роли катализаторов структурных перестроек нейротропного препарата – пирacetама [5]. При растворении в присутствии солей тяжелых металлов структура препарата подвергается изменениям с образованием промежуточных продуктов, которые значительно влияют на функциональные свойства лекарственного соединения. В исследованиях адаптивных реакций крыс в ответ на воздействие тяжелых металлов стресс-протекторный эффект пирacetама был неоднозначным из-за различия в фармакологическом действии полиморфных форм пирacetама кристаллического и аморфизированного. Структурно-модифицированная форма препарата аналогичная структурной форме пирacetама, обнаруженной в растворе в результате каталитического действия солей кадмия и свинца, оказала негативное влияние на выработку адаптивных реакций [5-7].

В данной работе растворы лекарственной формы пирacetама (АКРИХИН, Россия) и аморфизированного пирacetама способствовали нормальному функционированию клеток культуры *Paramecium caudatum* (рис.3).

Аморфизированный пирacetам по сравнению с кристаллической фармацевтической формой препарата оказал больший положительный эффект на рост численности инфузорий. Это объясняется тем, что эта структурно – модифицированная форма пирacetама обладает хорошей растворимостью и

высокой биодоступностью. Обе формы пирacetама защитили клетки от токсического действия ацетата свинца и сульфата меди (рис. 1-2). Выживаемость клеток *Paramecium caudatum* к 20-ым суткам составила более 50%. При воздействии хлорида кадмия на инфузории протекторный эффект пирacetама не установлен.

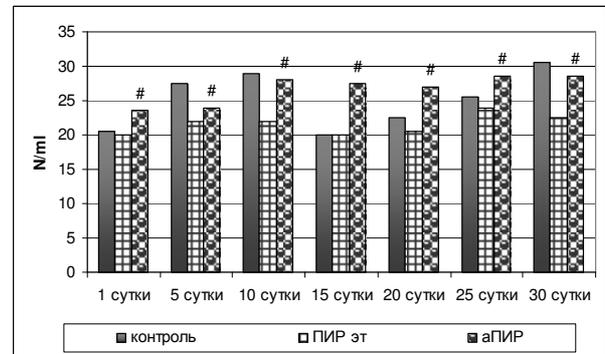


Рис. 3 – Влияние пирacetама на динамику роста культуры *Paramecium caudatum* ПИР эт – раствор лекарственной формы пирacetама; ПИР ам – раствор структурно-модифицированного пирacetама; контроль физ. раствор

Для сравнения в опыте использовался мексидол (2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат) – широко применяемый в медицинской практике синтетический антиоксидант. Мексидол помогает сохранению структурно-функциональной организации биомембран. Механизм действия мексидола определяется прежде всего, его антиоксидантным действием: способностью ингибировать перекисное окисление липидов биомембран и усиливать активность антиоксидантных ферментов [8-9] и мембранопротекторными эффектами: уменьшение вязкости мембраны и увеличение ее текучести, повышение соотношения липид-белок [10].

Добавление мексидола (рис. 4) в среду с *Paramecium caudatum* на протяжении 30 суток положительно влияло на численность клеток.

Значительный рост культуры клеток относительно контроля ( $p < 0,05$ ) был зарегистрирован на 15-20 сутки.

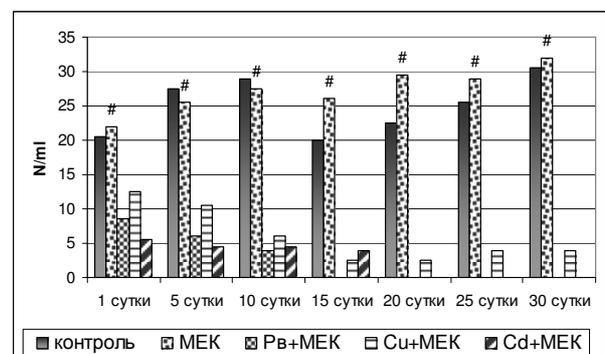


Рис. 4 – Динамика роста культуры *Paramecium caudatum* при внесении в среду солей тяжелых металлов и мексидола

Кроме того, мексидол способствовал защите клеток инфузорий от токсического воздействия ацетата свинца до 10 суток, хлорида кадмия до 15 суток и сульфата меди до 30 суток. Таким образом, в хроническом эксперименте установлено, что два антиоксидантных соединения – пирацетам и мексидол защищали клетки инфузорий от развития окислительного стресса, вызываемого солями тяжёлых металлов. В пробах с антиоксидантом и солью тяжёлого металла отсутствовали особи с патологически изменённой формой клетки - характерной для токсического воздействия металла «вакуолизацией» клеточных мембран. Внесение в среду с парамециями антиоксидантов со специфическим мембрано - протекторным действием оказалось достаточным для предотвращения окисления мембранных липидов, вызывающего гибель клетки.

### Заключение

Высокая чувствительность к химическим соединениям инфузории *Paramecium caudatum* позволяет дать предварительную оценку токсичности ксенобиотиков, вызывающих окислительный стресс, и эффективности антиоксидантных соединений.

Антиоксиданты с мембранопротекторными эффектами значительно уменьшают токсическое действие ионов Cd, Pb и Cu, тем самым способствуя

адаптации одноклеточного организма к окислительному повреждению мембран и органелл, инициируемого воздействием тяжёлых металлов.

### Литература

1. Gaetke L., Chow C., *Toxicol.*, **189**, 147–163 (2003)
2. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford. 2006. 704 p.
3. Бурлакова Е.Б., Мисин В.М., Храпова Н.Г., Завьялов А.Ю. *Антиоксиданты. Термины и определения*. Изд-во РУДН. Москва. 2010. 63 с.
4. Winblad B., *CNS Drug Rev*, **11**, 2, 169–182 (2005)
5. Карпухина О.В., Соловьев А.Г., Гумаргалиева К.З., Иноземцев А.Н., *ж. Хим. физика*, **25**, 5, 77-80 (2006)
6. Карпухина О.В., Гумаргалиева К.З., Бокиева С.Б. Иноземцев А.Н., Кузнецова О.Н., Заиков Г.Е., *Вестн. Казанск.Техн.Унив.* **15**,15,165-167 (2012)
7. Карпухина О.В., Гумаргалиева К.З., Костинова Н.П. , Иноземцев А.Н., Бокиева С.Б. *Динамика химических и биологических процессов, XXI век*. Москва, 2012, С..303-312.
8. Воронина Т.А., *ж. Психофарм. биол. наркол.*, **1**, 2–12 (2001)
9. Bashkatova V, Narkevich V, Vitskova G, Vanin A., *Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychi.*, **27**, 3, 487-492 (2003)
10. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. *Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС*. Изд. Ин-та биомед. химии РАМН, Москва, 1995. 272 с.

© **О. В. Карпухина** - канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. стабильности и устойчивости органических веществ и материалов Института химической физики им. Н.Н.Семёнова РАН, olgakarp@newmail.ru; **К. З. Гумаргалиева** - д-р хим. наук, проф., зав. лаб. стабильности и устойчивости органических веществ и материалов Института химической физики им. Н.Н.Семёнова РАН, stusl@chph.ras.ru; **А. Н. Иноземцев** - д-р биол. наук, рук-ль лаб. эволюции механизмов памяти каф. ВНД МГУ им. М.В. Ломоносова, A\_Inozemtsev@nerobiology.ru; **Г. Е. Заиков** - д-р хим. наук, проф. каф. технологии пластических масс КНИТУ.