

АДАПТАЦИЯ ЖИВОТНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ МЕДИ

¹Климова Е. М., ²Божков А. И. *, ¹Звягинцева О. В., ¹Лавинская Е. В.

¹ГУ «Институт общей и неотложной хирургии НАМН Украины»

²НИИ биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, Харьков, Украина

Работа посвящена исследованию многократных последовательных воздействий различных токсических концентраций серноокислой меди на животные и растительные объекты. В исследовании использовали крыс-самцов линии Вистар и микроводоросли *Dunaliella viridis* Teodor. Показано, что действие стрессорных факторов приводит к формированию адаптивных реакций, имеющих гормезисную и аллостазную природу. Выявлено корригирующее действие иммуотропной субстанции MF на метаболизм животных, что выражалось в снижении интегрального показателя цитотоксичности.

Ключевые слова: серноокислая медь, гормезис, аллостаз, цитотоксичность.

Робота присвячена дослідженню багаторазових послідовних впливів різних токсичних концентрацій сірчаноокислої міді на тваринні та рослинні об'єкти. У дослідженні використовували шурів-самців лінії Вістар і микроводорості *Dunaliella viridis* Teodor. Показано, що вплив стресорних чинників призводить до формування адаптивних реакцій, що мають гормезисну та аллостазну природу. Виявлено коригуючий вплив імуотропної субстанції MF на метаболізм тварин, що виражалося у зниженні інтегрального показника цитотоксичності.

Ключові слова: сірчаноокисла мідь, гормезис, аллостаз, цитотоксичність.

The work is devoted to the study of multiple successive impacts of different toxic concentrations of copper sulphate on animal and plant facilities. In a study using rats Wistar male and microalgae *Dunaliella viridis* Teodor. It has shown that the effect of stress factors leads to the formation of adaptive reactions possessing hormesis and allostasis nature. It has revealed the corrective action of immunotropic substance MF on the metabolism of animals that was expressed in the reduction of the integral index of cytotoxicity.

Key words: copper sulphate hormesis, allostasis, cytotoxicity.

Введение. Поддержание постоянства внутренней среды (гомеостаз) и ее динамического баланса (аллостаз, гормезис) является неотъемлемым свойством жизнедеятельности организма. Обеспечение этих процессов невозможно не только без обмена вещества и энергии, но и без передачи информации [1,2]. Известно, что существует тесная, сложная связь между нервной, эндокринной и иммунной системами. Это обуславливает сложность

♥ Климова Е. М., Божков А. И., Звягинцева О. В., Лавинская Е. В., 2013

функціонування тонких механізмів, при яких происходит отклонение от физиологической нормы в условиях адекватного течения генерализованного адаптационного синдрома в условиях различных патологических процессов (воспалительные реакции, аллергические реакции, аутоиммунные патологии) [3]. Вместе с тем многие изменения в указанных системах, являясь общими, могут быть объяснены с точки зрения «аллостатической перегрузки» и гормезиса [4]. Т.е., аллостаз — это состояние готовности организма к изменениям, гормезис приводит к динамическим изменениям стратегии адаптации, в то время как гомеостаз — сохранение внутренней целостности организма и стабильного метаболизма [5].

В отечественных и зарубежных работах рассматриваются различные проявления гормезиса. Так, одни авторы развивают концепцию о том, что гормезис — это стимуляция какой-либо системы организма внешними воздействиями, имеющими силу, недостаточную для проявления вредных факторов. Как известно, этот термин введен С. М. Southam и J. Ehrlich в 1943 г. [6], однако первые предположения о существовании

гормезиса были выдвинуты Н. Schulz и R. Arndt в 1880 году при исследовании действия токсинов на дрожжи. Исследователи заметили, что низкие дозы токсинов стимулируют дрожжи, средние дозы — ингибируют, а высокие дозы — приводят к гибели. Таких же результатов достигли и наши современники [7-9]. Гормезис могут вызывать токсины, лекарства, вредные факторы окружающей среды и др. [7,8].

Работы других авторов указывают на то, что стимулирующие гормезис соединения инициируют адаптивную стресс-реакцию, обеспечивающую формирование устойчивости клеток и организмов к высоким (обычно губительным) дозам того же агента [5]. Теоретически гормезис может быть представлен единым или несколькими механизмами, позволяющими клеткам, подвергшимся стрессорному воздействию, избежать физиологического старения и гибели и, соответственно, потенциально способен оказывать определенное влияние на патофизиологию и физиологию старения в целом. Таким образом, эффект подходов, которые, согласно имеющимся данным, увеличивают продолжительность жизни многих видов, например, низкокалорийная диета [10,11], может быть обусловлен запуском механизмов гормезиса [12,13].

Аллостаз — состояние организма, которое формируется при многократном (хроническом) воздействии стрессовых факторов. Через аллостаз метаболизм, нервная, сердечно-сосудистая, иммунная системы защищают организм, отвечая на стрессорные воздействия [14]. При этом компенсаторным результатом является аллостатическая нагрузка, возникающая в результате постоянной или повторяющейся активации выделения гормонов стресса (медиаторов аллостаза). Повышенное содержание аллостатических медиаторов через время может привести к накоплению аллостатического груза, маркерами которого являются: активация симпатической нервной системы, увеличение уровня стрессовых гормонов, повышение артериального давления, дисбаланс в системе перекисное окисление липидов — антиоксидантная защита, формирование нестабильного профиля обмена веществ, психологические и психоэмоциональные нарушения [15].

Таким образом, целью работы явилось определение проявления эффектов гормезиса и аллостаза к действию токсических концентраций ионов меди у животных и растительных объектов.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на 3-месячных крысах-самцах линии Вистар (всего 40 животных). Определили летальную дозу сернокислой меди — 3 мг/100 г массы животных. Использовали различные схемы введения сернокислой меди: одноразовое введение 1 мг/100 г, и через 24 часа тем самым животным вводили летальную дозу 3 мг/100 г; два предварительных введения по 1 мг/100 г с интервалом между введениями 48 часов с последующим введением летальной дозы; три и четыре предварительных введения малых доз — 1 мг/100 г с последующим введением летальной дозы.

Культивирование резистентного к ионам меди штамма *Dunaliella viridis* Teodor. осуществляли путем внесения в культуральную среду Артари CuSO_4 к конечной концентрации 20 мг/л. Этот штамм поддерживается больше 10 лет в НИИ биологии ХНУ им. В.Н. Каразина.

Для оценки коррекции иммунной системы после действия сернокислой меди крысам перорально вводили (ежедневно на протяжении 5 дней в объеме 0,2 мл на 100 г массы тела) иммуностропную субстанцию MF, которая представляет собой гликопротеиновую олигопептидную композитную субстанцию.

Исследование цитотоксических факторов в сыворотке крови животных после действия на них сернокислой меди проводили с использованием клеточной тест-системы на основе альгологически чистой культуры *D. viridis* [16]. По изменению ответной реакции клеток *D. viridis* после их совместной инкубации с исследуемой сывороткой крови экспериментальных животных проводили оценку влияния цитотоксических компонентов на тест-систему. Учитывали изменение морфологических (изменение формы

клеток) и функциональных (изменение направления движения, утрата подвижности, потеря жгутика, образование агрегатов) характеристик клеток. Рассчитывали показатели цитотоксичности — коэффициент спонтанной цитотоксичности $K_{СП}$ и коэффициент индуцированной цитотоксичности $K_{Ц}$ [17].

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 6.0.

Результаты исследований. Установлено, что предварительные внутрибрюшинные введения животным сернокислой меди в дозе 33% от летальной дозы формировали стойкость у этих животных к последующей летальной дозе [18]. Проявление гормезисного эффекта у животных зависело от количества предварительных введений малых доз. Наибольший эффект проявлялся после трех последовательных введений малых доз с интервалом 48 часов между введениями, в этом случае выживало 80 – 90% животных. Увеличение предварительных введений до 4-5 сопровождалось резким уменьшением гормезисного эффекта.

Внесение в среду культивирования *D. viridis* сернокислой меди до конечных концентраций 10 и 20 мг/л сопровождалось торможением скорости деления клеток и гибели части клеток. Однако если продолжать культивирование клеток *D. viridis*, которые выжили при этих условиях, то через 7–14 пассажей культура начинала активно пролиферировать и через 20–25 пассажей не отличалась по интенсивности роста от контрольной культуры (рис. 1, 2).

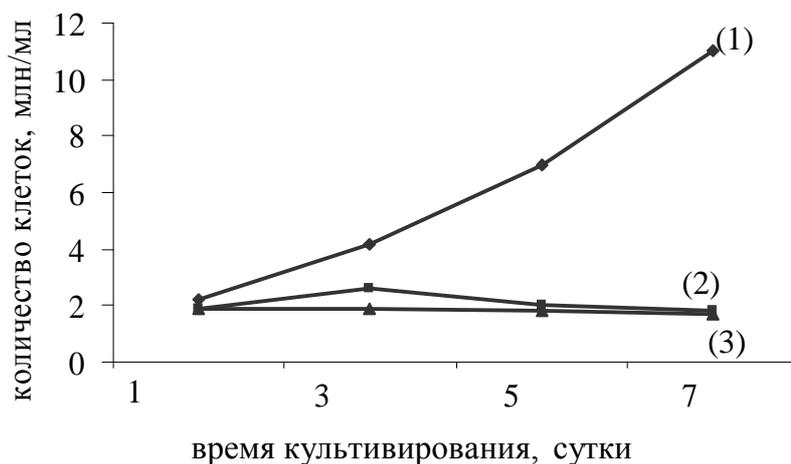


Рис. 1. Количество клеток *D. viridis* в процессе культивирования в контрольном варианте (1) и после внесения в культуральную среду 10 мг/л (2) и 20 мг/л (3) сернокислой меди, $n = 3$.

Следовательно, длительное культивирование клеток *D. viridis* на среде с токсическими концентрациями меди сопровождается индукцией резистентности к ионам меди. Если в культуре *D. viridis*, адаптированной к росту на среде с 20 мг/л сернокислой меди, внести летальную концентрацию 75–100 мг/л, то такая культура продолжала рост так же, как и контрольная культура (рис. 3).

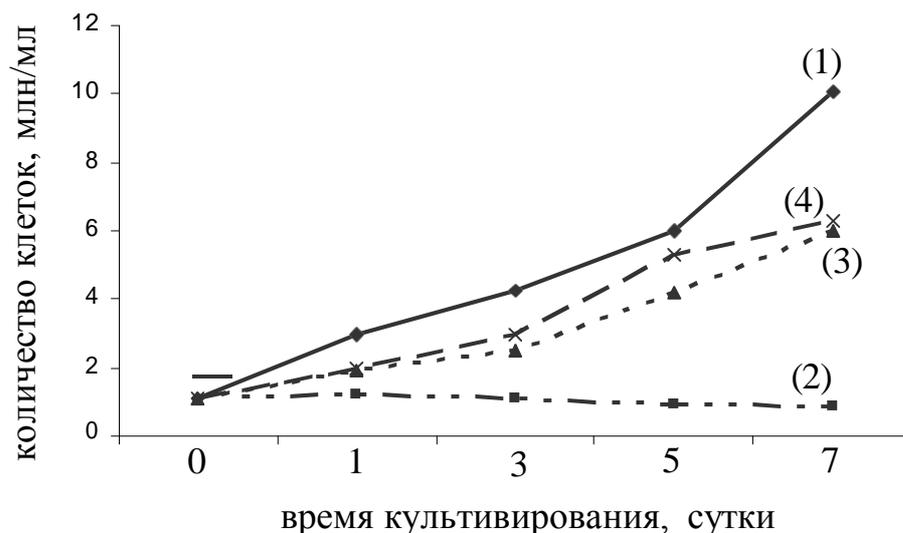


Рис. 2. Динамика роста *D. viridis* в контрольном варианте (1) и после первого внесения в культуральную среду 10 мг/л сернокислой меди (2), после 7 последующих внесений (3) и 14-ти последующих внесений (4) сернокислой меди, $n = 4$.

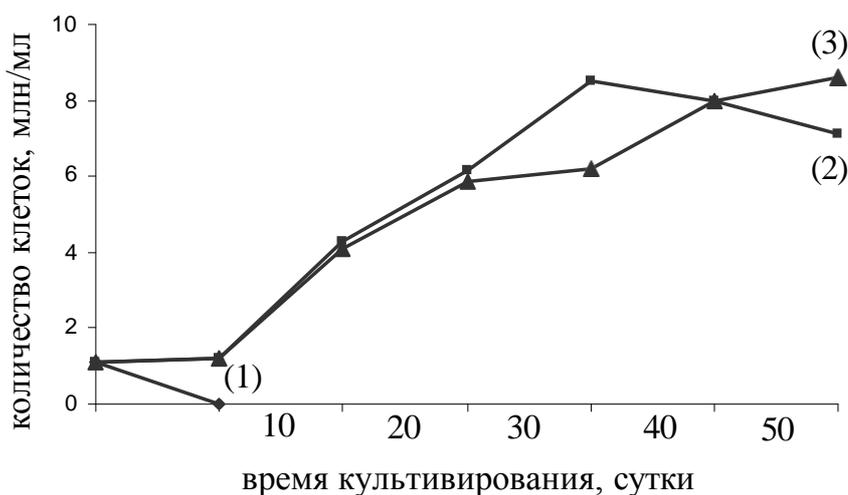


Рис. 3. Количество клеток *D. viridis* в контрольном варианте 75 мг/л сернокислой меди (1) и без сернокислой меди (2), после внесения 75 мг/л сернокислой меди в культуру, предварительно адаптированную к росту на 20 мг/л сернокислой меди, $n = 5$.

Таким образом, адаптация *D. viridis* к высоким концентрациям ионов меди объясняется проявлением гормезисного эффекта так же, как у животных, который зависит от количества предшествующих воздействий малых доз. Это связано с тем, что в это время происходят изменения в скорости синтеза ДНК, РНК и белков, что приводит к изменению содержания различных типов РНК и белков.

Эффекты аллостаза у животных после действия сернокислой меди оценивали опосредовано по ответной реакции клеточной тест-системы *D. viridis* (табл. 1).

Таблица 1. Морфо-функциональные изменения клеток *D. viridis* в сыворотке крови экспериментальных животных

| Группы | Морфо-функциональные характеристики клеток <i>D. viridis</i> | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| | Морфологические изменения (%) | Функциональные изменения (%) | Частота встречаемости агрегатов (%) | К _ц , усл. ед. (при К _{сп} = 3,45) |
| Сыворотка крови интактных животных | 8,4±0,7 | 9,4±2,6 | 0 | 0,78±0,09 |
| Сыворотка крови животных, которым вводили субстанцию MF | 9,3±0,7 | 13,7±4,5 | 0 | 1,2±0,1* |
| Сыворотка крови животных, которым вводили серноокислую медь | 22,3±4,3* | 43,4±5,9* | 16,9±3,3 | 6,98±0,29* |
| Сыворотка крови животных, которым вводили субстанцию MF и серноокислую медь | 12,0±2,3* | 40,3±2,6* | 7,5±2,0 | 4,8±0,4* |

Примечание: * — достоверность различия с контролем $P \leq 0,05$

После действия сыворотки крови интактных животных выявили минимальное количество морфологических (8,4±0,7%) и функциональных (9,4±2,6) изменений клеток тест-системы *D. viridis*. Коэффициент цитотоксичности составил 0,78±0,09 усл. ед. Введение иммуностропной субстанции MF приводило к незначительному увеличению коэффициента цитотоксичности до 1,2±0,1 усл. ед.

На фоне введения серноокислой меди выявили достоверное увеличение количества округлых клеток (в 2,4 раза) и неподвижных клеток (в 3,2 раза) по сравнению с введением только иммуностропной субстанции MF. Также после действия сыворотки крови животных, которым вводили серноокислую медь, было выявлено появление микро- и макроагрегатов, частота которых составляла в среднем 16,9±3,3%. Коэффициент цитотоксичности в данной группе возрос в 5,8 раза по сравнению с группой животных, которым вводили иммуностропную субстанцию MF, и в 9 раз по сравнению с контрольной группой животных. Совместное введение животным субстанции MF и серноокислой меди приводило к некоторому снижению цитотоксического действия на клетки тест-системы *D. viridis*. Так, было выявлено в 1,9 раза снижение морфологически измененных клеток, в 1,1 раза — функционально измененных клеток, и в 2,6 раза — уменьшение количества агрегатов. Коэффициент цитотоксичности снижался, таким образом, в 1,5 раза по сравнению с группой животных, которым вводили серноокислую медь.

Метод биоиндикации с использованием клеточной тест-системы *D. viridis* позволил наглядно продемонстрировать различное накопление цитотоксических компонентов в сыворотке экспериментальных животных в условиях хронического отклонения активности регуляторных систем от их нормального функционирования (введение серноокислой меди) с последующим установлением новых параметров активности.

Выводы

1. Выявлено, что последовательные многократные внесения серноокислой меди в среду культивирования *D. viridis* или внутрибрюшинное введение ее животным сопровождалось формированием стойкости к летальным дозам данного токсиканта. Формирование адаптивного ответа имеет гормезисную природу у животных и растительных объектов.

2. Выявлено достоверное увеличение коэффициента цитотоксичности в 9 раз по сравнению с контролем после действия сыворотки крови животных, которым вводили

серноокислу медь. Совместное введение серноокислой меди и иммуностропной субстанции MF приводило к снижению данного показателя в 1,5 раза, что можно рассматривать как иммунокорригирующее действие субстанции.

3. На различных экспериментальных моделях показано, что стрессовые нагрузки переводят организм в новое состояние, при котором происходят компенсаторные процессы для поддержания определенной степени стабильности функционирования животных и растительных объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sterling P. Allostasis, A New Paradigm to Explain Arousal Pathology. In: Fisher S, Reason J, editors. Handbook of Life Stress, Cognition and Health / Sterling P, Eyer J. // New York: John Wiley & Sons; 1988. — P. 629–649.
2. Seeman T. E. Social relationships, gender, and allostatic load across two age cohorts / Seeman T.E., Singer B. H., Ryff C.D. et. al. // Psychosom. Med. — 2002; V 64. — P. 395–406.
3. McEwen B.S. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor, allostasis and allostatic load / McEwen B.S. // Metabolism. — 2006; V. 55. — P. 20–23.
4. McEwen B.S. The concept of allostasis in biology and biomedicine / McEwen B.S., Wingfield J.C. // Horm. & Behav. — 2003; V.43 — P. 2–15.
5. Martins I. Hormesis, cell death and aging / Martins I., Galluzzi L. Kroemer G. // Aging. — 2011, V. 3 (9). — P. 821–828.
6. Southam C. M. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture / C. M. Southam, J. Ehrlich // Phytopathology. — 1943. — V. 33. — P. 517–524.
7. Schumacher B. Transcription-blocking DNA damage in aging: a mechanism for hormesis / B. Schumacher // BioEssays. — 2009. — V. 31, (12). P. 1347–1356.
8. Calabrese E. J. Hormesis in high-throughput screening of antibacterial compounds in E. Coli / Calabrese E. J., Hoffmann G. R., Stanek E. J., Nascarella M. A. // Human & experimental toxicology. — 2010. — V. 29, (8). P. 667–677.
9. Scott B. R. [Sparsely Ionizing Diagnostic and Natural Background Radiations are Likely Preventing Cancer and Other Genomic-Instability-Associated Diseases](#) / Scott B. R., Di Palma J. // Dose Response. — 2006. — V. 5 (3). — P. 230–255.
10. Blagosklonny M. V. Linking calorie restriction to longevity through sirtuins and autophagy: any role for TOR / Blagosklonny M. V. // Cell Death & Disease. — 2010. — 1, e. 12. — doi: 10.1038/cddis.2009.17.
11. Morselli E. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. / Morselli E., Galluzzi L., Kepp O. et al. // Biochim Biophys Acta. — 2009. — V. 1793. — P. 1524–1532.
12. Kouda K., Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health / Kouda K., Iki M. // J. Physiol Anthropol. — 2010. — V. 29. — P. 127–32.
13. Calabrese E. J. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance / Calabrese E. J., Mattson M. P., Calabrese V. // Hum Exp Toxicol. — 2010. — V. 29. — P. 980–1015.
14. McEwen B.S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators / McEwen B.S. // European J. of Pharmacology. — 2008. — V.583 (2-3). — P. 174–185.
15. Metzger D.S. Drug treatment as HIV prevention: a research update / Metzger D.S., Woody G.E., O'Brien C.P. // J. Acquir. Immune. Defic-Syindr. — 2010. — V. 55 (1). — P. 32–36.
16. Пат. UA № 19128, A61B10/00, G01N33/49. Процес діагностики і прогнозу клінічного перебігу патологічного процесу / Клімова О. М., Божков А. І., Бойко В. В. — Заявл. 24.02.2006; Опубл. 24.02.2006, Бюл. № 12.
17. Пат. UA № 08958, G01N33/15, C12Q1/04, C12M1/34. Спосіб біосенсорної індикації цитотоксичних факторів біологічної і хімічної природи / Клімова О. М., Божков В. В., Бойко В. В., Кордон Т. І., Дроздова Л. А., Лавінська О. В. — Заявл. 28.08.2009; Опубл. 10.03.2010, Бюл. № 5.
18. Ростам Ш. индуцированное агрегирование клеток *Dunaliella viridis* Teodor. полуплетальными концентрациями ионов меди в культуре / Ростам Ш., Божков А. И., Голтвянский А. В. // Альгология. — 2010, Т.20 (2). — С. 151–166.