

ГБОУ ДО СО СОЦДЮТТ Детский технопарк «Кванториум» г. Тольятти

«Влияние генотоксических канцерогенов в виде тяжёлых металлов
на одноклеточные организмы в лабораторных условиях»

Выполнила:

Кузьмина Карина Алексеевна

ГБОУ ДО СО СОЦДЮТТ

1 ПР-4 Нано. Проектный модуль.

Педагог дополнительного образования:

Ротарь Юрий Михайлович

ГБОУ ДО СО СОЦДЮТТ

Тольятти, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. Теоретические основы о канцерогенезе.....	4
2. Генотоксические канцерогены.....	5
3. Канцерогенное воздействие тяжёлых металлов на одноклеточные организмы.....	6
3.1. Материалы и методы.....	7
3.2. Результаты.....	8
4. Обсуждение.....	13
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	11
ИСТОЧНИКИ.....	12

ВВЕДЕНИЕ

Аннотация. Химические или биологические факторы, способные вызывать образование и размножение злокачественных клеток, разнообразны как с точки зрения активности, так и механизмов действия, что приводит к сложности оценки риска развития злокачественных новообразований. Генотоксические канцерогены индуцируют канцерогенез за счет непосредственного изменения генетического материала в клетках. 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.

Целью работы является выявление одноклеточных организмов, реагирующих на «следовые» концентрации тяжёлых металлов, а также способных быть объектом для разработки методов биотестирования и биоиндикации. Обсуждаются механизмы действия генотоксических канцерогенов. Приведена терминология, используемая в литературе для описания генотоксических (мутагенных) и канцерогенных факторов.

В дальнейших исследованиях планируется работа с расширением базы благоприятных и агрессивно воздействующих (канцерогенных) металлов на одноклеточные организмы.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ О КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Химические канцерогены ответственны за возникновение до 80-90% всех злокачественных опухолей человека. Канцерогенез в настоящее время большинством исследователей рассматривается как многостадийный процесс, в котором следует различать 3 главные стадии: *инициацию, промоцию и прогрессию*. Принято считать, что существуют 2 типа агентов, различающиеся по механизмам своего действия:

- 1) инициаторы - действие необратимо;
- 2) промоторы - обратимо до определённого момента.

Оказалось, что большинство «сильных» канцерогенов обладают и иницирующими, и промоторными свойствами, а все промоторы, за редкими исключениями, проявляют канцерогенную активность, если их применять в высоких дозах и достаточно долго. Деление на инициаторы и промоторы в определённой степени соответствует делению канцерогенов на генотоксические и негенотоксические. В этой работе я буду рассматривать влияние генотоксических (мутагенных) канцерогенов.

Табл. 1. Механизм действия генотоксических канцерогенов:



(Источник: Химический канцерогенез Г. А. Белицкий, д.м.н., профессор, лаборатория методов скрининга канцерогенов)

2. ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ КАНЦЕРОГЕНЫ

Генотоксические канцерогены — химические соединения, при взаимодействии которых с компонентами ДНК, могут возникать повреждения и мутации генома клетки.

Соединения этого класса взаимодействуют с компонентами генома клетки, вызывая мутации ДНК. Мутации приводят к изменению свойств продуктов генов, что в конечном итоге вызывает нерегулируемый рост потомков этих клеток. Генотоксические вещества могут быть разделены на 2 группы: *прямодействующие канцерогены* и соединения, не канцерогенные в исходной форме, но активирующиеся в клетке под действием соответствующих ферментов — *непрямые канцерогены*.

1. Канцерогены прямого действия при растворении (в первую очередь, в воде) распадаются с образованием высокоактивных производных, содержащих избыточный положительный заряд (электрофильную группу).
2. Канцерогены непрямого действия являются малореакционноспособными соединениями. в 1956 г. супруги Миллер (J. and E. Miller) высказали предположения, что эти вещества в процессе метаболизма подвергаются ферментативной активации с образованием высокоактивных электрофильных метаболитов, способных взаимодействовать с нуклеофильными группами ДНК.

В моем исследовании будет проводиться эксперимент по канцерогенному воздействию на одноклеточные организмы металлов:

Табл. 2

1.	Cu
2.	Mn
3.	Ni
4.	Zn
5.	Fe (средней тяжести)

3.1. КАНЦЕРОГЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Тяжёлые металлы являются широко распространёнными экотоксикантами, потенциально опасными для всех живых организмов. Одной из причин токсических эффектов тяжёлых металлов является вызванный ими окислительный стресс – процесс повреждения клеток организма в результате окислительных реакций. Повышенный уровень АФК в клетке помогает запуску цепных реакций окислительной деградации биомолекул, вызывают перекисное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран, что способствует нарушению их структуры и повышению проницаемости. В клетке существуют специальные ферментные и неферментные антиоксидантные системы защиты от свободных радикалов. Определение веществ, чьё действие направлено на нормализацию метаболических процессов, на блокирование патологических свободно-радикальных процессов, является важным звеном в исследованиях механизмов адаптации организмов к воздействию токсикантов.

Одноклеточные инфузории имеют относительно их размеров большую поверхность соприкосновения с внешней средой, сразу же вступают в контакт с токсикантом, реагируя на химическое действие целым комплексом биологических, физиологических и биохимических изменений: хемотаксисом, реверсией ресничной активности, скоростью размножения. Многие гидробионты к тому же обладают фильтрационным типом питания, что повышает вероятность накопления ими веществ - токсикантов и повышает эффект их воздействия на организм.

3.2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовалась следующая методика:

- 1) Нанести на дно Чашки Петри масштабную сетку.
- 2) Просверлить отверстия у дна Чашки Петри.
- 3) Приготовить агар (3,18 на 100 мл).
- 4) Залить агар в наконечники.
- 5) Добавить экспериментальное вещество и питательные вещества в виде пептона.
- 7) Добавить каплю воды в наконечники.
- 8) Закрыть пластилином.
- 9) Загерметизировать воском и вставить наконечники в Чашку Петри, а затем приклеить.
- 10) Концы наконечников обрезать.
- 11) Залить агар в Чашку Петри и закрепить в держатель.

Исследования проводились в лабораторных условиях Детского технопарка «Кванториум». В качестве субстрата обрастания использовался 10 % полиакриламидный гель. Подложкой для геля служили пластиковые Чашки Петри диаметром 40 мм, с нанесенной на дне чашки с наружной стороны координатной сеткой размерностью 5 x 5 мм. В качестве экспериментальных веществ использовались соли металлов. Экспериментальные вещества вносили «точечным» способом. При этом в субстрат одновременно можно ввести от 1 до 10 - 12 веществ. В экспериментах Чашки Петри размещали попарно (дно к дну) в рамки, которые помещали либо в мезокосм, либо в единую кассетную конструкцию и затем, в виде подвески, в природную среду.

После экспонирования чашек (от 3-х дней до месяца) в водной среде для изучения видового состава использовались прижизненные и цитогистохимические методы исследования. Оценка изменений в количественном развитии сообщества, морфологии организмов и содержании экспериментальных веществ в субстрате и организмах проводилась после фиксации субстрата с организмами в 4 % формалине. При подсчёте каждая клетка сетки (5x5) зрительно делилась на 4-е квадрата. Для предотвращения миграции металлов использовалась обработка раствором сульфида натрия и/или сероводородом. Электронно-микроскопические методы фиксации и подготовки объектов были использованы для рентгеноструктурного анализа.

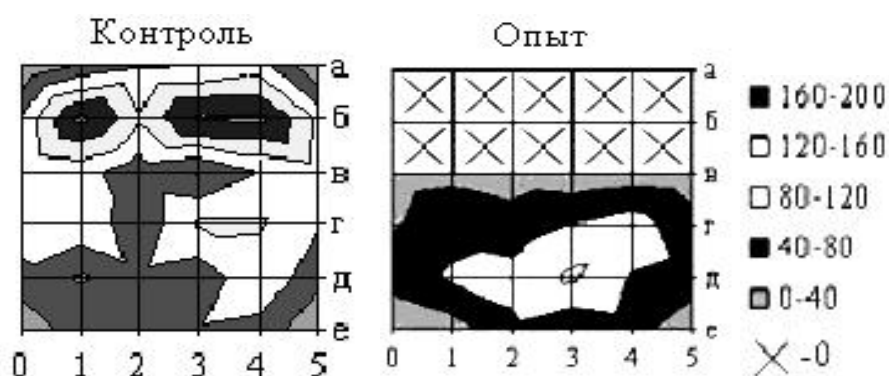
3.3. РЕЗУЛЬТАТЫ

При экспозиции субстратов в лабораторных условиях массовыми организмами в обрастании были прикрепленные инфузории различных родов (*Vorticella*, *Zoothamnium*, *Carchesium*, *Dendrosoma*, *Acineta*, *Metacineta*, *Heliophria*), занимающие различные ярусы обрастания. Они составляли 62-98% по численности и 24-75 % по биомассе от всех прикрепленных организмов перифитонного сообщества (бактерии и водоросли в расчётах не использовались).

Таксономическая структура сообщества прикрепленных перифитонных инфузорий подвержена сезонным изменениям, за исключением представителей рода *Vorticella*. Они всегда присутствуют в обрастании.

В экспериментах по влиянию ионов меди на развитие инфузорий рода *Vorticella* наблюдалась зависимость пространственного распределения от «точек» внесения ионов металла и времени экспозиции субстрата в водной среде. Тенденция заселения субстрата при различных выдержках (10 и 20 дней) характеризовалась изменением зоны начала обрастания от 10-15 мм (10 дней экспозиции) до 7 - 10 мм (20 дней экспозиции) от точки внесения токсиканта (Схема 1).

10-дневная экспозиция:



20-дневная экспозиция:

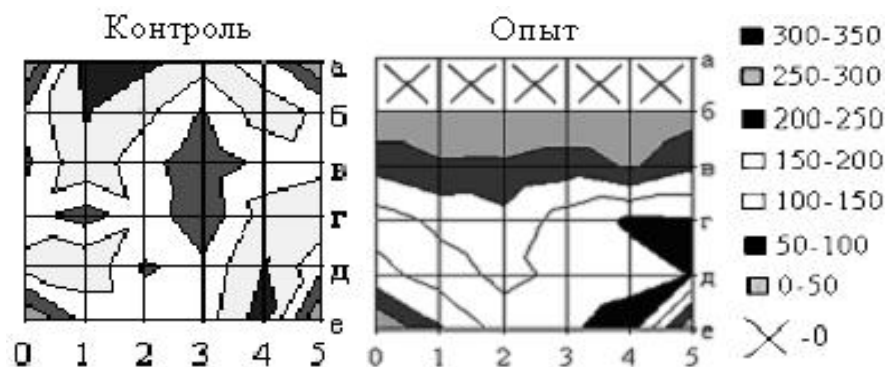
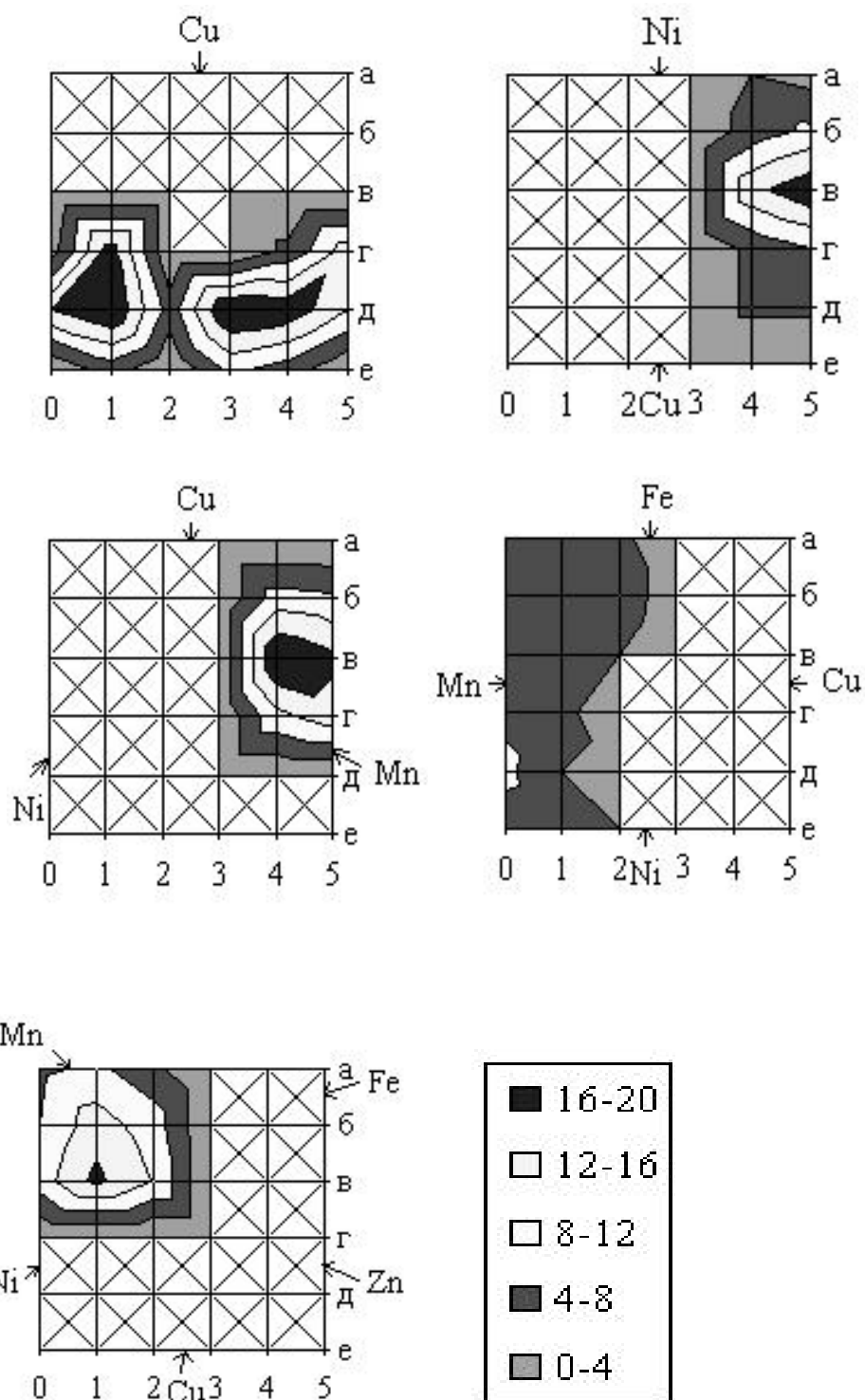


Схема 1. Пространственное распределение инфузорий рода *Vorticella* в экспериментах по влиянию меди на развитие перифитонных организмов при экспозиции субстратов 10 и 20 дней.

В опыте №1 мы наблюдаем реакцию инфузорий рода *Vorticella* на введение генотоксического металла-Сu. На схеме №1 видно, как популяция со стороны введения металла в течении 10 дней погибла, а оставшаяся, более устойчивая, сместилась на другой край Чашки Петри. После 20-дневной выдержки популяция размножилась и заселила собой половину заражённого участка.

В экспериментах с увеличением количества токсических факторов наблюдается похожая картина. При этом отмечается чёткое влияние биогенных (химических элементов, постоянно входящих в состав организмов и выполняющих определённые биологические функции) металлов (Fe, Mn) на пространственное распределение организмов, что отражается в пространственном распределении. С увеличением количества токсических факторов инфузории развиваются только в районах внесения биогенных металлов. Точки внесения Mn более благоприятны для развития инфузорий при усилении токсической нагрузки, что наблюдается при внесении Zn в 5-ти факторный эксперимент (Схема 2).

Опыт:



Контроль:

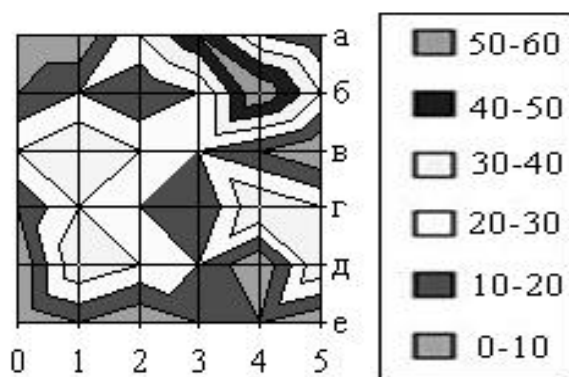


Схема 2. Пространственное распределение инфузорий рода *Vorticella* в многофакторных экспериментах при экспозиции субстратов в течение 15 дней.

В опыте № 2 база исследуемых инфузорий и генотоксических металлов увеличивается. Можно наблюдать чёткое влияние биогенных металлов. На схеме № 2.1, после введения Cu, погибает ровно половина исследуемых инфузорий.

На схеме № 2.2. мы вводим уже комплекс из двух металлов-Ni и Cu. Их парное влияние отражается более большим поражением популяции инфузорий.

На схеме № 2.3. мы вводим под тупым углом комплекс из двух генотоксических (Ni,Cu) и одного биогенного металла (Mn). Можно наблюдать, как два генотоксических металла в совокупности убивают большую численность инфузорий, но в свою очередь биогенный металл способствует поддержанию жизненных процессов у оставшейся части.

После введения комплекса из двух генотоксических и двух биогенных металлов в каждом из 4-х углов Чашки Петри, на схеме № 2.4, становится видно, как парное действие биогенных металлов в виде Fe и Mn помогает более адаптированным инфузориям продолжать жить.

И наконец, на схеме № 2.5. мы вводим комплекс из трёх генотоксических и двух биогенных металлов. Значительное снижение живых инфузорий обусловлено тем, что Zn является металлом, проявляющим более сильные генотоксические свойства, подавляя в свою очередь биогенные свойства Fe. Но в связи с тем, что Mn введен достаточно далеко от Zn, он продолжает оказывать влияние на оставшихся, самых стойких инфузориях.

Исследование содержания металла в субстрате, проведённое с помощью спектрометра, не дало положительных результатов. Использование сканирующего микроскопа позволило только зарегистрировать наличие металлов в субстрате и

организмах. В субстрате металлы присутствовали на расстоянии до 1,5 мм от «точечного» введения металла, причем в только глубинных (максимально отдалённых от поверхности) слоях субстрата. В инфузориях металлы регистрировались по всей плоскости субстрата, что согласуется с фактами биологической аккумуляции тяжёлых металлов. Количественное развитие инфузорий в контроле и опыте характеризуется уменьшением численности организмов в опыте минимум на порядок.

Предварительные цитогистохимические исследования морфологии инфузорий, выявили изменения в кортикальных структурах и ядерном аппарате организмов, развивающихся в зоне близкой к границе перехода - отсутствие/наличие организмов.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существуют ГОСтированные методики определения уровня загрязнения с помощью инфузорий *Paramecium caudatum*. Все инфузории так или иначе являются самыми чувствительными из одноклеточных эукариот, соответственно в нашем распоряжении оказывается не один род, а целых 6 родов для подробного исследования.

После эксперимента №1 можно сделать вывод о том, что инфузории рода *Vorticella* приспособились к высокой концентрации меди в субстрате.

Об эксперименте №2 можно выделить то, что отдельно каждый из биогенов стимулирует рост, а если взять два биогена, то они начинают тормозить, проявляется синергетический эффект (одно вещество мешает другому работать). Такой эффект может быть вызван либо взаимодействием между веществами, либо синтезом одних ферментов блокируется другими ферментами. Есть ферменты зависимые от Fe и Mn и ферменты, которые используя Fe, обладают какими-то механизмами, влияющими на усваиваемость Mn и наоборот.

Спектрометр не обнаружил металлы в субстрате, но сканирующий микроскоп выявил их в глубоких слоях, далеко от поверхности. Металлы присутствуют в организмах вблизи места введения, а в инфузориях металлы были обнаружены на всей поверхности субстрата, что подтверждает данное наблюдение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Промежуточные полученные данные свидетельствуют о том, что перифитонные одноклеточные организмы реагируют на «следовые» концентрации (не определяемые количественно с помощью современного оборудования) тяжёлых металлов, что отражается как на количественном и пространственном развитии, так и на морфологических изменениях инфузорий. Это позволяет рассматривать перифитонных инфузорий как удобный объект для разработки методов биотестирования и биоиндикации.

В дальнейшие планы работы входит исследования по влиянию тяжёлых металлов на одноклеточные и многоклеточные организмы в природных условиях. Основными задачами этих экспериментов будет отработка методики и выявление других потенциально опасных металлов и их индивидуальное и комплексное воздействие на состав, численности и морфологию организмов.

ИСТОЧНИКИ

1. Выявление канцерогенных и антиканцерогенных свойств химических веществ методом позитронной спектроскопии Бяков В. М., Степанов С. В.
2. Мутагены и канцерогены в окружающей среде. Новые подходы к оценке риска для здоровья (материалы рабочего совещания, Санкт-Петербург, 22–24 октября 1997 г.) // Под редакцией Инге-Вечтомова С. Г., Худолей В. В. — Санкт-Петербург, 1998.— 171 с.
3. Худолей В. В. Канцерогены: Характеристики, закономерности, механизмы действия / Худолей В. В. — СПб, 1999. — 419 с.
4. Исследования металл-индуцированного окислительного стресса у одноклеточных организмов Карпухина О. В. Гумаргалиева К. З. Иноземцев А. Н.
5. Химический канцерогенез Г. А. Белицкий, д.м.н., профессор, лаборатория методов скрининга канцерогенов.
6. Канцерогенные эффекты тяжелых металлов, вызывающие нарушение регуляции микроРНК: Амир Хоссейн Алами, Мохаммадсалех Хосейнзаде, Парса Хоссейни Манеш, Али Джирьяи Шарахи, Эхсан Каргар Алиабади.