

УДК 574:591.544

Ш. РОСТАМА, А.И. БОЖКОВ, А.В. ГОЛТВЯНСКИЙ

НИИ биологии Харьковского нац. ун-та им. В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, 61022 Харьков, Украина

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ, СВИНЦА И КАДМИЯ НА ИНДУКЦИЮ АГРЕГИРОВАНИЯ КЛЕТОК *DUNALIELLA VIRIDIS* (CHLOROPHYTA)

Исследовано влияние различных концентраций ионов меди, свинца и кадмия на подвижность клеток *Dunaliella viridis* Teodor. и динамику индуцированного агрегирования клеток. Внесение ионов этих металлов в среду культивирования приводило к потере подвижности клеток *Dunaliella* и зависело от концентрации ионов металлов в среде. Однако эта зависимость не имела линейного характера. Процесс обездвиживания клеток развивался во времени в случае ионов меди и свинца, а для ионов кадмия она мало зависела от концентрации и времени. Ионы меди и свинца индуцировали агрегирование клеток, которое зависело от концентрации ионов в среде и времени инкубации. В то же время ионы кадмия не оказывали влияния на индукцию агрегирования клеток. Все ионы металлов можно разбить на две группы: индуцирующие агрегирование и не индуцирующие агрегирование клеток *D. viridis*.

Ключевые слова: *Dunaliella viridis*, индуцированное агрегирование клеток, ионы меди, ионы свинца, ионы кадмия.

Введение

Более 100 лет назад Е.К. Теодореску описал образование клеточных агрегатов у *Dunaliella salina*, которое он наблюдал в природе при изменении концентрации соли в воде, и назвал эти образования пальмеллами (Teodoresco, 1906). В настоящее время известно, что пальмеллевидное состояние — это временная стадия размножения некоторых видов микроводорослей (эвгленовые, золотистые, зеленые и пирофитовые), которая реализуется в неблагоприятных условиях для данного вида водорослей. Во время формирования пальмеллевидных состояний клетки интенсивно экскретируют полисахариды и формируют слизистые скопления (Масюк, 1973).

Наряду с пальмеллевидным состоянием описаны и другие формы клеточных ассоциатов, т.н. пальмеллоидные структуры. Они отличаются довольно крупными ассоциатами клеток, которые прикрепляются к различным субстратам с помощью слизистых тел, которые они формируют (Водоросли, 1989). Хотя эти клеточные ассоциаты различны, для них характерно образование слизистых тел, продуцирующихся клетками в экстремальных условиях и, вероятно, сами условия определяют форму клеточных ассоциатов.

© Ш. Ростам, А.И. Божков, А.В. Голтвянский, 2012

Установлено, что внесение в среду культивирования *D. viridis* 20 мг/л сернокислой меди сопровождается быстрым (в течение нескольких минут) и обратимым агрегированием клеток, без формирования слизистых тел (Божков и др., 2010а). Внесение в среду культивирования *D. viridis* микроколичеств цитотоксических факторов сыворотки крови человека также индуцировало агрегацию клеток, причем клеточные агрегаты различались по наличию или отсутствию слизистых скоплений в зависимости от природы цитотоксических факторов (Божков и др., 2003). Очевидно, различные факторы, проявляющие по отношению к клеткам *D. viridis* цитотоксические свойства, могут индуцировать реакцию агрегирования. В зависимости от особенностей и свойств цитотоксического фактора клетки микроводорослей могут использовать различные стратегии агрегирования, направленные на сохранение их жизнеспособности. Это может проявляться в количестве клеток, входящих в ассоциат, формировании или отсутствии слизистых оболочек, прикреплении к субстрату или сохранении подвижности в составе ассоциата. Вероятно, в основе разных стратегий лежат разнообразные механизмы ассоциации клеток.

Исследование этого уникального явления представляет большой интерес, так как расширяет наши знания о механизмах, а точнее разнообразии механизмов адаптации микроводорослей и может быть использовано в биотехнологии при разработке клеточных биосенсоров (Божков и др., 2002; Климова и др., 2010).

В настоящее время остается неясным, все ли цитотоксические или стресс-факторы для *D. viridis* будут индуцировать агрегирование клеток. Проявляется ли специфичность в характеристике клеточных агрегатов в зависимости от стресс-фактора. Не известны и механизмы индуцированного агрегирования. Существует ли связь между потерей подвижности клеток и формированием клеточных агрегатов.

В данной работе мы определяли динамику индуцированного агрегирования и ее связь с концентрацией ионов тяжелых металлов; наличие связи между обездвиживанием клеток и скоростью образования клеточных ассоциатов. В качестве токсических ионов металлов были выбраны ионы меди свинца и кадмия.

Материалы и методы

В исследовании использовали культуру *D. viridis* var. *viridis* f. *euchlora* Teodor., штамм IBASU-A № 29. Альгологически чистую культуру *D. viridis* выращивали на среде Артари (г/л): NaCl – 116; MgSO₄ – 50; KNO₃ – 2,5; K₂HPO₄ – 0,2, в люминостате при температуре 26–28 °С, в колбах объемом 250 см³, при круглосуточном освещении 6 клк на поверхности культуральной среды. В экспериментах использовали 24-суточную культуру, исходная концентрация клеток при посеве 1,3–1,4 млн кл/мл.

Определение влияния сернокислой меди, уксуснокислого свинца и азотнокислого кадмия на индуцированное агрегирование клеток *D. viridis*.

Контрольную культуру *D. viridis* после завершения экспоненциальной фазы роста и перехода в стационарную фазу, что соответствовало 21–22 суткам роста, переводили на свежую среду Артари (при этом количество клеток всегда составляло 1,3–1,4 млн кл/мл) и вносили водный раствор сернокислой меди $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрации ($0,4 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $4 \cdot 10^{-6}$, $20 \cdot 10^{-6}$, $40 \cdot 10^{-6}$, $80 \cdot 10^{-6}$, $200 \cdot 10^{-6}$, $300 \cdot 10^{-6}$ и $400 \cdot 10^{-6}$ моль/л) уксуснокислого свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \cdot 10^{-6}$; $1,3 \cdot 10^{-6}$; $2,6 \cdot 10^{-6}$, $13,1 \cdot 10^{-6}$, $26,3 \cdot 10^{-6}$, $52,7 \cdot 10^{-6}$, $131,9 \cdot 10^{-6}$, $197,8 \cdot 10^{-6}$ и $263,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л); азотнокислого кадмия $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ до конечных концентраций ($0,3 \cdot 10^{-6}$, $1,6 \cdot 10^{-6}$, $3,2 \cdot 10^{-6}$, $16,2 \cdot 10^{-6}$, $32,4 \cdot 10^{-6}$, $64,8 \cdot 10^{-6}$, $162,1 \cdot 10^{-6}$, $243,1 \cdot 10^{-6}$, $324,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л), т.е. концентрация ионов исследуемых солей металлов в молях на клетку всегда была одинаковой.

Контролем служила культура *D. viridis*, которую также пересевали на свежую среду Артари, но не вносили ионы солей меди, свинца и кадмия. На протяжении эксперимента все варианты культивировали в стандартных условиях.

Спустя 20, 40 мин и 1,5; 4; 24 ч из всех культур отбирали аликвоты и определяли количество одиночных неподвижных клеток, общее количество одиночных клеток. Для этого исследуемые аликвоты культуры *D. viridis* обездвиживали в парах 5 % йода. Подсчитывали общее количество одиночных неподвижных клеток, выявленных после внесения исследуемой соли металла, вычитали их из исходного (1,3–1,4 млн/мл) и получали количество клеток в агрегатах.

Индуцированное агрегирование, подвижность клеток водорослей *D. viridis* устанавливали визуально под микроскопом при увеличении $\times 150$; $\times 200$ в камере Горяева.

Содержание ионов меди, свинца и кадмия в клетках *D. viridis* определяли атомно-адсорбционным методом, как описано ранее (Божков и др., 2010б). Для оценки степени связывания ионов меди, свинца и кадмия с поверхности клеток после 20-минутной инкубации с 50 мг/л соответствующих солей 3 раза промывали средой Артари и осаждали их при 3000 g в течение 10 мин. Затем определяли содержание ионов меди, свинца и кадмия в составе клеток адсорбционным методом.

Все эксперименты повторяли 3–5 раз, результаты обрабатывали статистически, используя непараметрические методы анализа (Гублер, Генкин, 1973).

Результаты

Влияние различных концентраций ионов меди на подвижность и индуцированное агрегирование клеток *D. viridis*. Как известно, *Dunaliella* относится к подвижным микроводорослям, что обеспечивает ей возможность достаточно быстро реагировать на изменение освещенности, тепловых, химических и др. характеристик среды (Посудин и др., 2004).

Внесение токсических веществ в среду может влиять на подвижность клеток *D. viridis* вплоть до полной потери их подвижности. В контрольной культуре клеток, как правило, от 1 до 10 % клеток могут быть неподвижными, что характеризуется состоянием культур (рис. 1). Внесение в среду культивирования даже $0,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л сернокислой меди сопровождалось потерей подвижности большого количества клеток, к которое линейно увеличивалось во времени. Так, спустя 20 мин 17 % клеток было неподвижным и их количество линейно увеличивалось на протяжении 1,5 ч, достигая 60 %. В дальнейшем этот показатель увеличивался с меньшей скоростью и к 24-му часу экспозиции 73 % клеток в культуре были обездвижены (см. рис. 1). Увеличение концентрации сернокислой меди в 5 раз (до $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) оказывало такой же эффект обездвиживания, как и при $0,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л, т.е. отсутствовала явная связь между концентрацией ионов меди и подвижностью клеток.

При увеличении концентрации сернокислой меди до $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л, т.е. в 10 раз, обездвиживание клеток наступало быстрее и уже через 20 мин почти 40 % клеток были неподвижными. Однако их количество увеличивалось не так быстро, как при концентрациях $0,4 \cdot 10^{-6}$ и $2,0 \cdot 10^{-6}$, и через 1,5; 4 и 24 ч этот показатель был одинаковым для концентраций $0,4 \cdot 10^{-6}$ и $4,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Увеличение концентрации сернокислой меди до $20 \cdot 10^{-6}$ моль/л приводило к потере подвижности 80 % клеток *Dunaliella* в культуре уже через 20 мин, а начиная с концентрации $40 \cdot 10^{-6}$ и более все клетки были неподвижными (см. рис. 1).

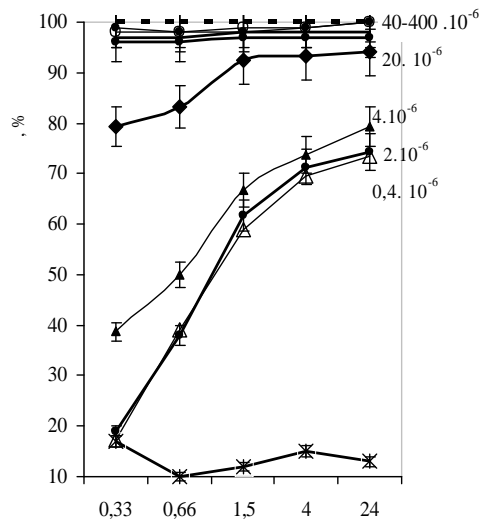


Рис. 1. Изменение количества неподвижных клеток *Dunaliella viridis* после внесения в среду различных концентраций $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в зависимости от времени культивирования

Следовательно, внесение $0,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л сернокислой меди, которое не влияло на интенсивность размножения в культуре, сопровождалось потерей подвижности 17 % клеток и их количество увеличивалось во времени. Между количеством обездвиженных клеток и концентрацией сернокислой меди нет прямой корреляции и, начиная с концентрации сернокислой меди $40 \cdot 10^{-6}$ моль/л и более, все клетки в культуре были неподвижными. Можно заключить, что подвижность клеток *Dunaliella* является очень чувствительным показателем к наличию ионов меди в среде.

В следующей серии экспериментов определяли временную зависимость индуцированного агрегирования клеток *Dunaliella* при разных концентрациях сернокислой меди. В контрольном варианте клеточные агрегаты отсутствовали. Только лишь к 24 ч появлялось 6 % клеток в составе индуцированных агрегатов (рис. 2).

Увеличение концентрации сернокислой меди до $20 \cdot 10^{-6}$ моль/л приводило к появлению индуцированного агрегирования клеток только спустя 1,5 ч после внесения меди. В это время количество клеток в составе агрегатов составляло 11 %, а к 24-му часу достигало 26 % всех клеток в культуре (см. рис. 2).

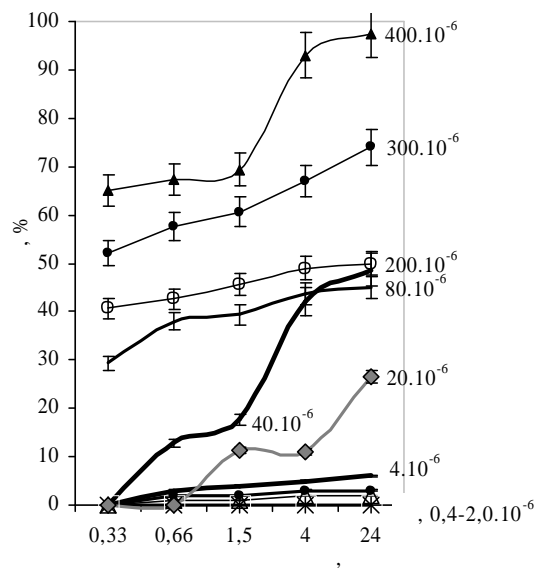


Рис. 2. Изменение количества клеток *Dunaliella viridis* в агрегированном состоянии после внесения в среду различных концентраций $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в зависимости от времени культивирования

Следовательно, индуцированное ионами меди агрегирование клеток увеличивалось с течением времени и скорость его была значительно меньшей, чем скорость обездвиживания клеток. В том случае, если концентрация сернокислой меди увеличивалась до $40 \cdot 10^{-6}$ моль/л, количест-

во агрегированных клеток обнаруживалось уже через 40 мин (12 % клеток), почти не изменялось через 1,5 ч, увеличивалось до 40 % к 4 ч и незначительно изменялось к 24-му часу (см. рис. 2).

Процесс индуцированного агрегирования в случае $20 \cdot 10^{-6}$ и $40 \cdot 10^{-6}$ моль/л сернокислой меди имел выраженный S-образный характер. Можно полагать, что агрегирование изменяется во времени нелинейно, что может объясняться временной особенностью биосинтетических процессов в клетке, принимающих в нем участие.

При концентрации сернокислой меди $80 \cdot 10^{-6}$, $200 \cdot 10^{-6}$ и $300 \cdot 10^{-6}$ моль/л наблюдалось увеличение количества агрегированных клеток, причем во времени оно изменялось незначительно, в отличие от концентраций $20 \cdot 10^{-6}$ и $40 \cdot 10^{-6}$ моль/л (см. рис. 2), и не имело S-образного характера.

S-образный временной характер увеличения количества агрегированных клеток проявлялся и для летальной дозы сернокислой меди — $400 \cdot 10^{-6}$ моль/л, при этом через 4 ч все клетки входили в состав агрегатов (см. рис. 2).

Между временным характером проявления обездвиживания клеток и формированием индуцированного агрегирования ионами меди нет прямой корреляции, хотя увеличение концентрации сернокислой меди сопровождается нелинейным увеличением индуцированного агрегирования. Эти два процесса, вероятно, осуществляются по-разному. Однако можно утверждать, что клеточные агрегаты формируются из обездвиженных клеток или обездвиживаются после агрегирования. Выявлены 4 стадии концентрационно-временной зависимости формирования индуцированного агрегирования клеток *D. viridis*. Первая стадия — медленное временное формирование агрегатов (концентрация $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л); вторая стадия — S-образная временная зависимость в среднем диапазоне концентраций ($20 \cdot 10^{-6}$ — $0 \cdot 10^{-6}$ моль/л); третья стадия — отсутствие временной зависимости формирования агрегатов при высоких токсических концентрациях сернокислой меди ($04 \cdot 10^{-6}$ — $300 \cdot 10^{-6}$ моль/л); четвертая стадия — вторая волна S-образной временной зависимости при летальных концентрациях сернокислой меди ($400 \cdot 10^{-6}$ моль/л).

Влияние различных концентраций ионов свинца на подвижность и индуцированное агрегирование клеток *D. viridis*. Внесение в среду культивирования *Dunaliella* $0,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л уксуснокислого свинца сопровождалось потерей подвижности у 10 % клеток через 20 мин, т.е. почти в 2 раза меньше по сравнению с сернокислой медью. Эти различия в степени обездвиживания между ионами свинца и меди сохранялись до 4 ч. После этого они не различались между собой (рис. 3). Увеличение концентрации уксуснокислого свинца до $1,3 \cdot 10^{-6}$ и $2,6 \cdot 10^{-6}$ моль/л сопровождалось увеличением количества обездвиженных клеток. Процесс обездвиживания клеток развивался во времени и увеличивался от 10–20 до 70 % к 24-му часу (см. рис. 3). Дальнейшее увеличение концентрации уксуснокислого свинца до $13,1 \cdot 10^{-6}$ и $26,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л и более сопровождалось увеличением обездвиженных клеток, однако их количество во времени возрастало не столь активно, как в случае использования ма-

лых концентраций ($0,2-1,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л). Так, при концентрации уксуснокислого свинца $26,3 \cdot 10^{-6}$ и $131,9 \cdot 10^{-6}$ моль/л их количество не изменялось во времени с 20 мин до 24 ч (см. рис. 3), как и в случае с ионами меди, при этом их количество составляло 70–90 % через 20 мин после внесения в среду.

Концентрационная зависимость обездвиживания клеток *Dunaliella* была различной для сернокислой меди и уксуснокислого свинца. Если при концентрации сернокислой меди $0,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л обездвиживалось почти в 2 раза больше клеток за единицу времени по сравнению с уксуснокислым свинцом, то при концентрациях в 5 и 10 раз больше их они мало различались между собой. Начиная с концентрации сернокислой меди $40 \cdot 10^{-6}$ моль/л и более уже через 20 мин все клетки теряли подвижность, а в случае уксуснокислого свинца только при концентрации $197,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л наблюдался такой же эффект (рис. 1; 3).

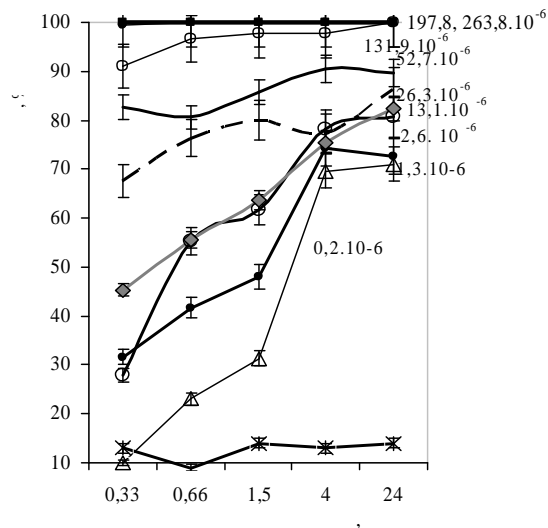


Рис. 3. Изменение количества неподвижных клеток *Dunaliella viridis* после внесения в среду различных концентраций $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ в зависимости от времени культивирования

Ионы свинца оказывали менее выраженный эффект потери подвижности клеток *Dunaliella* по сравнению с ионами меди.

Интересно было сравнить эффект индуцированного агрегирования клеток в присутствии ионов свинца и меди. Оказалось, что индуцированное агрегирование в присутствии уксуснокислого свинца проявлялось только при концентрации $26,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л спустя 24 ч (3 % клеток в агрегатах), а выраженное агрегирование — при $52,7 \cdot 10^{-6}$ моль/л мг/л (рис. 4). Этот процесс тоже имел S-образный временн ый характер при использовании сернокислой меди в концентрациях $20 \cdot 10^{-6}$ и $40 \cdot 10^{-6}$ моль/л. С возрастанием концентрации уксуснокислого свинца до $131,9 \cdot 10^{-6}$ моль/л

количество агрегированных клеток увеличивалось в 2 раза (см. рис. 4). В случае увеличения его концентрации до $197,8 \cdot 10^{-6}$ и $263,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л наблюдался линейный рост индуцированного агрегирования до 4 ч и в дальнейшем это количество не изменялось (см. рис. 4).

Следовательно, в случае внесения уксуснокислого свинца в среду культивирования *Dunaliella* клетки теряют подвижность и формируют клеточные агрегаты. Однако ионы свинца «уступают» по исследуемым показателям ионам меди. Хотя не выявлена прямая корреляция между количеством обездвиженных клеток и количеством клеток в агрегатах, для разных металлов существует некая связь между этими показателями. Так, ионы меди в меньших концентрациях по сравнению с ионами свинца обездвиживают клетки *Dunaliella* и для индуцированного агрегирования клеток требуются меньшие концентрации ионов меди.

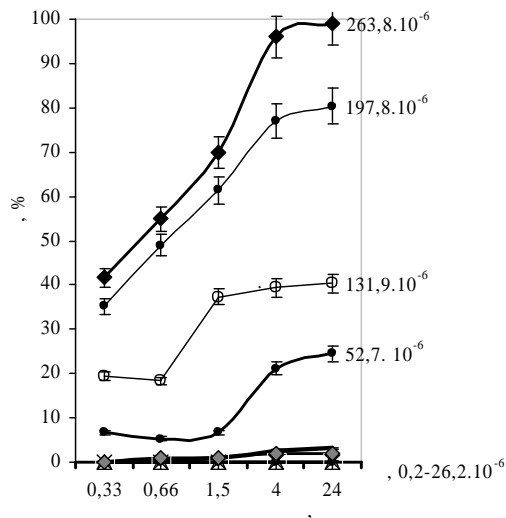


Рис. 4. Изменение количества клеток *Dunaliella viridis* в агрегированном состоянии после внесения в среду различных концентраций $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ в зависимости от времени культивирования

Влияние различных концентраций ионов кадмия на подвижность и индуцированное агрегирование клеток *D. viridis*. Внесение в среду культивирования азотнокислого кадмия в концентрациях $0,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л за 20 мин приводило к обездвиживанию 62 % клеток. Спустя 40 мин, 1,5 и 4 ч количество неподвижных клеток практически не изменялось и только к 24-му часу после внесения ионов кадмия количество неподвижных клеток увеличивалось до 90 %, однако не достигало 100 % (рис. 5 А).

Увеличение концентрации азотнокислого кадмия до $16,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л в среде не приводило к возрастанию числа неподвижных клеток. Оно оставалось таким же, как и при концентрации $0,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л (59–62 %). Увеличение концентрации этого токсиканта до $32,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л сопро-

вождалось увеличением количества неподвижных клеток только на 10 %, т.е. достигало 70 % и оставалось таким же даже при концентрации 100 мг/л спустя 20 мин (рис. 5, А). В дальнейшем оно незначительно увеличивалось и к 24-му часу составляло 91–96 %, но не 100, как в случае с ионами меди при концентрациях (200, 300 и 400)·10⁻⁶ моль/л и свинца при концентрациях (131,9, 197,8 и 263,8)·10⁻⁶ моль/л (рис. 5, Б).

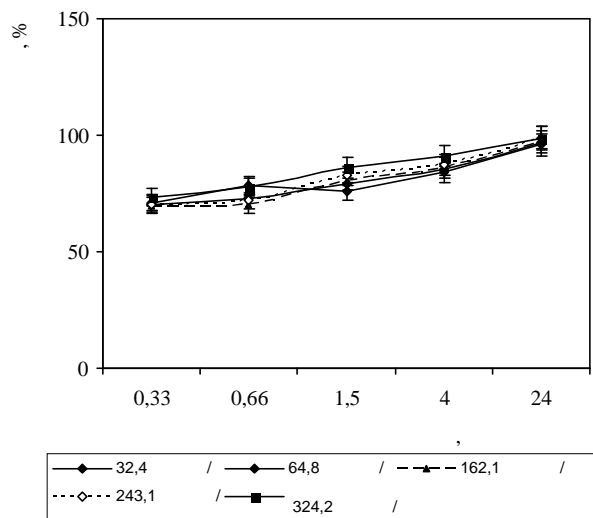
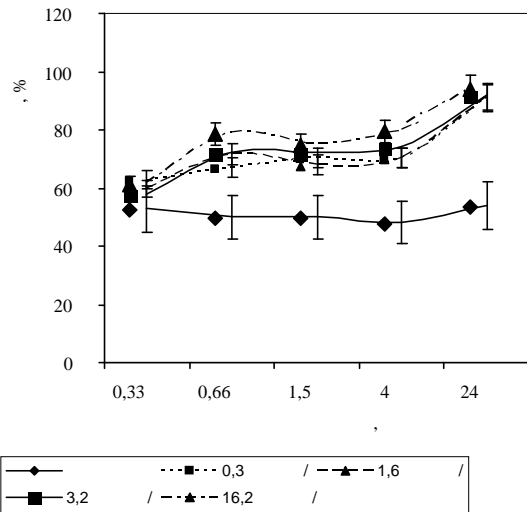


Рис. 5. Изменение количества неподвижных клеток *Dunaliella viridis* после внесения в среду различных концентраций $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в зависимости от времени культивирования

Дозовременная зависимость обездвиживания клеток *Dunaliella* отличалась в зависимости от использованных ионов металлов. При сравнении дозовой зависимости ионов меди, свинца и кадмия через 20 мин и 1,5 ч отмечено следующее. Увеличение дозы ионов меди до $40 \cdot 10^{-6}$ моль/л сопровождалось почти линейным уменьшением подвижности клеток спустя 20 мин и в дальнейшем не изменялось. В меньшей степени клетки теряли подвижность при внесении ионов свинца и выход на плато наблюдался после внесения $131,9 \cdot 10^{-6}$ моль/л уксуснокислого свинца. В случае использования кадмия выход на плато происходил при самой малой концентрации — $0,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л, при этом количество обездвиженных клеток не превышало 70 % и оставалось таким же до использования концентрации $324,2 \cdot 10^{-6}$ моль/л (рис. 6, А).

Ионы кадмия обездвиживали клетки *Dunaliella*, но это мало зависело от концентрации ионов кадмия в среде, а ионы меди и свинца проявляли дозовую зависимость в изменении этого показателя.

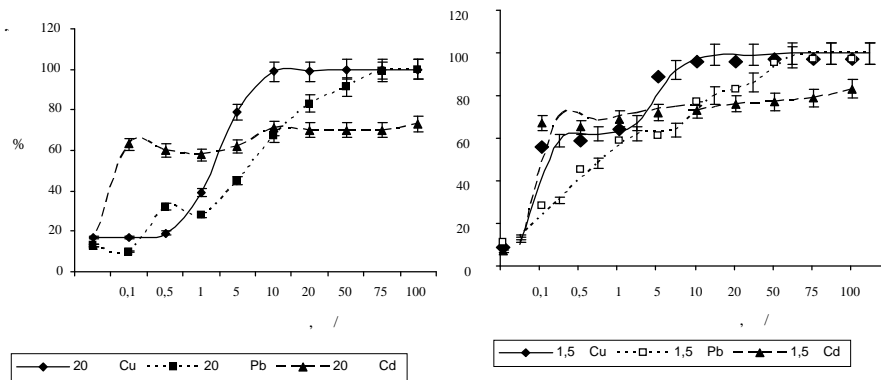


Рис. 6. Изменение количества обездвиженных клеток *Dunaliella viridis* в зависимости от концентрации спустя 20 мин после внесения $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (—), $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (---) и $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (___) (А) и спустя 1,5 ч после внесения этих солей (Б)

С увеличением времени инкубации *Dunaliella* разные концентрации ионов исследованных металлов по-разному обездвиживали клетки *Dunaliella*. Так, спустя 1,5 ч для ионов меди проявлялся S-образный характер дозовой зависимости, для ионов свинца S-образный характер был менее выражен и клетки обездвиживались в меньшей степени, чем в случае ионов меди (рис. 6, Б). Для ионов кадмия проявлялась незначительная зависимость потери подвижности клеток от концентрации. Спустя 1,5 ч при дозе $0,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л 70 % клеток уже были обездвижены, при таких же дозах ионы меди обездвиживали 59 % клеток, а ионы свинца только 30 % (см. рис. 6, Б).

Потеря подвижности клеток *Dunaliella* изменялась во времени для ионов меди и свинца и не изменялась для ионов кадмия.

Из полученных результатов следует, что ионы меди, кадмия и свинца обездвиживают клетки *Dunaliella* по разным механизмам.

Ионы кадмия не индуцируют агрегирования клеток при исследованных дозах. Из этого следует, что обездвиживание клеток и формирование клеточных агрегатов – два независимых процесса. Культура *Dunaliella* использует разные стратегии выживания. Вероятно, процесс агрегирования клеток *Dunaliella* может осуществляться по разным механизмам в случае разных индукторов этого процесса.

Обсуждение

Полученные нами результаты показали:

- внесение в среду культивирования *Dunaliella* минимальных концентраций солей меди ($0,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л), свинца ($0,2 \cdot 10^{-6}$) и кадмия ($0,3 \cdot 10^{-6}$) моль/л сопровождается быстрой потерей подвижности части клеток (спустя 20 мин неподвижными были 17, 10, 62 % клеток, соответственно, для ионов меди, свинца и кадмия);

- количество обездвиженных клеток после однократного внесения солей металлов изменялось во времени по-разному для разных солей металлов: если при малых дозах ионов меди ($0,4-4,0 \cdot 10^{-6}$) и свинца ($0,2-2,0 \cdot 10^{-6}$) количество обездвиженных клеток увеличилось в течение 4 ч и выходило на плато, то для кадмия наблюдался выход на плато даже при концентрации $0,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л;

- разные ионы металлов характеризовались разной дозовой зависимостью в потере подвижности клеток (потеря подвижности в случае кадмия мало зависела от дозы и имела S-образный характер при 1,5–4-ч экспозициях для меди и свинца);

- внесение ионов меди и свинца в среду *Dunaliella* индуцировало их агрегирование, ионы кадмия не обладали этой способностью, т.е. не все ионы металлов индуцируют агрегирование клеток;

- процесс агрегирования изменяется во времени: минимальные концентрации ионов меди и свинца, которые индуцировали агрегирование клеток, составляли $20 \cdot 10^{-6}$ и $26,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л и проявлялись через 1,5 и 4 ч соответственно;

- между концентрацией ионов меди и свинца в среде и количеством клеток, входящих в состав агрегатов, существует дозовая зависимость;

- между потерей подвижности клеток *Dunaliella* и количеством агрегированных клеток нет прямой связи. Вероятно, это два независимых процесса, хотя чем больше обездвиживание клеток, тем больше их агрегирование.

Как известно, подвижность *Dunaliella* зависит, как минимум, от чувствительности и функциональной активности фоторецепторов, сократительных белков и обеспеченности макроэргами. Потеря подвижности клеток *Dunaliella* может проявиться в нескольких случаях: если агент

обездвиживания связывался только с одним из элементов системы движения (фоторецепторы, или сократительные белки, или система синтеза АТФ); если агент обездвиживания связывался с несколькими или всеми элементами системы движения клеток и этот процесс осуществлялся во времени, т.е. он связывался не со всеми элементами одновременно.

Можно полагать, что если агент обездвиживания специфически связывается только с одним из элементов движения и его количества достаточно, чтобы обеспечить насыщающее связывание, то это не будет зависеть от концентрации. Такая ситуация проявилась для кадмия. Очевидно, он связывался только с одним из элементов, который обеспечивал движение клеток в среде.

Для ионов меди и свинца наблюдалась дозозависимая потеря подвижности клеток, которая изменялась во времени. Причем изменение во времени было нелинейным. Эти результаты свидетельствуют о том, что ионы меди и свинца проникают в клетки и связываются с различными агентами, участвующими в движении клеток не одновременно, а в некой последовательности. Поэтому этот процесс развивается во времени и может проявиться в полной потере подвижности в отличие от кадмия.

Если это предположение верно, то это означает, что кадмий связывается с поверхностью жгутиков или клетки, не проникает или плохо проникает в клетки *D. viridis*.

Напротив, ионы меди и свинца проникают в клетки и связываются с различными ее компонентами и элементами (Божков, Могилянская, 1996), которые могут обеспечивать фотодвижение. Если это так, то ионы кадмия могут быть легко удалены с поверхности клеток многократным промыванием клеток средой, не содержащей ионы кадмия, в то время как ионы меди и свинца не будут удаляться из клеток, так как связываются с внутриклеточными компонентами.

Результаты экспериментов по отмыванию клеток от ионов кадмия, меди и свинца представлены в таблице.

Таблица

Содержание ионов меди, свинца и кадмия в клетках *Dunaliella* через 20 мин после внесения их солей без дополнительных отмываний клеток и после трех последовательных промываний средой Артари без солей этих металлов

Содержание ионов металлов, моль/л	Без дополнительных промываний, нмоль/л·10 ⁶ кл	После трех последовательных промываний, нмоль/л·10 ⁶ кл
Cu (200·10 ⁻⁶)	71,9±5,4	104,1±5,7
Pb (131,9·10 ⁻⁶)	22,2±0,5	24,2±0,1
Cd (162,1·10 ⁻⁶)	0,65±0,3	0,05±0,01

Содержание ионов кадмия в клетках уменьшалось в 10 раз после промывания и не уменьшалось для ионов меди и свинца.

Эти результаты свидетельствуют о том, что клетки *D. viridis* способны связывать разное количество ионов меди, свинца и кадмия.

Ионы меди быстро проникают в клетки и лучше индуцируют агрегирование клеток *Dunaliella*. Вероятно, существует связь между количеством ионов металлов, связанных с внутриклеточными компонентами клетки, и интенсивностью агрегирования клеток. Ионы свинца хуже связываются, плохо проникают в клетки и в меньшей степени по сравнению с ионами меди способны индуцировать агрегирование клеток.

Выводы

1. Внесение ионов меди, свинца и кадмия в среду культивирования приводит к обездвиживанию клеток *Dunaliella*, которое зависит от концентрации ионов металла в среде. Если для ионов кадмия не обнаружена выраженная дозовая зависимость, то для ионов меди и свинца эта зависимость развивается во времени.

2. Ионы меди и свинца индуцируют агрегирование клеток, а при использовании ионов кадмия этот процесс не наблюдается.

3. Обездвиживание и индуцированное агрегирование могут рассматриваться как два независимых процесса.

Божков А.И., Могиланская С.М. Адаптация *Dunaliella viridis* Teodor. к различным концентрациям сернокислой меди. Роль системы экскреции ионов меди в среду // Альгология. – 1996. – 6. – № 2. – С. 122–132.

Божков А.И., Климова Е.М., Бойко В.В., Мензянова Н.Г., Дроздова Л.А. Связь клинических форм миастении с частотой встречаемости HLA-DR-фенотипа и разработка клеточного биосенсора для оценки этой патологии // Доп. НАНУ. – 2002. – 3. – С. 161–166.

Божков А.И., Мензянова Н.Г., Климова Е.М. Использование водорослей в качестве клеточного биосенсора при оценке патологических состояний организма // Горизонты биофизики. – Пушино, 2003. – С. 66–70.

Божков А.И., Голтвянский А.В., Ростам Ш. Индуцированное агрегирование клеток *Dunaliella viridis* Teodor. полулетальными концентрациями ионов меди в культуре // Альгология. – 2010а. – 20, № 2. – С. 151–166.

Божков А.И., Сидоров В.И., Длубовская В.Л., Шевцова М.Я., Суров Ю.Н. Проявление эффекта импринтинга в паттерне внутриклеточного распределения ионов меди в печени после многократных введений сернокислой меди // Биомед. химия. – 2010б. – 56, вып. 2. – С. 195–208.

Водоросли: Справочник / Под общ. ред. С.П. Вассера. – Киев: Наук. думка, 1989. – 608 с.

Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в микробиологических исследованиях. – М.: Медицина, 1973. – С. 21–25; 53–56.

Климова Е.М., Лавинская Е.В., Божков А.И., Кордон Т.И. Оценка степени цитотоксичности компонентов патологических сывороток с использованием клеточной тест-системы // Биотехнология. – 2010. – 3. – № 6. – С. 85–91.

Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teodor. – Киев: Наук. думка, 1973. – 244 с.

Посудин Ю.И., Масюк Н.П., Лилицкая Г.Г. Влияние ультрафиолетового излучения на фотодвижение двух видов *Dunaliella* Teodor. // Альгология. – 2004. – **14**, № 2. – С. 113–126.

Teodoresco E.C. Observations morphologiques et biologiques sur le genre *Dunaliella* // Rev. Gen. Bot. – 1906. – **18**. – P. 353–371; 409–427.

Получена 11.05.11

Рекомендовала к печати Е.И. Шнюкова

Sh. Rostama, A.I. Bozhkov, A.V. Goltyvanskiy

Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkov National University,
4, Svobody Sq., 61022 Kharkov, Ukraine

EFFECT OF COPPER, LEAD AND CADMIUM IONS ON THE INDUCTION OF CELLS OF *DUNALIELLA VIRIDIS* (*CHLOROPHYTA*) AGGREGATION

The effect of various concentrations of copper, cadmium and lead to loss of cell motility and the dynamics of *Dunaliella viridis* Teodor. induced aggregation of cells. The introduction of ions of copper, lead and cadmium in the culture medium led to loss of mobility of cell *Dunaliella*, which depended on the concentration of metal ions in the medium. However, this dependence was not linear. The process of immobilization of cells developed over time in the case of copper and lead, and cadmium ions had to place the principle of "all or nothing". Ions of copper and lead induced aggregation of cells, which depended on the concentration of ions in the medium and incubation time. At the same time cadmium ions had no effect on the induction of aggregation of cells. All the metal ions can be divided into two groups: those inducing aggregation and did not induce aggregation of cells of *Dunaliella viridis*.

Key words: *Dunaliella viridis*, cell aggregation induced by metal ions, copper ions, lead ions, cadmium ions.