

УДК 574; 591. 544

М.К. Ковалева<sup>1</sup>, Н.Г. Мензянова<sup>1</sup>, Anshu Jain<sup>2</sup>, Abhishek Yadav<sup>2</sup>, S.J.S. Flora<sup>2</sup>, А.И. Божков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ биологии, Харьковский национальный ун-т им. В.Н. Каразина,  
пл. Свободы, 4, 61077 Харьков, Украина

<sup>2</sup>Division of Pharmacology and Toxicology, Defense Research and Development  
Establishment, Jhansi Road, Gwalior 474002, India

### **ЭФФЕКТ ГОРМЕЗИСА У *DUNALIELLA VIRIDIS* TEODOR. (*CHLOROPHYTA*) ПОД ДЕЙСТВИЕМ СЕРНОКИСЛОЙ МЕДИ**

Исследовали устойчивость культуры *Dunaliella viridis*, предварительно адаптированной к росту на среде, содержащей 20 мг/л сернокислрой меди, к повышению концентрации ионов меди до 75 мг/л сернокислрой меди. Показано, что такая культура устойчива к высоким концентрациям ионов меди, т.е. способна проявлять эффект гормезиса. Обнаружено, что клетки *D. viridis*, резистентные к ионам меди (75 мг/л), накапливают в 2000 раз больше ионов меди по сравнению с контрольной культурой. При этом содержание карбонилированных белков (продуктов свободно-радикальных процессов) у них увеличивается всего в 2 раза. В процессе культивирования в клетках в несколько раз уменьшалось содержание  $Cu^{2+}$ . В клетках, проявляющих гормезисный эффект, достоверно возростала активность супероксид-дисмутазы и в 2 раза уменьшалось содержание свободного пролина. Высказано предположение, что гормезисный эффект проявляется в том случае, когда имеет место совместное проявление всех систем защиты клетки. Для такого поведения характерно не простое суммирование всех элементов защиты, а проявление эмерджентных свойств системы.

К л ю ч е в ы е с л о в а : токсичность, гормезис, ионы меди, *Dunaliella viridis*.

#### **Введение**

Токсичность ионов тяжелых металлов (и.т.м.) зависит не только от их концентрации в среде и физико-химических характеристик, но и свойств биологических объектов. Так, токсичность ионов меди зависит от возраста культуры или организма (Божков, 1997а; Божков и др., 2000), функционального состояния биологической системы в момент воздействия (Loskutov, 1995; Божков, 1997б). Кроме того, на проявление токсичности и.т.м. будет влиять способность организма адаптироваться к ним.

Механизмы адаптации клеток к экстремальным условиям многообразны и сложны. Именно они обеспечивают выживание организма в изменяющихся условиях среды. Наименее изучен и наиболее важен в процессах адаптации гормезисный эффект. Суть его в том, что предвари-

© М.К. Ковалева, Н.Г. Мензянова, Anshu Jain, Abhishek Yadav,  
S.J.S. Flora, А.И. Божков, 2011

тельная адаптация организма может обеспечить ему устойчивость к большим дозам или концентрациям, вплоть до летальных. Впервые гормезисный эффект был описан на примере радиоустойчивости (Кузин, 1991). Позже было обнаружено, что он наблюдается и при действии и.т.м. (Божков, 1997б; Божков и др., 1998), химических токси-кантов (Rozman et al., 2003), других токсических воздействий и про-является у разных объектов, т.е. имеет общебиологический характер.

Установлено, что способность организма к адаптации и, вероятно, к гормезисному эффекту определяется временными изменениями кон-центрации и.т.м. в клетке или организме (Bozhkov et al., 2010). Исходя из этого можно ожидать, что, подбирая концентрации и.т.м. и интервал между постепенным увеличением концентраций в клетке, можно индуцировать различные системы устойчивости биообъектов, что может проявляться и в «сверхустойчивости» – гормезисе.

В данной работе мы изучали устойчивость клеток *D. viridis* к 75 мг/л сернокислой меди двух разных культур: CuS *D. viridis* – контрольной, чувствительной к ионам меди и CuR *D. viridis* – резистентной, адаптированной к 20 мг/л сернокислой меди. С целью исследования возможных механизмов гормезисного эффекта в исследуемых культурах определяли динамику роста и форму клеток, содержание ионов меди в клетках в процессе культивирования, показатели активности про- и антиоксидантной систем (содержание карбонилированных белков, активность супероксиддисмутазы, содержание пролина) на разных этапах накопительного культивирования.

## Материалы и методы

В экспериментах использовали культуру одноклеточной микроводо-росли *D. viridis* var. *viridis* f. *euchlora*, штамм IBASU-A N 29 (из коллекции культур водорослей Ин-та ботаники НАН Украины, Киев).

### Культивирование микроводорослей *D. viridis*

Эксперимент проводили на культурах *D. viridis*, чувствительной к ионам меди – CuS *D. viridis* и резистентной к ионам меди – CuR *D. viridis*. CuS культивировали на среде Артари в модификации Масюк (2007). CuR-культура была получена селекцией на среде Артари, содержащей 20 мг/л сернокислой меди. Культуру CuR *D. viridis* поддерживали на среде с сернокислой медью (20 мг/л), которую вносили при каждой пересадке на свежую среду на 21-й день культивирования. CuR *D. viridis* с 20 мг/л была переведена на среду Артари, содержащую 75 мг/л. Доза 75 мг/л сернокислой меди составляет около 75 % летальной концентрации для этого вида водорослей (Божков, Могилянская, 1996). CuR *D. viridis* на среде с сернокислой медью в концентрации 75 мг/л культивировали 7 лет.

В работе использовали 4 режима культивирования CuS- и CuR-культур *D. viridis*:

1 – микроводоросли культивировали 10 дней, пересадку проводили на каждый 10-й день культивирования;

2 – микроводоросли культивировали 20 дней, пересадку проводили на каждый 20-й день культивирования;

3 – микроводоросли культивировали 30 дней, пересадку проводили на каждый 30-й день культивирования;

4 – микроводоросли культивировали – 40 дней, пересадку проводили на каждый 40-й день культивирования.

Количество клеток подсчитывали в камере Горяева, исходную концентрацию их в момент пересадки доводили средой до 1,3 млн/мл.

Культивирование осуществляли в условиях круглосуточного освещения (6,5 клк от четырех ламп ЛБ-40) и постоянной температуры (26-28 °С), в плоскодонных конических колбах Эрленмейера емкостью 250 мл (объем культуры 20 мл).

#### Определение содержания карбонилированных белков

Метод оценки окислительной модификации белков основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов (Дубинина и др., 1995).

Содержание карбонилированных белков определяли в осадках клеток, полученных после экстракции липидов, пигментов и гидролиза ДНК и РНК. В полученные осадки белков вносили 0,5 мл 10 мМ раствора 2,4-ДНФГ в 2 н. НСІ (опытная проба), в контрольную пробу вносили 0,5 мл 2 н. НСІ. Пробы инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, периодически встряхивая каждые 10-15 мин. Затем в контрольную и опытные пробы вносили по 0,5 мл 20 % раствора ТХУ и осаждали белок центрифугированием при 3000 g в течение 15 мин. Полученные осадки трижды промывали 1 мл смеси этанол: этилацетат (1:1, v/v) для удаления не связавшегося 2,4-ДНФГ. После отмывки осадки растворяли в 2 мл 8 М мочевины (рН 2.3 буфер). Спектр поглощения полученных растворов белков анализировали на дволучевом спектрофотометре “Specord UV VIS” (Германия) в интервале 363-373 нм. Количество карбонилированных белков выражали в нмоль/мг белка, используя коэффициент молярной экстинкции  $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### Определение содержания свободного пролина в клетках микроводорослей *D. viridis*

Клетки *D. viridis* осаждали центрифугированием при 3000 g, 20 мин и дважды промывали культуральной средой, затем их гомогенизировали на холоде и ставили на водяную баню (при 100 °С) на 10 мин. После охлаждения пробы центрифугировали 15 мин при 3000 g и собирали супернатант. Отбирали 1 мл супернатанта и добавляли по 1 мл ледяной уксусной кислоты и нингидринового реактива (1,25 г нингидрина растворяли в 30 мл ледяной уксусной кислоты и 20 мл 6 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Пробы инкубировали 1 ч на водяной бане при кипении. После

охлаждения к образцам добавляли по 3 мл толуола и центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. После разделения отбирали толуоловую фазу и определяли экстинкцию при длине волны 520 нм на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) (Bates et al., 1973). Содержание пролина рассчитывали по калибровочным кривым и выражали в мкг/10<sup>6</sup> кл.

Определение содержания ионов меди в клетках  
микроводорослей *D. viridis*

Клетки *D. viridis* осаждали центрифугированием при 3000 g, 15 мин и из осадков экстрагировали липиды и пигменты (Bozhkov et al., 1997). Полученный осадок минерализовали в 1 мл H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> не менее 12 ч. Затем в пробы вносили по 1 мл HCl и 1 мл HNO<sub>3</sub> и оставляли на 12 ч. Полученные образцы инкубировали при 120 °С в течение 2 ч. После охлаждения образцы доводили водой до 3 мл и определяли содержание ионов Cu<sup>2+</sup> на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Сатурн», (Северодонецк, Украина), при длине волны 324,8 нм (Прайс, 1976). Погрешность определения составляла 0,5-3 %.

Концентрацию ионов меди выражали в 10<sup>-9</sup> моль/млн кл.

Определение морфологии клеток микроводорослей *D. viridis*

Определение площади продольного сечения клеток и отношения малого и большого диаметров клеток осуществляли на 10-, 20-, 30- и 40-е сутки роста микроводорослей, при этом клетки *D. viridis* обездвигивали в парах йода. Образцы помещали на предметное стекло, устанавливали под микроскопом. Полученные фотографии использовали для определения размера и морфологии клеток.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД)  
в клетках микроводорослей *D. viridis*

Активность СОД определяли спектрофотометрически по уже описанному методу (Beauchamp et al., 1971), который основан на определении степени ингибирования нитротетразолия синего супероксидными радикалами в ксантин-ксантиноксидазной системе. Клетки *D. viridis* гомогенизировали в 50 мМ К-Na-фосфатном буфере, рН 7,8, содержащем 50 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,1 мМ ЭДТА; 25 мкМ нитротетразолия синего; 0,1 мМ ксантина; 0,003 ед/мл ксаниноксидазы. Осадок неразрушенных клеток удаляли центрифугированием при 10000 g, 20 мин при 4 °С. Супероксиддисмутазную активность регистрировали на спектрофотометре (СФ-46, ЛОМО, Россия) при 540 нм и выражали в ед. активности на 1 мг белка. Белок определяли по Лоури (Lowry et al., 1957). За единицу активности СОД принимали 50 %-е ингибирование скорости восстановления нитротетразолия синего.

Удаление ионов меди из *CuR*-культуры *D. viridis*

Для удаления ионов меди из клеток *CuR D. viridis* клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 15 мин. К осадку добавляли

среду Артари, не содержащую ионов меди. Спустя 24 ч вновь повторяли смену среды на чистую среду Артари, не содержащую ионы меди. После трех пересадок на свежую среду клетки CuR *D. viridis* освобождались от ионов меди (Божков, Могилянская, 1996).

Результаты обрабатывали статистически, достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента для малых выборок (Лакин, 1990).

## Результаты исследования

### Морфофункциональные характеристики чувствительных (CuS *D. viridis*) и резистентных к (CuR *D. viridis*) 75 мг/л сернокислой меди культур

В случае накопительного культивирования CuS *D. viridis* в стандартных условиях культивирования на 20-е сут переходила в стационарную фазу роста (рис. 1).

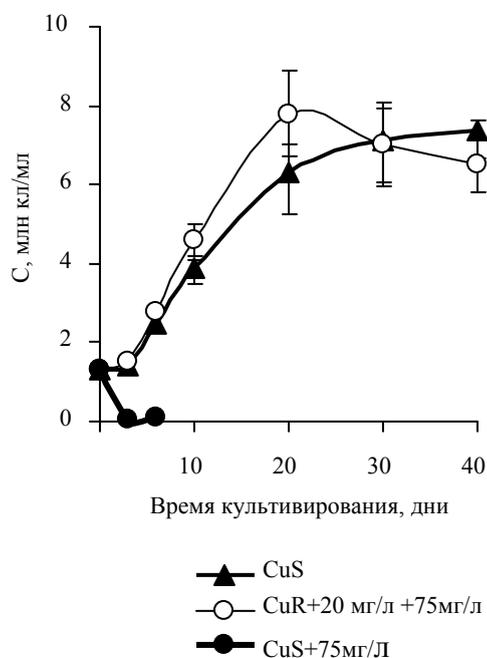


Рис. 1. Динамика роста клеток в культуре CuS *Dunaliella viridis* и CuR *D. viridis* в стандартных условиях культивирования на 10-, 20-, 30- и 40-е сутки роста. CuS+75 мг/л — концентрация клеток в CuS-культуре *D. viridis* после однократного внесения сернокислой меди в концентрации 75 мг/л; CuR+75 мг/л — концентрация клеток в CuR-культуре на среде Артари с добавлением 75 мг/л сернокислой меди

Следовательно, культура *D. viridis* при накопительном культивировании характеризуется такими временными особенностями: 10-е сутки роста соответствуют середине экспоненциальной фазы роста, 20-е сутки — переходом от экспоненциальной к стационарной фазе, 30-е сутки — середина стационарной фазы и 40-е сутки — переход от стационарной фазы роста к фазе гибели культуры (см. рис. 1).

По интенсивности роста CuR *D. viridis* не отличалась от CuS *D. viridis*, с той лишь разницей, что у первой несколько быстрее может наступить фаза гибели культуры (см. рис. 1). Это позволяет утверждать, что клетки CuR *D. viridis*, предварительно адаптированные к 20 мг/л сернокислой меди, проявляли гормезисный эффект. В случае, когда в CuS *D. viridis* вносили 75 мг/л сернокислой меди, эта культура погибала, по крайней мере, на 6-е сутки роста (см. рис. 1).

*Dunaliella viridis* характеризуется высокой вариабельностью форм клеток, что может объясняться отсутствием у нее клеточной стенки. Изменение формы клеток у *D. viridis* является важным показателем адаптации клеток к изменению условий культивирования и изменения функционального состояния клеток.

Так как CuS *D. viridis* имеет вытянутую грушевидную форму, то для оценки формы клетки использовали отношение большого диаметра клетки к малому. В том случае, если клетки приобретают округлую форму,  $d_1/d_2=1$ , если эллипсоидную – то  $d_1/d_2>1$ .

Клетки в контрольном варианте имели различную форму – от округлых до вытянутых. Характер распределения по форме был близок к Гауссовому распределению (рис. 2). Так, более 10 % клеток 10-дневной культуры CuS *D. viridis* имели округлую форму, т.е.  $d_1/d_2=1$ , более 50 % имели типичную для этого вида форму с  $d_1/d_2=1,3-1,7$ , остальные клетки имели  $d_1/d_2=2$  и более (рис. 2, А). Такое же распределение по форме имели и клетки 20-дневной культуры CuS *D. viridis*. Клетки 30-дневной культуры отличались по характеру распределения формы клеток от 10- и 20-дневных культур. Так, более 50 % клеток имели округлую форму ( $d_1/d_2=1$ ) и их количество линейно уменьшалось, т.е. для них не выявлялся типичный характер распределения клеток по форме, характерной для 10- и 20-дневных культур CuS *D. viridis* (см. рис. 2, А). На 40-й день культивирования характер распределения формы клеток был близок к таковому у 10- и 20-дневных культур CuS *D. viridis*, хотя количество округлых клеток у 40-дневных культур было в 2 раза больше по сравнению с клетками 10-дневных культур CuS *D. viridis*.

Следовательно, культура CuS *D. viridis* в своем развитии в случае накопительного культивирования проходит несколько морфологических стадий. «Критической» является 30-суточная культура. После 30 сут наблюдается «вторичный» возврат формы клеток к исходной или гибель клеток округлой формы и смена морфологических форм клеток. При неблагоприятных условиях культивирования клетки *Dunaliella* образуют цисты, из которых при смене условий на благоприятные выходят гаплоидные клетки.

Исследование характера распределения формы клеток в процессе накопительного культивирования CuR *D. viridis* с 75 мг/л показало достоверное различие этого показателя по сравнению с CuS *D. viridis* (рис. 2, Б).

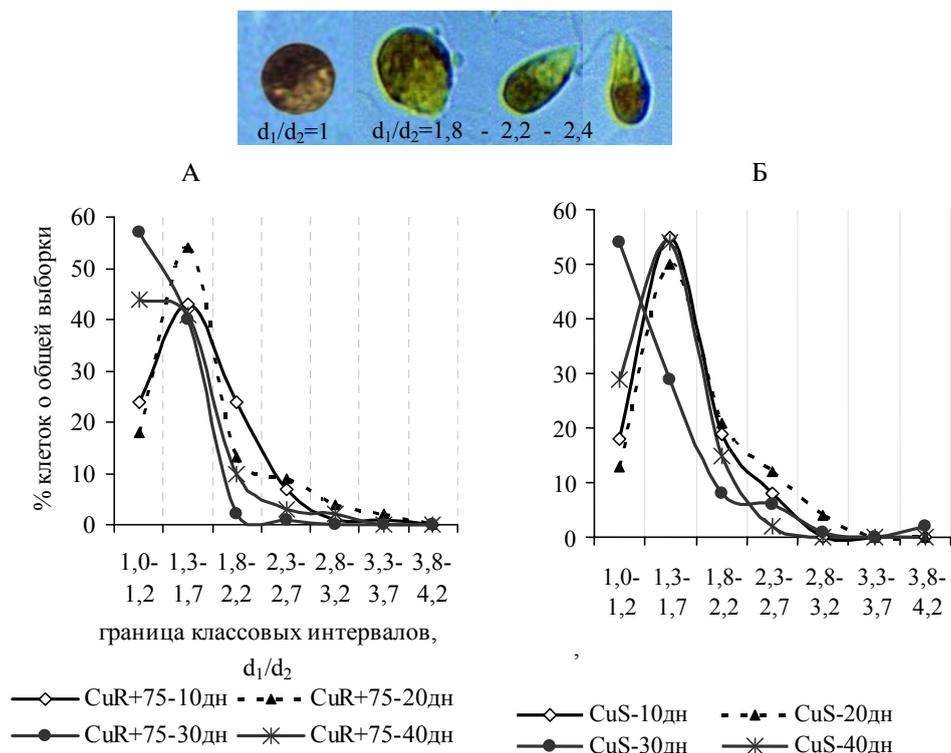


Рис. 2. Процентное соотношение морфологических классов в популяции клеток в культурах CuS- (А) и CuR+75 мг/л (Б) на 10-, 20-, 30- и 40-е сутки культивирования. Популяцию клеток разбивали на классы в зависимости от соотношения большого и малого диаметра.  $d_1/d_2 = 1$  – для клеток округлой формы,  $d_1/d_2 > 1$  – для удлиненной (грушевидной формы)

Так, округлых клеток в 30-дневной культуре CuR *D. viridis* было несколько больше, чем у CuS *D. viridis* в это время и их количество составляло около 60 %. У 40-дневных культур округлых клеток было более 40 % (рис. 2, Б). Следовательно, характер распределения форм у CuR *D. viridis* не «возвращался» к типичному, как это происходило в CuS-культуре *D. viridis* у 40-дневных культур.

Культуры CuS *D. viridis* и CuR *D. viridis* после внесения в среду высоких концентраций серноокислой меди незначительно различались между собой по интенсивности роста в накопительной культуре, при этом характер распределения форм клеток у них был различный. У них было увеличено количество округлых клеток на поздних стадиях культивирования.

Внутриклеточный характер распределения ионов меди в накопительной резистентной к  $Cu^{2+}$  культуре *D. viridis* после внесения 75 мг/л серноокислой меди в среду культивирования

Ионы меди являются эссенциальным элементом, входят в состав коферментов большого количества ферментов и недостаток ионов меди

в клетке или организме в целом ведет к значительным метаболическим нарушениям или патологиям (Кузнецова и др., 2007; Андреева и др., 2010; Kumar et al., 2009; Liu et al., 2010).

В первой серии экспериментов был определен фоновый уровень ионов меди в контрольной CuS-культуре *D. viridis*. Оказалось, что внутриклеточное содержание ионов меди в процессе стандартного накопительного культивирования нелинейно уменьшалось (рис. 4, А). В клетках 10-дневной CuS-культуры содержалось  $0,047 \times 10^{-9}$  моль/ $10^6$  кл меди. К 20-м суткам это содержание уменьшалось более чем в 2 раза, оставаясь неизменным до 30-х сут культивирования, и вновь уменьшалось у 40-дневных культур (рис. 3, А). Ионы меди в культуру CuS *D. viridis* не вносили и клетки поглощали ионы меди, которые могли быть внесены как примеси в солях, использовавшихся при приготовлении питательных сред, так что содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в клетках CuS *D. viridis* можно принять за фоновый уровень.

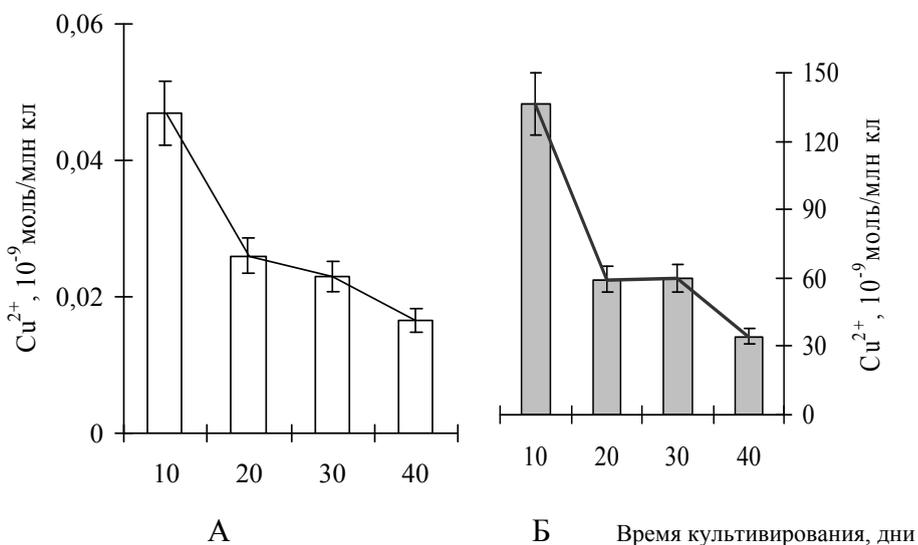


Рис. 3. Содержание ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в клетках CuS *Dunaliella viridis* (А) и CuR+75 мг/л *D. viridis* (Б) на 10-, 20-, 30- и 40-е сутки роста культур в стандартных условиях культивирования

Выявленный нелинейный временной характер внутриклеточного содержания ионов меди в контрольной CuS *D. viridis* в процессе культивирования указывает на наличие в клетках *Dunaliella* системы временной регуляции ионного гомеостаза. Уменьшение содержания ионов меди в процессе культивирования *D. viridis* является важным показателем функционального состояния клеток, который может использоваться при тестировании клеток *D. viridis*.

Во второй серии экспериментов определяли внутриклеточное содержание ионов меди в клетках CuR *D. viridis*, к которым добавляли большую дозу сернокислой меди (75 мг/л).

В клетках 10-суточной культуры CuR *D. viridis* содержалось в 2900 раз больше ионов меди по сравнению с CuS *D. viridis*, что составляло  $136,5 \times 10^{-9}$  моль/ $10^6$  кл. В клетках 20-суточной культуры это содержание снижалось до  $59,4 \times 10^{-9}$  моль/ $10^6$  кл, что почти в 3 раза меньше по сравнению с клетками 10-дневной культуры. Содержание ионов меди не изменялось в клетках 30-суточной культуры и вновь уменьшалось в клетках 40-дневной культуры (см. рис. 3, Б).

Следовательно, временной характер уменьшения содержания ионов меди в процессе накопительного культивирования совпадает у CuS и CuR *D. viridis* и не зависит от исходного уровня ионов меди в клетке.

Активность про- и антиоксидантной систем после внесения 75 мг/л сернокислой меди в резистентные к ионам меди культуры *D. viridis*

Известно, что ионы тяжелых металлов в токсичных концентрациях индуцируют свободнорадикальные процессы в клетке (Flora, 2009), которые ведут, с одной стороны, к активации антиоксидантных элементов защиты клетки (Chongpraditnum et al., 1992), а с другой – к окислению липидов (Contreras et al., 2009), карбонилированию белков (Davidov et al., 2004) и модификации нуклеиновых кислот (Halliwell, 1999).

Для выявления возможного механизма гормезисного эффекта в клетках *D. viridis* в запуске окислительных процессов определяли содержание карбонилированных белков у CuS и CuR *D. viridis* в процессе накопительного культивирования.

Карбонилированные белки выявлялись на всех стадиях роста CuS *D. viridis*. Их содержание было постоянным в клетках 10-, 20- и 30-дневной CuS-культуры *D. viridis* и составляло 1,1-1,4 нмоль/мг белка (рис. 4). Их количество увеличивалось в 2 раза в клетках 40-дневной CuS-культуры *D. viridis* (см. рис. 4).

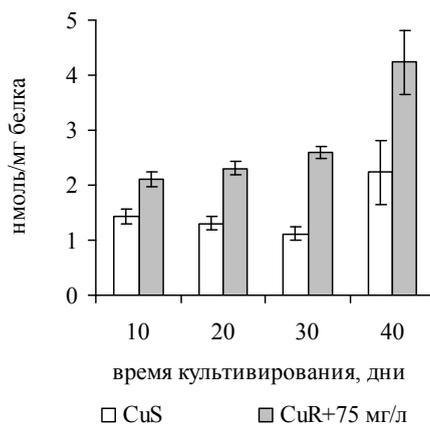


Рис. 4. Содержание карбонилированных белков (нмоль/мг белка) в клетках CuS *Dunaliella viridis* и CuR+75 мг/л *D. viridis* на 10-, 20-, 30- и 40-е сутки накопительного культивирования

Стадия перехода культуры *D. viridis* от стационарной фазы роста к гибели сопровождалась увеличением содержания карбо-нилированных белков, что не связано с увеличением содержания ионов тяжелых металлов в клетках, а, вероятно, объясняется снижением активности антиоксидантной системы защиты клетки в этой фазе развития культуры.

Содержание карбонилированных белков в клетках CuR *D. viridis* было почти в 2 раза выше, чем в клетках CuS *D. viridis* на всех стадиях культивирования (см. рис. 4).

Следовательно, количество карбонилированных белков зависит от стадии развития культуры и их количество резко увеличивается при переходе клеток культуры в фазу гибели. Внесение ионов меди в среду также сопровождается увеличением содержания карбонилированных белков по сравнению с контрольной культурой. Однако содержание карбонилированных продуктов не коррелирует с количеством ионов меди в клетке. Это позволяет предполагать, что в проявлении гормезисного эффекта важную роль играет система антиоксидантной защиты.

Одним из наиболее изученных антиоксидантных ферментов первой линии защиты является супероксиддисмутаза (СОД) (Чеснокова и др., 2006). Следует ожидать, что у CuR *D. viridis* может быть активирована СОД.

Активность СОД в клетках CuR *D. viridis* на 20-й день накопительного культивирования была достоверно выше по сравнению с CuS *D. viridis* (рис. 5). Однако такое увеличение СОД может быть связано не с увеличением содержания ионов меди в клетке, а вызвано другими причинами. Чтобы убедиться в этом, из клеток CuR *D. viridis* экспериментально были удалены ионы меди, затем в таких клетках была определена активность СОД. Активность СОД в клетках уменьшалась в 2 раза по сравнению с CuR *D. viridis* и была достоверно ниже даже контрольного уровня (рис. 5).

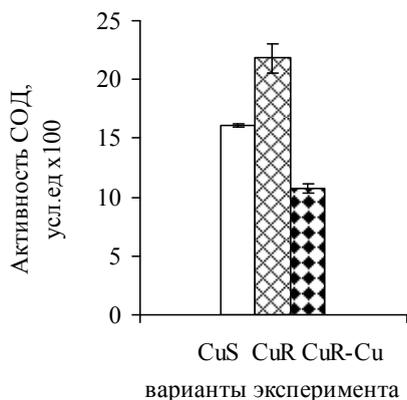


Рис. 5. Активность супероксиддисмутазы в клетках CuS *Dunaliella viridis* на 20-й день накопительного культивирования, в клетках CuR *D. viridis* на 20-й день накопительного культивирования и в клетках CuR *D. viridis*, у которых экспериментально были удалены ионы меди

Следовательно, в формировании гормезисного эффекта к ионам меди принимают участие антиоксидантные ферменты, в частности СОД.

В растительных клетках в систему антиоксидантной защиты может входить и свободный пролин (Радюкина и др., 2008). Определение его содержания в клетках CuS и CuR *D. viridis* представляет интерес еще и потому, что он выполняет широкий спектр функций, например структурную функцию в белках, регулирует функции многих ферментов и защищает белки в клетке (Кузнецов и др., 1999).

Содержание свободного пролина в контрольной культуре *D. viridis* на 10-е сутки роста в накопительной культуре составляло  $(0,072 \pm 0,012)$  мкг/ $10^6$  кл. Оно оставалось на этом же уровне в клетках 20-дневной культуры и увеличивалось в 2 раза на 30-е сутки культивирования (рис. 6). Однако к 40-м суткам культивирования оно вновь уменьшалось и соответствовало количеству 10- и 20-дневных CuS-культур *D. viridis* (см. рис. 6).

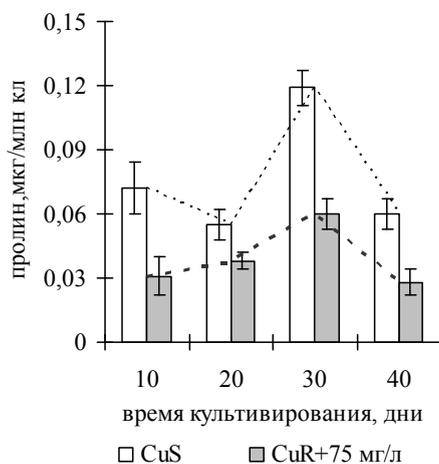


Рис. 6. Содержание пролина в клетках CuS *Dunaliella viridis* и CuR+75 мг/л *D. viridis* на 10-, 20-, 30- и 40-е сутки накопительного культивирования

Имеются сведения, что ионы меди и другие стресс-факторы индуцируют увеличение содержания свободного пролина в растительных клетках, в частности *Scenedesmus quadricauda* (Zhang et al., 2008; Kováčik et al., 2010).

Содержание свободного пролина в клетках CuR *D. viridis* после добавления к ним 75 мг/л серноокислой меди уменьшалось вдвое по сравнению с CuS *D. viridis*, независимо от стадии роста культуры (см. рис. 6).

Временной характер изменения содержания свободного пролина в клетках CuR *D. viridis* в процессе культивирования полностью совпадал с таковым CuS *D. viridis* (см. рис. 6). Так, его содержание увеличивалось в 2 раза в клетках 30-суточной культуры по сравнению с 10- и 20-дневными культурами и вновь уменьшалось на 40-е сутки роста.

Эти результаты указывают на то, что свободный пролин в клетках, резистентных к ионам меди и проявляющих гормезисный эффект, скорее выполняет не антиоксидантную функцию, а участвует в стабили-

зации ферментных и надмолекулярных систем, поскольку содержание пролина может уменьшаться за счет связывания с разнообразными клеточными лигандами.

### Обсуждение

Результаты нашей работы убедительно показали, что культура *D. viridis*, резистентная к 20 мг/л сернокислой меди (Божков и др., 2000), обладает устойчивостью к концентрациям сернокислой меди, высокими для этого вида водорослей, т.е. для них проявляется гормезисный эффект. Об этом свидетельствует их способность к росту и накоплению биомассы в присутствии 75 мг/л сернокислой меди в отличие от CuS *D. viridis*.

Для *D. viridis* характерна достаточно высокая вариабельность форм клеток, что является отражением изменения функционального состояния клеток в процессе развития культуры. Известно, что в случае наступления для *D. viridis* неблагоприятных условий, клетки теряют подвижность и приобретают округлую форму (Масюк, 2007). Переход культуры в стационарную фазу роста сопровождается увеличением до 50 % количества округлых клеток. Однако к 40 суткам роста их количество в культуре CuS *D. viridis* вновь уменьшается. Это можно объяснять восстановлением измененных или уменьшением округлых клеток за счет их гибели, или выходом гаплоидных клеток из цист. Так как в 40-дневной CuS *D. viridis* наблюдалось небольшое увеличение количества клеток по сравнению с 30-дневной культурой, то можно утверждать, что уменьшение округлых клеток не связано с их гибелью, а является результатом выхода гаплоидных клеток из округлых цист.

В тоже время количество округлых клеток у CuR *D. viridis*, как и у CuS *D. viridis*, увеличивалось к 30-м суткам культивирования. Однако к 40-м суткам их количество уменьшалось в меньшей степени, чем у CuS *D. viridis* (см. рис. 2, Б).

Следовательно, выявленные различия в интенсивности роста CuR *D. viridis* и форме клеток были незначительными по сравнению с культурой CuS *D. viridis*, что позволяет говорить о формировании резистентности клеток CuR *D. viridis* к высоким концентрациям сернокислой меди.

Проявление эффекта гормезиса в культуре *D. viridis*, т.е. повышение устойчивости к увеличивающимся концентрациям ионов меди после предварительной адаптации, может достигаться за счет различных механизмов: 1) за счет защиты клеток от дальнейшего проникновения  $\text{Cu}^{2+}$  в клетки. После первичной адаптации устойчивые клетки экскретируют в культуральную среду специфические связывающие ионы меди метаболиты и они связывают  $\text{Cu}^{2+}$  не в клетке, а в культуральной среде, предотвращая проникновение  $\text{Cu}^{2+}$  в клетку; 2) в клетках CuR *D. viridis* индуцирована система антиоксидантной защиты и клетки способны устранять токсическое действие высоких концентраций ионов меди; 3) в клетках CuR *D. viridis* индуцирован синтез специфических, связы-

вающих ионы меди белков, способных обеспечить депонирование большого количества ионов меди в клетках без проявления токсичности; 4) в клетках CuR *D. viridis* активирован транспорт связывающих ионы меди экзометаболитов в культуральную среду, обеспечивающих связывание (инактивацию) и удаление из клетки  $\text{Cu}^{2+}$ ; 5) при первичной адаптации активируется система изменения структурно-функциональных характеристик, направленных на формирование устойчивости ферментов и других белков и надмолекулярных комплексов, в частности мембран, к высоким концентрациям ионов меди, т.е. имеет место молекулярная защита. В этом могут принимать участие свободный пролин и другие низкомолекулярные метаболиты; 6) гормезисный эффект – это кооперативный процесс, включающий все существующие механизмы защиты. Он сопровождается проявлением нового эффекта, большего, чем простая сумма составляющих его элементов, т.е. проявлением эмерджентных свойств (см. схему).

Если в клетках CuR *D. viridis*, культивируемых на среде с 20 мг/л сернокислой меди, содержалось в 700 раз больше  $\text{Cu}^{2+}$  по сравнению с CuS *D. viridis*, то у CuR *D. viridis* на среде с 75 мг/л сернокислой меди в 2000 раз больше  $\text{Cu}^{2+}$  по сравнению с CuS *D. viridis*. Следовательно, гормезисный эффект не связан с устранением эффекта внутриклеточного проникновения ионов  $\text{Cu}^{2+}$ , по крайней мере, он не вносит существенного вклада в это явление.

Наряду с этим, адаптация *D. viridis* к ионам меди сопровождалась активацией систем антиоксидантной защиты, в частности СОД, фермента первой линии защиты. Однако определить ее долевое участие в гормезисном эффекте достаточно сложно, необходима дополнительная серия экспериментов. В пользу роли антиоксидантной системы в формировании гормезисного эффекта косвенно может свидетельствовать относительно небольшое (2-кратное) увеличение карбонилированных белков у CuR *D. viridis* на среде с 75 мг/л сернокислой меди. На 30-е сутки роста у CuS *D. viridis* наблюдали увеличение содержания карбонилированных белков. Это может указывать на физиологическую функцию этих белков в клетках *D. viridis*, а не является результатом действия только ионов меди.

Нет сомнений в том, что в обеспечении гормезисного эффекта принимают участие специфические медесвязывающие белки (Пучкова и др., 2003). Об этом свидетельствует и изменение состава белков в клетках CuR *D. viridis* (Божков и др., 2010). К сожалению, достаточных данных о роли металлотионеинов и других связывающих медь белков в формировании резистентности и гормезисного эффекта пока нет.

Уменьшение содержания ионов меди в клетках *D. viridis* в процессе культивирования происходило практически одинаково у CuS *D. viridis* и у CuR *D. viridis*, несмотря на сильно различающийся абсолютный уровень количества ионов меди в этих клетках.

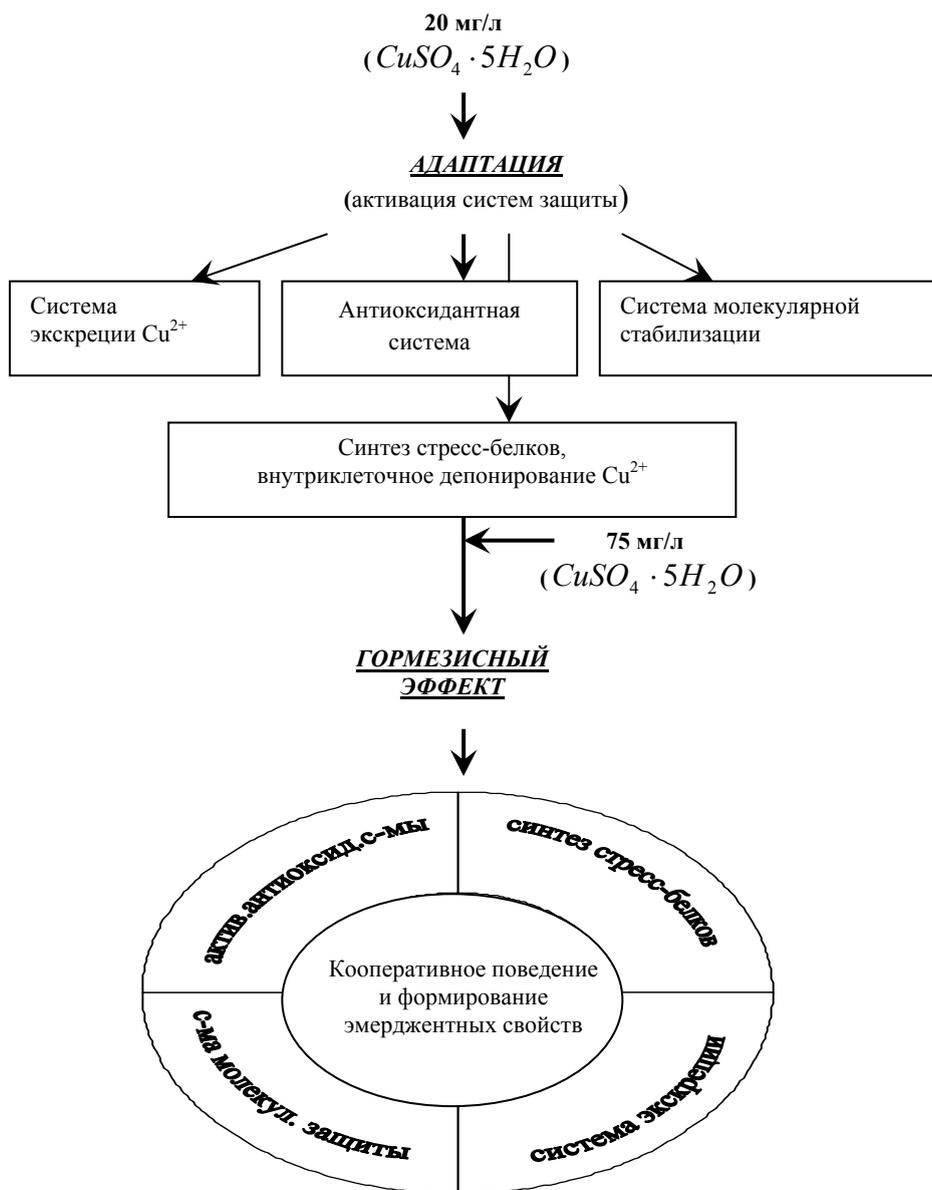


Схема. Формирование гормезисного эффекта у *Dunaliella viridis* к высоким концентрациям меди

То, что самое значительное уменьшение содержания  $Cu^{2+}$  наблюдалось с 10-х по 20-е сутки роста, можно объяснять двукратным увеличением количества клеток в культуре. Вместе с тем, объяснять уменьшение  $Cu^{2+}$  в клетках только увеличением количества клеток на фоне сохранения количества ионов меди тоже неверно. В таком случае не ясно, почему снижено количество  $Cu^{2+}$  в расчете на клетку у 40-

суточных культур, ведь количество клеток на этой стадии не изменялось по сравнению с 30-суточной культурой. Кроме того, не ясно, почему снижается фоновый уровень  $\text{Cu}^{2+}$  в клетках 40-суточных культур CuS *D. viridis*, ведь у них ионы меди не представлены в избытке. Кроме того, ранее было показано, что содержание  $\text{Cu}^{2+}$  в процессе культивирования CuR *D. viridis* в культуральной среде возрастало (Божков и др., 2010). Возможно, уменьшение содержания  $\text{Cu}^{2+}$  в клетках *D. viridis* при однократном внесении сернокислой меди в начале накопительного культивирования объясняется, с одной стороны, увеличением числа клеток, а с другой – наличием системы экскреции  $\text{Cu}^{2+}$  в культуральную среду.

Еще одним механизмом гормезисного эффекта является формирование молекулярной устойчивости к ионам меди, т.е. устойчивости ферментов, других белков и мембранных систем клетки к свободным ионам меди. Такая устойчивость может иметь различные механизмы, мы рассмотрели только возможное участие пролина в молекулярной стабилизации.

Это подтверждают сведения о том, что пятичленное кольцо свободного пролина обеспечивает поворот в белковой  $\alpha$ -спирали, или, располагаясь на краю  $\beta$ -слоя, стабилизирует белковую молекулу и она сохраняет свои свойства даже при наличии факторов дестабилизации (Фомина, 2005). Имеются сведения о сохранении активности ферментов на фоне действия Cd и Zn (Серов и др., 2002; Sharma et al., 1998).

Уменьшение содержания свободного пролина в 2 раза в резистентных к ионам меди клетках может косвенно свидетельствовать о его связывании с компонентами клетки и обеспечении им молекулярной защиты от высоких концентраций свободных ионов меди.

Однако в клетках растений функции свободного пролина достаточно разнообразны. Наряду с синтезом белка он способен связывать ионы тяжелых металлов (Cu, Cd, Ni, Zn) и выполнять функцию антиоксиданта (Sharma et al., 2006).

Содержание свободного пролина изменяется в процессе культивирования с одинаковой закономерностью у CuS и CuR *D. viridis*, что указывает на его функциональное изменение в процессе накопительного культивирования. Однако у CuR *D. viridis* содержание свободного пролина на всех стадиях роста было значительно меньше, чем в культурах CuS *D. viridis*. Очевидно, он связывается с макромолекулами клетки.

Полученные результаты указывают на то, что в формировании гормезисного эффекта у *D. viridis* к высоким концентрациям ионов меди (75 мг/л) задействованы различные механизмы: индукция специфических стресс-белков, обеспечивающих внутриклеточную инактивацию и депонирование ионов меди; активация антиоксидантной системы защиты; участие системы экскреции ионов меди из клеток; возможен вклад пролина и стресс-белков в молекулярную стабилизацию белков и других внутриклеточных макромолекул.

Однако все эти механизмы в отдельности не могут обеспечить проявление «сверхустойчивости» – гормезисный эффект. Возможно,

гормезисный эффект может проявляться только в том случае, когда одновременно активируются все системы защиты, что сопровождается кооперативным поведением этих систем. В свою очередь, это обеспечивает возникновение новых свойств, которые могут быть определены как эмерджентные свойства, т.е. свойства, которые нельзя предсказать исходя из свойств элементов, входящих в эту систему. Другими словами, гормезис – это нечто большее, чем сумма функционирующих элементов системы защиты (см. схему).

## Выводы

Клетки *Dunaliella viridis*, адаптированные к 20 мг/л сернокислой меди, проявляли устойчивость и к 75 мг/л, тогда как чувствительные к ионам меди клетки погибали в течение нескольких суток. Показано также, что гормезисный эффект сопровождается увеличением карбонилированных белков, активацией СОД и двукратным уменьшением свободного пролина.

- Андреева А.В., Николаева О.Н., Насретдинов Р.Г. Динамика роста и развития новорожденных телят при дефиците микроэлементов и его коррекции // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 2. – С. 46–48.
- Божков А.И. К вопросу о факторах, влияющих на токсичность сернокислой меди для *Dunaliella viridis* Teod. // Альгология. – 1997а. – 7, № 3. – С. 251–260.
- Божков А.И. Три дозозависимые стадии действия ионов меди на функциональную активность биологических систем // Биохимия. – 1997б. – 60, № 2. – С. 176–186.
- Божков А.И., Голтвянский А.В. Функциональная гетерогенность клеток *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*) и чувствительность к действию сернокислой меди // Альгология. – 2000. – 10, № 1. – С. 22–31.
- Божков А.И., Длубовская В.Л., Линник М.А., Шабани М., Белоус А.М. Возрастные особенности адаптации животных к сернокислой меди // Доп. НАН України. – 1998. – № 5. – С. 153–157.
- Божков А.И., Мензянова Н.Г., Седова К.В., Голтвянский А.В. Влияние высокой температуры на чувствительные и резистентные к ионам меди клетки *Dunaliella viridis* Teod. (*Chlorophyta*) // Альгология. – 2010. – 54, № 4. – С. 413–431.
- Божков А.И., Могилянская С.М. Адаптация *Dunaliella viridis* Teod. к различным концентрациям сернокислой меди. Роль системы экскреции ионов меди в среду // Там же. – 1996. – 6. – № 2. – С. 122–132.
- Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.С. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения // Вопр. мед. химии. – 1995. – 41, № 1. – С. 24–26.
- Кузин А.М. Проблема малых доз и идея гормезиса в радиобиологии // Радиобиология. – 1991. – 31, №1. – С. 16–21.
- Кузнецов В.В., Шемякова Н.И. Проллин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиол. раст. – 1999. – 46. – С. 321–336.
- Кузнецова Е.Г., Шияев Р. Р., Фадеева О.Ю. Биологическая роль эссенциальных макро- и микроэлементов и нарушения их гомеостаза при пиелонефрите у детей // Педиатр. фарм. – 2007. – 4, № 2. – С. 53–57.

- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
- Масюк Н.П., Посудин Ю.И., Лилицкая Г.Г. Фотодвижение клеток *Dunaliella* Teod. (*Dunaliellales*, *Chlorophyceae*, *Viridiplantae*). – Киев, 2007. – 266 с.
- Прайс В. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия / Пер. с англ. – М., 1976. – 356 с.
- Пучкова Л.П., Платонова Н.А. Механизм, обеспечивающий гомеостаз меди у эукариотов, и его связь с транспортом железа // Усп. соврем. биол. – 2003. – 123, № 1. – С. 41–58.
- Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Шевякова Н.И., Кузнецов В.В. Участие пролина в системе антиоксидантной защиты у шалфея при действии NaCl и параквата // Физиол. раст. – 2008. – 55, № 5. – С. 721–730.
- Серов А.Е., Тишков В.И. Роль остатков пролина в стабильности прокариотических и эукариотических формиадегидрогеназ // Вест. Москов. унив. Сер. 2: Химия. – 2002. – 43, № 6. – С. 345–349.
- Фомина С.А. Влияние уровня экспрессии генов пути биосинтеза L-пролина и генов центральных путей метаболизма на продукцию L-пролина клетками *Escherichia coli*: Дис. ... канд. биол. наук. – М., 2005. – 102 с.
- Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем // Усп. соврем. естествозн. – 2006. – № 7. – С. 37–41.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. – 1973. – 39. – P. 205–207.
- Beavchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. – 1971. – 44, N 1. – P. 276–287.
- Bozhkov A.I., Menzyanova N.G. Age dependence of lipid metabolism and  $\beta$ -carotene content in cells of *Dunaliella viridis* Teod. // Hydrobiol. J. – 1997. – 33, N 6. – P. 132–138.
- Bozhkov A., Padalko V., Dlubovskaya V., Menzyanova N. Resistance to heavy metal toxicity in organisms under chronic exposure // Ind. J. Exp. Biol. – 2010. – 48. – P. 679–696.
- Chongpraditum P., Mori S., Chino M. Excess copper induces a cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase in soybean root // Plant Cell Physiol. – 1992. – 33. – P. 239–244.
- Contreras L., Mella D., Moenne A., Correa J. Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (*Phaeophyceae*) // Aquat. Toxicol. – 2009. – 94, N 2. – P. 94–102.
- Davidov V.V., Dobaeva N.M., Bozhkov A.I. Possible role alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging // Exp. Geront. – 2004. – 39, N 1. – P. 11–16.
- Flora Swaran J.S. Structural, chemical and biological strategies against metal and metalloid exposure // Oxidat. Med. and Cell. Long. – 2009. – 2, N 4. – P. 191–206.
- Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition // Mutat Res. – 1999. – 443, N 1/2. – P. 37–52.
- Kováčik J., Klejdus B., Bäckor M. Physiological responses of *Scenedesmus quadricauda* (*Chlorophyceae*) to UV-A and UV-C light // Photochem Photobiol. – 2010. – 86, N 3. – P. 612–616.
- Kumar R., Mehrotra N.K., Nautiyal B.D., Kumar P., Singh P.K. Effect of copper on growth, yield and concentration of Fe, Mn, Zn and Cu in wheat plants (*Triticum aestivum* L.) // J. Environ Biol. – 2009. – 30, N 4. – P. 485–488.

- Liu D., Guo L., Huang L., Jin H., Liu W., Zhu D. Effects of mineral nutrition on metabolism of flavonoids in medicinal plants // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* – 2010. – 35, N 18. – P. 2367–2371.
- Loskutov A. Chaotic dynamics of chemical systems // *Mathematical Methods in Contemporary Chemistry.* – Gordon and Breach., 1995. – P. 181–265.
- Lowry O.B., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall B.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *Biol. Chem.* – 1957. – 193. – P. 265–273.
- Rozman K.K., Doull J. Scientific foundations of hormesis. Pt 2. Maturation, strengths, limitations, and possible applications in toxicology, pharmacology, and epidemiology // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2003. – N 33. – P. 451–462.
- Sharma S.S., Dietz K.J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress // *J. Exp. Bot.* – 2006. – 57, N 4. – P. 711–726.
- Sharma S.S., Schat H., Vooijs R. In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by praline // *Phytochemistry.* – 1998. – 49, N 6. – P. 1531–1535.
- Zhang L.P., Mehta S.K., Liu Z.P., Yang Z.M. Copper-Induced Proline Synthesis is Associated with Nitric Oxide Generation in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant and Cell Physiol.* – 2008. – 49, N 3. – P. 411–419.

Получена 10.01.11

Рекомендовала к печати Е.И. Шнюкова

M.K. Kovalyova<sup>1</sup>, N.G. Menzyanova<sup>1</sup>, Anshu Jain<sup>2</sup>, Abhishek Yadav<sup>2</sup>,  
S.J.S. Flora<sup>2</sup>, A.I. Bozshkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Biology, Kharkov National University by Karazin,  
4, Svobody Sq., 61077 Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Division of Pharmacology and Toxicology, Defense Research and Development  
Establishment, Jhansi Road, Gwalior 474002, India

#### HORMESIS EFFECT OF *DUNALIELLA VIRIDIS* TEODOR. (*CHLOROPHYTA*) UNDER INFLUENCE OF COPPER SULFATE

It was researched the stability of culture *Dunaliella viridis*, which was previously adapted to growth in medium containing 20 mg/L copper sulfate, to high concentrations of copper ions – 75 mg/L copper sulfate. It was shown that such culture is resistant to high concentrations of copper ions, i.e. it is able to develop the effect of hormesis. It was found that resistant to copper ions cells of *D. viridis* accumulated 2000 times more copper ions compared with the control culture cells. The carbonyl proteins content (products of free radical processes) increased only 2 times, the content of Cu<sup>2+</sup> decreased in such cells in the process of cultivation. In CuR culture cells SOD activity increased and the content of free proline decreased in 2 times. Hormesis effect is estimated to become apparent when cooperative behavior of all protection systems of cells occurs. Such behavior is characterized by emergent features (feature is impossible to predict proceeding from features of protection systems elements) but not summation of all protection elements.

**Key words:** toxicity, hormesis, copper ions, *Dunaliella viridis*.