УДК 574; 591.544

А.И. БОЖКОВ, Н.Г. МЕНЗЯНОВА, К.В. СЕДОВА, А.В. ГОЛТВЯНСКИЙ

НИИ биологии, Харьковский национальный ун-т им. В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, 61077 Харьков, Украина

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ И РЕЗИСТЕНТНЫЕ К ИОНАМ МЕДИ КЛЕТКИ *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD. (*CHLOROPHYTA*)

Исследовано содержание и скорость синтеза белков, содержание нуклеиновых кислот и липидов в клетках культур микроводоросли *Dunaliella viridis* (Teod.), чувствительных (CuS-культуры) и резистентных (CuR-культуры) к ионам меди. Установлено, что формирование устойчивости клеток к высоким концентрациям ионов меди сопровождается формированием отличного от контрольной культуры эпигенотипа, который характеризуется уменьшением содержания тотальной РНК, РНК рибосом, уменьшением скорости синтеза белка и содержания тотальных белков, уменьшением фракции белков с мол. массой 70 кДа и появлением фракции белков с мол. массой 35 кДа, увеличением содержания липидов в цитозоле клеток (в 3-10 раз в зависимости от фракции липидов). Показано, что клетки CuR-культуры *D. viridis* обладают повышенной устойчивостью к кратковременному воздействию высокой температуры по сравнению с CuS-культурой. Повышенная терморезистентность CuR-культур *D. viridis* коррелировала не только с уменьшением содержания рибосом и белка, но и с высоким содержанием ионов меди в клетках.

Ключевые слова: белки, липиды, нуклеиновые кислоты, резистентность, температура, *Dunaliella viridis*.

Введение

Токсичность ионов тяжелых металлов изучается достаточно давно. Показано, что в биологических системах они запускают свободнорадикальные процессы (Flora et al., 2008), ингибируют активность разнообразных ферментов (Sarkar et al., 2005), угнетают транскрипцию и синтез белка в клетке (Усенко, Божков, 1991), вызывают мутагенные эффекты (Федорова, 2007) и даже способствуют канцерогенезу (Saffiotti, Bertolerro, 1989; Huff et al., 2007).

Биологические системы разного уровня организации способны также адаптироваться к присутствию ионов тяжелых металлов. Исходя из этого, можно говорить о полифункциональности действия ионов тяжелых металлов, и какие эффекты будут доминировать, зависит от скорости изменения концентрации ионов тяжелых металлов (т.м.) в биологических системах, их функционального состояния и т.д.

Особый интерес представляют механизмы адаптации к т.м. Ранее было показано, что повышенная температура и ионы т.м. индуцируют синтез хит-шоковых белков и металлотионеинов (Margoshes, Vallee, 1957; Ritossa, 1962). Необходимо было определить роль этих стресс-белков в механизмах адаптации. Было установлено, что металлотионеины (МТ) способны связывать достаточно большое количество ионов металлов и таким образом устранять их токсическое действие (Kägi, Kajima, 1987). Дальнейшие исследования значительно расширили представления о функциональной роли МТ в клетке. Оказалось, что индукция МТ является неспецифической реакцией на воздействие различных абиотических факторов: радиации (Saha et al., 2008; Shibuya et al., 2008), высоких и низких температур (Zhang et al., 2007; Leignel et al., 2008; Xue et al., 2009), водного дефицита и засоленности почв (Xue et al., 2009), тяжелых металлов (Lau et al., 2006; Roelofs et al., 2009), гипоксии (Yamasaki et al., 2007).

Эти результаты могут указывать на несколько обстоятельств: во-первых, МТ обеспечивают не только устойчивость клеток к ионам тяжелых металлов, их индукция может являться относительно неспецифической реакцией клетки на комплекс химических соединений; во-вторых, они могут выполнять разнообразные функции в клетке, а не только депонировать ионы металлов; в-третьих, индукция МТ всегда связана с изменением (угнетением) синтеза общего пула белков, что, очевидно, отражает глубокую перестройку всего метаболизма клетки. В пользу последнего свидетельствуют также данные об участии МТ в различных системах сигналинга (Vergani et al., 2009). Однако исследований, характеризующих весь комплекс метаболических изменений, индуцированных присутствием ионов т.м., очень мало.

На основании этого можно предположить, что высокие концентрации ионов т.м. индуцируют изменения паттерна экспрессии генов, структуру мембран клетки, что обусловливает изменение всей системы метаболизма клетки, в т.ч. белков и липидов. В конечном итоге это способствует формированию нового эпигенотипа, который, в отличие от исходного, может обеспечивать и новые свойства клетки, в частности терморезистентность.

Для экспериментальной проверки рабочей гипотезы была получена культура *D. viridis*, устойчивая к высоким концентрациям сернокислой меди для данного вида водорослей, и определена стойкость этой культуры к кратковременному действию высокой температуры. Для оценки возможного совместного эффекта индуцированных метаболических изменений определяли координированные изменения в содержании нуклеиновых кислот, количество рибосом, содержание разных фракций белков и липидов, а также скорость их синтеза.

Методы

В экспериментах использовали альгологически чистую культуру *D. viridis* штамм IBASU-A 29. Микроводоросли культивировали на среде Артари в модификации Масюк (1973) при *T* 25-27 ^{o}C в стандартных условиях (Божков, Мензянова, 2002). Эта культура является медьчувствительной (CuS-культура). При культивировании микроводорослей, резистентных к ионам меди, в среду Артари при каждом пассаже вносили $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ до конечной концентрации 20 мг/л. CuR-культура *D. viridis* в нашей лаборатории поддерживается в таких условиях уже на протяжении 12 лет.

Кратковременная температурная обработка микроводорослей

Для оценки устойчивости клеток водорослей к воздействию высокой температуры культуры CuR *D. viridis* и CuS *D. viridis* сразу после пересадки на свежую среду инкубировали в течение 1,0; 1,5 и 2,0 мин при температуре 45 ˚С. После температурной обработки клетки микроводорослей культивировали в стандартных условиях при *T* 25-27 ^{o}С в течение 14 дней.

Для определения динамики роста количество клеток в культурах подсчитывали в камере Горяева. Количество погибших клеток оценивали по тесту с трипановым синим. Для этого аликвоты клеточных суспензий инкубировали в течение 1-2 мин с 0,6 %-ным трипановым синим и подсчитывали количество окрашенных клеток (Божков, Голтвянский, 1998).

Культивирование микроводорослей с ингибитором синтеза РНК актиномицином Д

Для изучения роли индукции синтеза РНК в формировании термоустойчивости в культуры микроводорослей вносили ингибитор синтеза РНК актиномицин Д.

В одном варианте актиномицин Д в конечной концентрации 0,6 мкг/10^6 кл вносили в культуры микроводорослей сразу после пересадки на свежую среду Артари. Микроводоросли культивировали в стандартных условиях в течение 7 дней и определяли количество клеток, содержащих РНК.

В другом варианте сразу после пересадки на свежую среду Артари в культуры микроводорослей вносили актиномицин Д и инкубировали при *T* 45 ^{o}С, 1,5 мин. После термообработки микроводоросли культивировали в стандартных условиях в течение 7 дней.

Определение содержания ДНК и РНК

Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 10 мин). Клеточные осадки последовательно промывали средой Артари, 3 раза 5 %-ным $HClO_4$ (*T* 4 ^{o}С). Гидролиз РНК проводили в 0,3 н. КОН, при *T* 37 ^{o}С, 1,5 ч, гидролиз ДНК – в 5 %-ной $HClO_4$, при *T* 90 ^{o}С, 20 мин. В гидролизатах РНК и ДНК определяли содержание нуклеотидов, как описано ранее (Божков, Мензянова, 2002).

Определение скорости синтеза белка

В клеточные культуры вносили C^{14}-лейцин (1 МБк/10^6 кл) и инкубировали 30 мин при *T* 25-27 ^{o}С в стандартных условиях. После завершения инкубации для удаления несвязавшейся радиоактивной метки клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 15 мин). Клеточные осадки дважды промывали средой Артари и суспендировали в 5 %-ной $HClO_4$. После гидролиза нуклеиновых кислот осадок общих белков растворяли в 1 н. NaOH, определяли содержание белка по Лоури

(Lowry et al., 1957) и выражали в мкг/10^6 кл. Аликвоты щелочного раствора белков переносили в сцинтилляционные флаконы, вносили диоксановый сцинтиллятор и определяли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике Beckman SL 1700 (USA). Радиоактивность образцов выражали в имп·$мин^{-1}$·$мг^{-1}$ $белка^{-1}$.

Выделение водорастворимых нативных белков

Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 10 мин). Клеточные осадки промывали дистиллированной водой. Клетки разрушали методом замораживания-оттаивания. Осадок разрушенных клеток суспендировали в 0,25 М *трис*-HCl буфере, содержащем 5 мМ ЭДТА, 0,05 М КС1, 1 мМ фенилметил-сульфонилфторида, pH 7,6. Суспензии центрифугировали (3000 g, 10 мин). Осадки повторно суспендировали в 0,25 М *трис*-HCl-буфере и центрифугировали в течение 20 мин при 10000 g. Для осаждения белка к супернатанту добавляли этанол до конечной концентрации 81 % и инкубировали при 4 ^oC, 12 ч. После завершения инкубации осадки белка отделяли центрифугированием (3000 g, 10 мин). К осадку белка добавляли 0,25 М *трис*-HCl-буфер и β-меркаптоэтанол до конечной концентрации 5 %. Пробы инкубировали на водяной бане, при 100 ^oC, 3 мин. После инкубации их центрифугировали (3000 g, 10 мин). Водорастворимые клеточные белки, которые находились в супернатанте, разделяли на фракции методом гельэлектрофореза в полиакриламидном геле (Остерман, 1981).

Выделение рибосом

Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 15 мин), их осадок промывали средой Артари, затем суспендировали в 25 мМ *трис*-HCl-буфере, содержащем 0,25 М сахарозы, 3 мМ ЭДТА, pH 7,5. В суспензию клеток вносили тритон Х-100 до конечной концентрации 0,4 % и инкубировали при 4 ^oC, 10 мин. После инкубации клеточные суспензии разбавляли 25 мМ *трис*-HCl-буфером до конечной концентрации тритона Х-100 0,1 % и гомогенизировали при температуре 4 ^oC. Гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин, при 12000 g, температура 4 ^oC, осадки отбрасывали. Для разрушения мембран эндоплазматического ретикулума в супернатант вносили тритон Х-100 до конечной концентрации 1,5 % и инкубировали при постоянном перемешивании 15 мин при 4 ^oC. После завершения инкубации супернатант разбавляли 25 мМ *трис*-HCl-буфером до конечной концентрации тритона Х-100 0,5 %. Для индукции агрегации рибосом в образцы вносили 1 М $MgCl_2$ до конечной концентрации 0,05 М и инкубировали при постоянном перемешивании 1 ч и температуре 4 ^oC. После завершения инкубации суспензии центрифугировали 60 мин при 105000 g, 4 ^oC. В осадках рибосом определяли содержание РНК (гидролиз в 0,3 н. КОН, как описано выше). Содержание РНК рибосом выражали в мкг/10^6 кл. Супернатант (105000 g, 60 мин, при 4 ^oC) анализировали как фракцию цитозоля.

Определение содержания липидов и белка во фракции цитозоля

Липиды цитозоля экстрагировали последовательно смесями хлороформ-метанол и хлороформ-метанол-вода, затем анализировали методом ТСХ (Сукач и др., 1997). Содержание фракций липидов выражали в мкг/мг белка цитозоля.

Белки цитозоля осаждали 5 % ТХУ, 12 ч при 4 °С. Осадки промывали 96 %-ным этанолом, растворяли в 1 н. NaOH и определяли белок по Лоури.

Все эксперименты проведены в 3-5 повторностях. Стандартную ошибку определяли по методу Стьюдента, а достоверные различия между сравниваемыми вариантами – по критерию Манна-Уитни.

Результаты

Характеристика белкового, нуклеинового и липидного метаболизма в клетках CuS- и CuR-культур микроводорослей D. viridis

В первой серии экспериментов определяли содержание и скорость синтеза белков в клетках CuS- и CuR-культур *D. viridis*. Оказалось, что общее содержание белков в клетках CuR-культур было на 23 % меньше, чем в клетках CuS-культур (табл. 1), что обусловлено уменьшением скорости синтеза белков (см. табл. 1).

Формирование резистентности клетки к ионам меди сопровождалось изменением белкового состава органелл и отдельных компартментов, что, возможно, связано с формированием нового эпигенотипа у этих клеток.

Определение содержания белка во фракции цитозоля показало, что клетки CuS и CuR *D. viridis* не различались между собой по этому показателю (см. табл. 1).

Таблица 1. **Содержание и удельная радиоактивность (УРА) общих клеточных белков, а также содержание белков в цитозоле клеток CuS- и CuR-культур *Dunaliella viridis* на 14-е сут роста в стандартных условиях культивирования**

Экспериментальный вариант	Общие клеточные белки, мкг·10^6 кл	УРА общих клеточных белков, имп·мин$^{-1}$·мг$^{-1}$ белка$^{-1}$	Белки цитозоля, мкг/10^6 кл
CuS-культура	8,79 ± 0,88	51 000 ± 300	2,58 ± 0,15
CuR-культура	6,79 ± 0,99*	38 000 ± 1900*	2,35 ± 0,16

*$p < 0,05$ – достоверные отличия CuR- и CuS-культур.

Определение состава водорастворимых клеточных белков *Dunaliella* (которые экстрагировали 25 мМ *трис*-HCl, pH 7,6), показало, что в этих условиях выделяется около 10 фракций белков (рис. 1). Сравнение состава белков CuS- и CuR-культур показало, что у CuR-культур отсутствуют белки с мол. массой около 70 кДа и появляется фракция белков с мол. массой около 35 кДа (см. рис. 1).

Итак, в процессе адаптации клеток *D. viridis* к высоким концентрациям ионов меди в среде снижается скорость синтеза белков, их количество в клетках, изменяется состав белков, которые экстрагировали 25 мМ *трис*-HCl, pH 7,6.

Подобные изменения, вероятно, не могут не сопровождаться изменениями активности экспрессии генома клетки. Определение содержания тотальных РНК в исследуемых культурах водорослей показало, что в клетках CuR -культур оно было в 1,6 раза меньше, чем в CuS-культурах (табл. 2). Столь значительные изменения в содержании РНК могут быть обусловлены уменьшением содержания, прежде всего, рибосом в клетках CuR-культур. В следующей серии экспериментов количество рибосом, которое определяли по содержанию РНК, в клетках CuR-культур было в 1,7 раза меньше, чем в клетках CuS-культур (см. табл. 2).

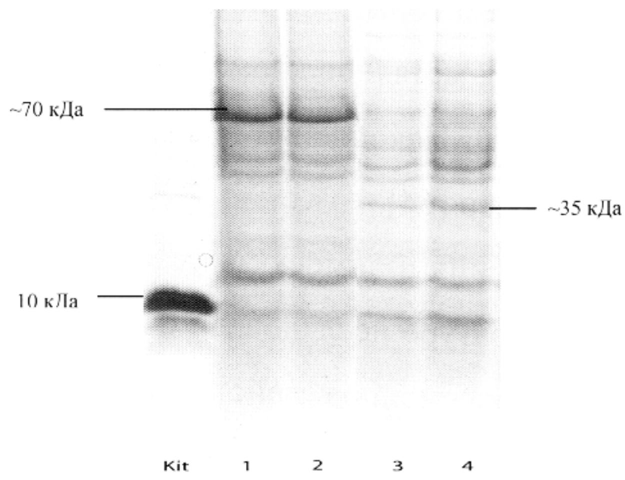

Рис. 1. Электрофореграмма водорастворимых белков клеток CuS- и CuR-культур *Dunaliella viridis* (возраст культур 14 дней). 1-я дорожка – CuS-культура в стандартных условиях культивирования; 2-я – CuS-культура после термообработки при *T* 45 °С, 1,5 мин; 3-я – CuR-культура в стандартных условиях культивирования; 4-я – CuR-культура после термообработки при *T* 45 °С, 1,5 мин

Таблица 2. **Содержание общей РНК и ДНК, РНК рибосом в клетках CuS- и CuR-культур *Dunaliella viridis* на 14-е сут роста в стандартных условиях**

Экспериментальный вариант	РНК, мкг/10^6 кл		ДНК, мкг/10^6 кл
	Общая РНК	РНК рибосом	
CuS-культура	3,91 ± 0,35	0,47 ± 0,02	0,41 ± 0,03
CuR-культура	2,43 ± 0,13*	0,27 ± 0,02*	0,39 ± 0,07

*$p < 0,05$ – достоверные отличия CuR- и CuS-культур.

Такие изменения в накоплении РНК и белков могут быть связаны с изменением в содержании ДНК в результате полиплоидизации или нарушения клеточного цикла. Оказалось, что содержание ДНК было одинаковым в клетках CuR- и CuS-культур *D. viridis* (см. табл. 2).

Несмотря на столь значительное уменьшение содержания белков и РНК, интенсивность роста CuR- и CuS-культур *D. viridis* была одинаковой (рис. 2). Клетки CuR-культур незначительно отличались по морфологии от CuS-культур *D. viridis* (см. рис. 2).

Известно, что реакция клетки на стресс может проявляться также в увеличении содержания липидов и, прежде всего, нейтральных липидов в клетке (Божков, Длубовская, 1992). В клетках микроводорослей, адаптированных к высоким концентрациям ионов меди, содержалось в 3,6 раза больше стероидов, в 8,2 раза больше неэстерифицированных жирных кислот, в 10,6 раза больше триацилглицеридов по сравнению с клетками штамма CuS *D. viridis* (табл. 3). Количество фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина возрастало в 3,7 раза, фосфатидилинозитола – в 6,4 раза у CuR-культур по сравнению с CuS-культурами (см. табл. 3).

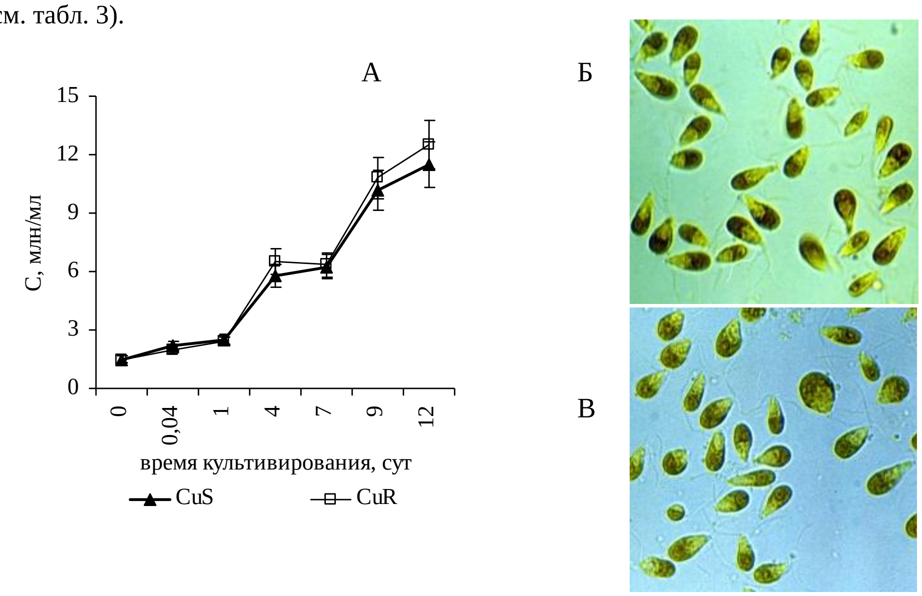

Рис. 2. Динамика роста CuS- и CuR-культур *Dunaliella viridis* в стандартных условиях культивирования (*А*) и морфология клеток CuS- (*Б*) и CuR-культур (*В*) на 12-е сут роста. х 280

Следовательно, формирование резистентности клеток *D. viridis* к ионам меди сопровождается значительным увеличением содержания липидов в клетках. При этом разные фракции липидов изменяются по-разному, что свидетельствует о перестройке системы метаболизма липидов в клетках водорослей в процессе адаптации к ионам меди.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при длительной адаптации культуры клеток *D. viridis* к ионам меди происходит генерализованная перестройка всех структур клетки, которая выражается в уменьшении количества рибосом, тотальной РНК, снижении интенсивности синтеза белка, уменьшении содержания общих белков клеток, отсутствии белков с мол. массой около 70 кДа, появлении белка с мол. массой 35 кДа и многократном увеличении содержания липидов в клетках, т.е. формировании у CuR-культур *D. viridis* иного, в отличие от CuS *D. viridis*, эпигенотипа.

Таблица 3. **Содержание фракций нейтральных липидов и фосфолипидов в цитозоле клеток CuS- и CuR-культур *Dunaliella viridis* на 14-е сут роста в стандартных условиях культивирования**

Экспериментальный вариант	Нейтральные липиды, мкг/мг белка цитозоля		
	Ст	НЭЖК	ТГ
CuS-культура	29,4 ± 4,22	23,5 ± 0,56	25,3 ± 1,45
CuR-культура	105,6 ± 8,34*	189,6 ± 17,42*	266,9 ± 4,76*
	Фосфолипиды, мкг/мг белка цитозоля		
	ФХ	ФИ	ФЭА
CuS-культура	59,3 ± 1,93	36,5± 2,52	58,3 ± 14,03
CuR-культура	218,0± 15,04*	232,2±24,02*	220,8± 40,94*

Ст – стероиды, НЭЖК – неэстерифицированные жирные кислоты, ТГ – триацилглицериды, ФХ – фосфатидилхолин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФЭА – фосфатидилэтаноламин.
*$p < 0{,}05$ – достоверные отличия CuR-культуры от CuS-культуры.

Несмотря на столь глубокую перестройку метаболизма, адаптированные к ионам меди клетки не отличались от контрольного варианта интенсивностью роста, что свидетельствует о том, что метаболическая вариабельность клеток *D. viridis* чрезвычайно высока.

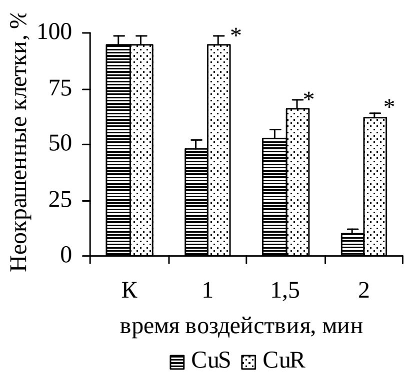

Рис. 3. Количество неокрашенных (жизнеспособных) клеток (% общего кол-ва клеток) в CuS- и CuR-культурах *Dunaliella viridis* через 1 ч после термической обработки (45 °С, в течение 1,0; 1,5; 2 мин). К – контрольный вариант, без термической обработки. *$p < 0{,}05$ – достоверные отличия CuR- и CuS-культуры

Устойчивость CuS- и CuR-культур микроводорослей D. viridis к кратковременному действию высокой температуры

Было установлено, что 50 % клеток культуры CuS *D. viridis* после термической обработки в течение 1 и 1,5 мин при температуре 45 °С погибают. Если время пребывания этой культуры при той же температуре увеличивалось до 2 мин, то спустя 1 ч после термошока погибало до 90 % клеток (рис. 3). Следовательно, клетки контрольного штамма *D. viridis* достаточно чувствительны к повышению температуры, и даже кратковременное ее повышение до 45 °С ведет к гибели бóльшей части клеток в культуре *D. viridis*.

Иную реакцию на повышение температуры наблюдали в культуре клеток, адаптированных к высоким концентрациям ионов меди. Так, если клетки CuR

D. viridis прогревали до 45 ^{o}C в течение 1 мин, то все клетки оставались живыми, а увеличение времени прогревания такой культуры до 2 мин сопровождалось гибелью не более 38 % клеток. Итак, штамм *D. viridis*, резистентный к ионам меди, обладает выраженной устойчивостью к кратковременному воздействию высокой температуры по сравнению с культурой водоросли, чувствительной к ионам меди.

Интенсивность роста культуры CuS *D. viridis* после 1- и 1,5-минутного повышения температуры до 45 ^{o}C отставала в 1,5 и 1,6 раза, соответственно, от культуры CuS *D. viridis*, которая не подвергалась такой термообработке, а после 2-минутного воздействия не восстанавливала своей численности (рис. 4).

Если такому же воздействию подвергали культуру клеток CuR *D. viridis*, то интенсивность ее роста мало отличалась от скорости роста контрольного варианта, даже после 2-минутного прогрева (рис. 4). Эти результаты свидетельствуют о том, что культура CuR *D. viridis* не только более устойчива, но и способна достаточно быстро восстанавливаться после действия высокой температуры.

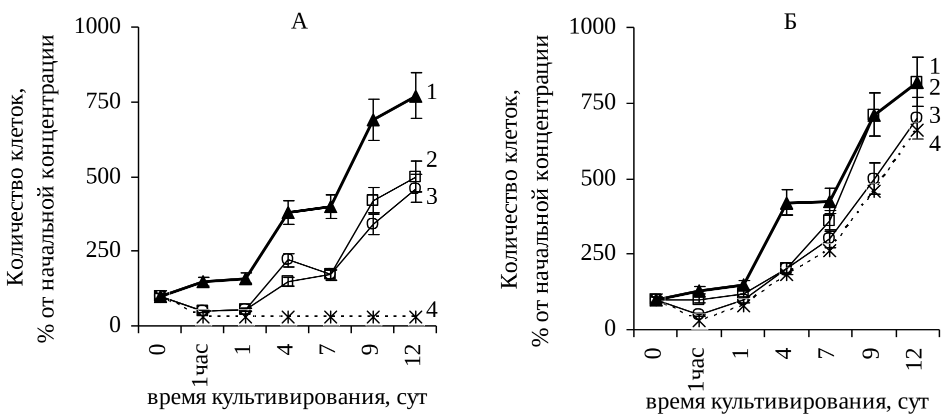

Рис. 4. Динамика роста CuS- (*А*) и CuR-культур (*Б*) *Dunaliella viridis* после термообработки (45 ^{o}C) различной продолжительности: контрольный вариант, без термообработки (*1*); термообработка в течение 1 мин (*2*), 1,5 мин (*3*), 2 мин (*4*)

Характеристика белкового, нуклеинового и липидного метаболизма в клетках CuS и CuR D. viridis после термообработки

Содержание общего белка в культурах CuS *D. viridis* незначительно уменьшалось после термообработки этих культур по сравнению с культурами, не подвергавшимися термошоку (рис. 5). Однако в клетках CuR *D. viridis* мы не обнаруживали достоверных изменений в содержании общих белков по сравнению с клетками до термошока (см. рис. 5). Это коррелировало с синтезом белков в этих клетках. Так, действие термошока сопровождалось угнетением интенсивности синтеза белков в клетках CuS *D. viridis* (в 1,5 раза) по сравнению с контрольной культурой CuS *D. viridis*, в то время как в клетках CuR *D. viridis* синтез белков оставался неизменным по сравнению с контрольным вариантом (см. рис. 5). А вот содержание белков цитозоля увеличивалось после термошока практически в равной степени у CuS *D. viridis* и CuR *D. viridis* по сравнению с соответствующими культурами (рис. 6).

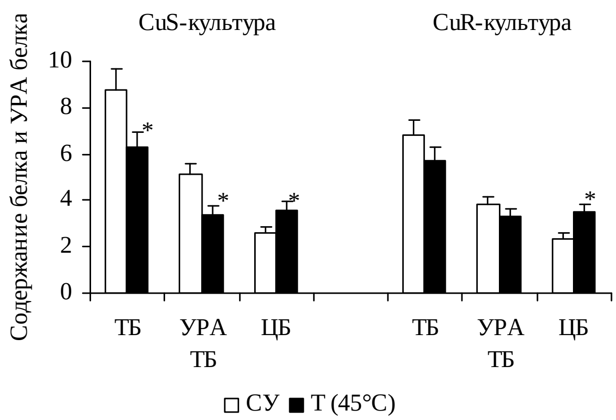

Рис. 5. Содержание общих клеточных белков (ТБ), удельная радиоактивность общих клеточных белков (УРА ТБ), содержание белков в цитозоле (ЦБ) клеток CuS- и CuR-культур *Dunaliella viridis* на 14-е сут роста в стандартных условиях культивирования (СУ) и после термообработки, 45 °С, 1,5 мин, *T* 45 °С. Содержание общего белка и содержание белка в цитозоле выражено в мкг/10^6 кл, УРА общего белка – в имп· мин/мг$^{-1}$ белка$^{-1}$·10^4. **p* < 0,05 – достоверные отличия значения после температурной обработки от значений в стандартных условиях культивирования

После термошока наиболее выражено изменялось содержание нуклеиновых кислот. Так, содержание тотальной РНК увеличивалось после термошока в 1,7 и 1,6 раза в клетках CuS и CuR *D. viridis*, соответственно, а содержание РНК рибосом – в 1,5 и 2,6 раза, соответственно, по сравнению с контролем (см. рис. 6).

Только в клетках CuS *D. viridis* после термошока увеличивалось содержание ДНК (см. рис. 6). Очевидно, повышение температуры ингибирует завершение митотического цикла в клетках CuS *D. viridis*, но не в клетках CuR *D. viridis*, что угнетает динамику роста CuS *D. viridis* на фоне высокой температуры.

По всей видимости, индукция синтеза РНК и увеличение содержания рибосом в клетке играют важную роль в формировании устойчивости к термошоку. Для определения возможной взаимосвязи между усилением синтеза РНК, увеличением содержания рибосом и термотолерантностью синтез РНК в клетках CuR *D. viridis* ингибировали актиномицином Д таким образом, чтобы количество РНК после термообработки не увеличивалось и оставалось на уровне контроля. Для этого экспериментально подбирали концентрацию актиномицина Д, ингибирующую синтез РНК на 70-80 %, которая соответствовала 0,6 мкг актиномицина Д на 10^6 клеток *D. viridis*.

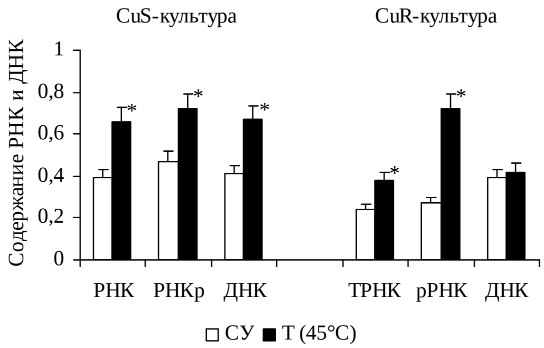

Рис. 6. Содержание общей РНК, РНК рибосом (РНКр), ДНК в клетках CuS- и CuR-культуры *Dunaliella viridis* на 14-е сут роста в стандартных условиях культивирования (СУ) и после термообработки, 45 °С, 1,5 мин, (*T* 45 °С). Содержание общей РНК выражено в мкг/10^5кл, содержание рРНК и ДНК – в мкг/10^6 кл. *$p < 0,05$ – достоверные отличия значения после температурной обработки от значений в стандартных условиях культивирования

Если на 7-е сутки от начала эксперимента содержание РНК в контрольной культуре CuR *D. viridis* составляло 2,4 мкг/млн кл, и после термошока (45 °С, 1,5 мин) оно увеличивалось на 54 %, то при культивировании клеток в присутствии 0,6 мкг актиномицина Д на 10^6 клеток и такого же термошока содержание РНК оставалось неизменным по сравнению с контролем (табл. 4).

Определение интенсивности роста культуры в таких условиях показало, что ингибирование синтеза РНК не приводит к гибели культуры *D. viridis*, хотя при этом количество клеток не изменяется (рис. 7).

В случае, если клетки подвергаются термообработке (45 °С, 1,5 мин) на фоне ингибирования синтеза РНК актиномицином Д, на 7-е сутки количество клеток уменьшается по сравнению с контролем (см. рис. 7).

Можно полагать, что увеличение синтеза РНК после кратковременного действия высокой температуры способствует формированию толерантности, хотя и не определяет ее в полной степени. Поэтому в следующей серии экспериментов была установлена возможность прямого участия ионов меди в формировании толерантности клеток CuR *D. viridis.*

Таблица 4. **Содержание общей РНК в клетках CuR-культуры *Dunaliella viridis* на 7-е сутки роста**

Экспериментальный вариант	Содержание РНК, мкг/10^6кл
Среда Артари, содержащая 20 мг/л $CuSO_4$	2,43+0,14
Среда Артари, содержащая 20 мг/л $CuSO_4$, температурная обработка, 45 °С, 1,5 мин	3,71+0,32*
Среда Артари, содержащая 20 мг/л $CuSO_4$ и актиномицин Д, температурная обработка, 45 °С, 1,5 мин	2,75+0,24

*$p < 0,05$ – достоверное отличие экспериментального варианта 2 от вариантов 1 и 3.

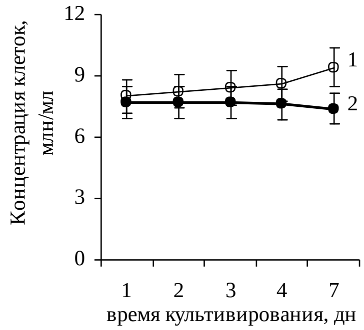

Рис. 7. Динамика роста CuR-культуры *Dunaliella viridis* на среде Артари, содержащей 20 мг/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и актиномицин Д (0,6 мкг/10^6 кл) в стандартных условиях (*1*) и после термообработки (45 ^oC, 1,5 мин) (*2*)

О возможном прямом участии ионов меди в индукции термотолерантности

Как было показано, культивирование клеток *D. viridis* на среде с высоким содержанием ионов меди сопровождается накоплением ее в клетках и связыванием с различными белками, мембранами и клеточными ядрами (Божков, 1997). Возможно, ионы меди, связываясь с компонентами клетки, влияют на их конформационное состояние и такие комплексы обладают повышенной устойчивостью к высокой температуре. Перевод CuR *D. viridis* на среду, не содержащую ионы меди, сопровождается довольно быстрым освобождением клеток от экзогенных ионов меди (Божков, Могилянская, 1996). В первой серии экспериментов определяли содержание ионов меди в клетках CuS и CuR *D. viridis* в исходном состоянии и спустя несколько суток после перевода CuR *D. viridis* на среду без ионов меди. Оказалось, что в клетках культуры CuS *D. viridis* содержалось 0,02 мкг меди на 10^6 кл, а в клетках CuR *D. viridis* – в 57 раз больше (табл. 5). Спустя сутки после перевода CuR *D. viridis* на среду без ионов меди их содержание в клетках уменьшалось до контрольного уровня (см. табл. 5).

Таблица 5. **Содержание ионов меди в клетках (мкг·10^6 кл) CuS- и CuR-культур *Dunaliella viridis* при разных экспериментальных вариантах**

Экспериментальный вариант		
CuS-культура	CuR-культура	
Стандартная среда Артари без внесения $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Стандартная среда Артари+20 мг/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Через сутки после перевода на стандартную среду Артари, не содержащую $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
0,020±0,007	^1,14±0,07*	^0,21±0,03*

*p < 0,05 – достоверные отличия CuR- и CuS-культуры. ^ p < 0,05 – достоверные отличия для CuR-культуры на среде Артари+20 мг/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ от варианта для CuR-культуры на стандартной среде Артари.

Если культура CuR *D. viridis* росла на среде без ионов меди 2-4 сут, клетки освобождались от ионов меди, сохраняя индуцированную медерезистентность на прежнем уровне, т.е. они росли как культура CuR *D. viridis*. Это проявлялось в том, что рост таких культур не угнетался при внесении в среду 20 мг/л сернокислой меди (рис. 8). Тогда можно полагать, что за время культивирования без ионов меди (2-4 сут) метаболические изменения, которые были описаны в предыдущем разделе (содержание и спектральный состав белков, нуклеиновых кислот и липидов) и обеспечивающие CuR *D. viridis* устойчивость, сохранялись.

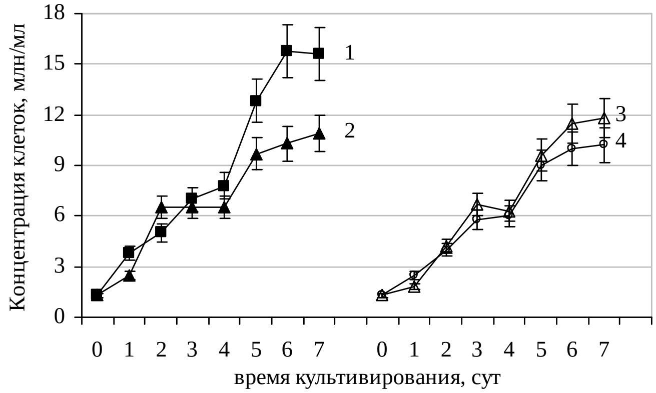

Рис. 8. Динамика роста CuR-культуры *Dunaliella viridis* на среде Артари без внесения (*1*) и после внесения (*2*) $CuSO_4 \cdot H_2O$ (20 мг/л) в среду на 2-е и 4-е сут культивирования без ионов меди; после 2 (*3*) и 4 сут (*4*) культивирования с последующим внесением $CuSO_4 \cdot H_2O$ до концентрации 20 мг/л

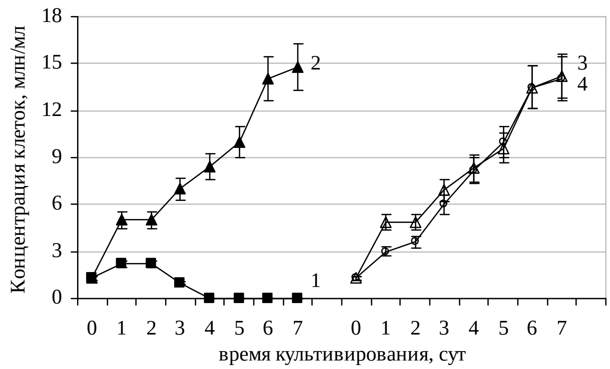

Рис. 9. Динамика роста CuR-культуры *Dunaliella viridis* после термообработки. Культивирование на среде без внесения (*1*) и с внесением $CuSO_4 \cdot H_2O$ до конечной концентрации 20 мг/л (*2*); культивирование на среде без ионов меди в течение 2 (*3*) и 4 (*4*) суток с последующим внесением $CuSO_4 \cdot H_2O$ до конечной концентрации 20 мг/л

В следующей серии экспериментов определяли способность клеток CuR *D. viridis*, богатых и обедненных ионами меди, но с одинаковым уровнем медерезистентности, переносить термошок. Оказалось, что если культуру CuR *D. viridis* 2 или 4 суток культивировать на среде без меди, она вновь обогащается ионами меди (путем культивирования в течение суток в присутствии 20 мг/л сернокислой меди), а затем подвергнуть термообработке (45 °C, 1,5 мин; рис. 9, *3*, *4*), то клетки имеют такую же устойчивость к нагреванию, как и исходная CuR *D. viridis* (рис. 9, *2*).

В том случае, если CuR *D. viridis* переводили на 2 и 4 суток на среду без меди, а затем подвергали термошоку, то такие клетки погибали (не смотря на наличие индуцированных метаболических изменений), как и клетки Cu S *D. viridis,* т.е. значительное уменьшение содержания ионов меди в клетках CuR *D.viridis* сопровождается полной потерей термотолерантности (рис. 9, *1*).

Следовательно, присутствие высоких концентраций ионов меди в клетках сопряжено с их повышенной терморезистентностью.

Обсуждение

При обсуждении механизмов формирования устойчивости организма к ионам металлов чаще всего анализируется роль МТ в этих процессах. В присутствии ионов металлов многократно увеличивается количество МТ в клетке, они способны связывать достаточно большое количество эндогенных ионов металлов, депонировать их, и, возможно, обеспечивать их внутриклеточный транспорт (Kägi, Kajima, 1987). Однако многочисленные исследования показали, что не все ионы металлов в одинаковой степени индуцируют синтез МТ (Remondelli et al., 1990). Как уже отмечалось, синтез МТ индуцируется не только ионами металлов, но и другими соединениями (Zhang et al., 2007; Saha et al., 2008). Даже после индукции МТ ионы металлов связываются практически со всеми компонентами клетки, т.е. МТ не обеспечивают «прямой» защиты от ионов металлов (Божков, 1997). Эти и целый ряд других результатов указывают на то, что индуцированная резистентность к ионам металлов, и в частности к ионам меди, обеспечивается, возможно, и другими механизмами, которые могут затрагивать всю метаболическую систему клетки. Это подтверждают и наши исследования.

Так, многократное (более чем в 50 раз) увеличение количества ионов меди в клетках CuR *D. viridis* приводило к небольшому уменьшению содержания общих белков в клетках *D. viridis* и к изменению состава части клеточных белков. Конечно, у CuR *D. viridis* изменяются не все белки, обеспечивающие жизненно важные процессы клетки. Отсутствие фракции водорастворимых белков клетки с мол. массой 70 кДа и появление белка с мол. массой 35 кДа показывает, что для клеток *D. viridis* характерна достаточно высокая вариабельность состава клеточных белков. При этом скорость накопления биомассы, морфологические характеристики клеток *D. viridis* у них практически не изменяются. Какая функция появляющихся у CuR *D. viridis* белков с мол. массой 35 кДа – ответить пока трудно, однако можно утверждать, что такой эпигенотип клеток характеризуется большей устойчивостью к ионам меди по сравнению с эпигенотипом, в котором эти белки отсутствуют (CuS *D. viridis*).

Однако еще более значительной была индукция изменения белок-синтезирующего аппарата. Несмотря на небольшое (около 20 %) уменьшение содержания общих белков в клетках CuR *D. viridis*, у них было в 1,6-1,7 раза меньше рибосом и, соответственно, общей РНК.

Такое уменьшение рибосом при небольшом изменении содержания белка может свидетельствовать об изменении их функциональной активности. Как известно, значительная часть рибосом связана с мембранами эндоплазматической сети, формируя гранулярную эндоплазматическую сеть в клетке, в то время как основным местом синтеза липидов является гладкая эндоплазматическая сеть. Столь значительное увеличение содержания липидов (3-10 раз) в цитозоле клеток CuR *D. viridis* свидетельствует о том, что в клетках CuR *D. viridis* увеличено количество гладкой эндоплазматической сети.

Следовательно, уменьшение количества рибосом и шероховатой эндоплазматической сети на фоне увеличения гладких мембран и увеличение количества липидов указывают на функциональную перестройку внутриклеточных мембран клетки. Такая глубокая перестройка метаболической системы клетки в результате формирования резистентности к ионам меди сопровождается формированием нового, отличного от CuS *D. viridis* эпигенотипа.

Если представить клеточный эпигенотип как соотношение ряда функциональных характеристик клетки, то его можно изобразить графически. Эпигенотипы CuS – и CuR *D. viridis* имеют четко выраженные различия (рис. 10). Это может свидетельствовать о генерализованных изменениях в клетке при формировании резистентности к ионам меди. В CuR *D. viridis* содержится достаточно большое количество ионов меди, которое связано с внутриклеточными мембранами, клеточными ядрами, белками цитозоля. Это приводит к изменению функциональных характеристик этих компонентов клетки.

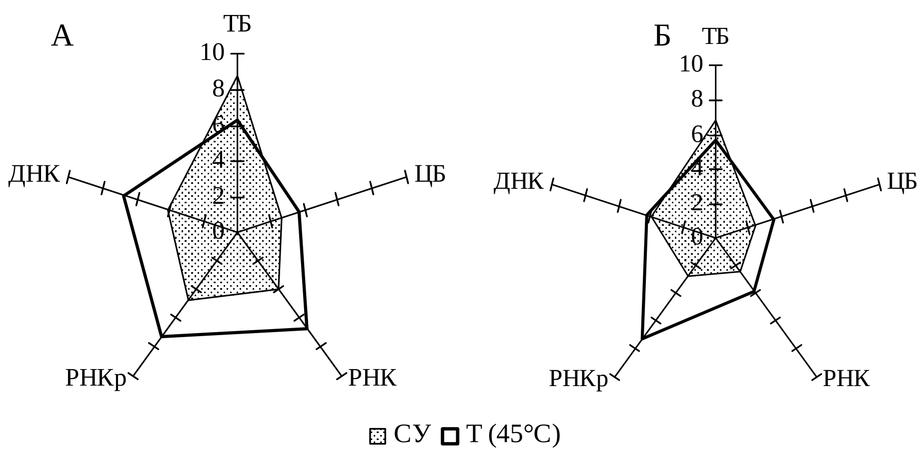

Рис. 10. Функциональные эпигенотипы CuS- (*А*) и CuR-культур (*Б*) *Dunaliella viridis*, формирующиеся в стандартных условиях культивирования (СУ) и после температурной обработки (*Т* 45 °С). Содержание тотального белка (ТБ), белка в цитозоле (ЦБ), тотальной РНК выражено в мкг/10^6 кл; содержание ДНК и РНК рибосом – в мкг/10^7 кл

Индуцированные ионами меди эпигенетические изменения в клетках CuR *D. viridis* при длительном культивировании способны «закрепляться» – перевод культуры CuR *D. viridis* на среду без ионов меди сохраняется на протяжении двух пассажей, как показано в данной работе. На основании этого можно говорить не о вариабельности флуктуации исследуемых метаболических показателей, а о координированном (генерализованном) изменении функционально связанных систем, т.е. о формировании нового эпигенотипа.

Выраженные изменения эпигенотипа у CuR *D. viridis* могут не сопровождаться столь же выраженными изменениями в морфологии и динамике роста этих клеток по сравнению с CuS *D. viridis*. Это означает, что морфо-функциональные характеристики могут реализовываться при разных эпигенетических вариантах. Такая перестройка эпигенотипа в присутствии ионов меди может иметь кооперативный характер. Под кооперативностью понимают такое состояние системы, при котором состояние одного элемента зависит от состояния других элементов системы, т.е. коллективное поведение элементов системы.

Это подтверждают результаты по приобретению клетками CuR *D. viridis* повышенной устойчивости к кратковременному воздействию повышенной температуры.

Формирование резистентности CuR *D. viridis* и к кратковременному влиянию летальной температуры может объясняться функционированием разных механизмов.

В первом случае можно полагать, что при формировании резистентности клеток *D. viridis* к ионам меди индуцируется синтез специфических стресс-белков в т.ч. и МТ. Эта группа стресс-белков обеспечивает повышенную устойчивость мембранной системы клетки к кратковременному действию высокой температуры.

Во втором случае может иметь место формирование специфического эпигенотипа, для которого характерно увеличение содержания нейтральных липидов и фосфолипидов, уменьшенное содержание рибосом и синтезирующих белков и что большая часть функционально активных макромолекул дополнительно связана с ионами меди. Изменение состава и увеличение количества ионов меди, связанной с различными компартментами клетки, обеспечивает также такой клетке повышенную устойчивость к кратковременному воздействию высокой температуры. Сформировавшийся у CuR *D. viridis* эпигенотип должен быть способен по-иному (по сравнению с CuS *D. viridis*) «реагировать» на действие высокой температуры.

Об этом свидетельствуют результаты данной работы. Так, кратковременное воздействие высокой температуры угнетало интенсивность синтеза белка у CuS *D. viridis* в 1,5 раза и не влияло на него у CuR *D. viridis*. Белоксинтезирующий аппарат в клетках, резистентных к ионам меди, оказался более устойчивым к воздействию температуры. В основе этого феномена может лежать несколько механизмов: во-первых, белки, которые появились на фоне высокой концентрации ионов меди, обладают более высокой толерантностью по сравнению с белками, синтезируемыми у CuS *D. viridis*. Большой устойчивостью к температуре характеризовались и мембраны CuR *D. viridis*. Об этом свидетельствуют и результаты с тестом трипанового синего (см. рис. 3). Во вторых, многократное увеличение содержания ионов меди в клетках CuR *D. viridis* и ее связывание с разнообразными белками и в составе органелл клетки может приводить к изменению структурно-функциональных свойств этих комплексов, что проявляется в повышении термотолерантности. И, в-третьих, возможен синтез белков теплового шока, которые могут вносить вклад в формирование термотолерантности.

Следовательно, индукция устойчивости клеток к ионам меди и комбинированная устойчивость к высокой температуре связаны с изменением состава и свойств (после связывания с ионами меди) белков.

В культурах CuS и CuR *D. viridis* после действия высокой температуры наблюдались также изменения характеристик белоксинтезирующего аппарата. Так, кратковременное действие высокой температуры сопровождалось небольшим увеличением числа рибосом (в 1,5 раза) у CuS *D. viridis* и их значительным увеличением (в 2,6 раза) в клетках CuR *D. viridis* (см. рис. 6).

Различная ответная реакция CuS и CuR *D. viridis* на воздействие высокой температуры проявлялась и в содержании ДНК. Так, увеличение содержания ДНК в клетках может быть индуцировано разными причинами. В частности, увеличение содержания ДНК в клетках CuS *D. viridis* может быть связано с нарушением скорости прохождения клеточного цикла. В то же время на содержание ДНК в клетках, резистентных к ионам меди, высокая температура не влияла. Можно полагать, что в клетках CuR *D. viridis* сформировалась устойчивость генетического аппарата к кратковременному воздействию высокой температуры.

Выводы

1. В клетках *Dunaliella viridis*, резистентных к токсическому действию ионов меди, содержание ионов меди в 50 раз выше по сравнению с клетками контрольной культуры. При этом культуры CuS- и CuR *D. viridis* практически не различались между собой динамикой роста и морфологией клеток.

2. Индукция резистентности к ионам меди сопровождалась генерализованным изменением метаболической системы. Так, у них было уменьшено содержание белков (23 %), изменялся состав водорастворимых белков клетки, отсутствовали белки с мол. массой 70 кДа и появлялись белки с мол. массой 35 кДа. Уменьшалось содержание рибосом в 1,6-1,7 раза и увеличивалось содержание нейтральных липидов и фосфолипидов в 3-10 раз.

3. В результате генерализованных, кооперативных изменений метаболической системы в клетках CuR *D. viridis* формировался иной эпигенотип по сравнению с клетками CuS *D. viridis*, который обеспечивал им также бо́льшую терморезистентность.

A.I. Bozhkov, N.G. Menzyanova, K.V. Sedova & A.V. Goltvyanskiy

Research Institute of Biology of Kharkov National University named after V.N. Karazin,
4, Svoboda Sq., 61077 Kharkov, Ukraine,
bozhkov@univer.kharkov.ua

EFFECT OF HIGH TEMPERATURE ON SENSITIVITY AND RESISTANCE TO THE COPPER IONS OF *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD. (*CHLOROPHYTA*) CELLS

The protein synthesis activity and protein content, the content of the different t ypes of nucleic acids and lipids in cells of microalgae *Dunaliella viridis* Teod., copper-sensitive culture (CuS-culture) and copper resistant culture (CuR-culture), were researched. It was found, that formation of cell resistance to high copper concentration was accompanied by the formation different from the control culture epigenotype, which was characterized by: a) decreasing total RNA and ribosomal RNA content; b) decreasing protein synthesis activity and protein content; c) decreasing protein 70 kDa fr action and increasing protein 35 kDa fraction; d) increasing lipid content in cytosol (3-10 times for different lipid fraction). It is shown that cells of CuR -culture *D. viridis* have increased resistance to short-term effects of high temperature (45 ˚C for 1.5-2.0 min) compared with the of CuS-culture. Increased thermoresistance CuR-cultures of *D. viridis* correlated not only with decreasing content of ribosomes and protein, but with a high content of copper ions in cells.

K e y w o r d s : proteins, lipids, nucleic acids, resistance, temperature, *Dunaliella viridis*.

Божков А.И., Длубовская В.Л. Липидный обмен и структурно-функциональные особенности мембран эндоплазматического ретикулума регенерирующей печени крыс // Биохимия. – 1992. – **53**, № 2. – С. 8-15.

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

Божков А.И. Три дозозависимые стадии действия ионов меди на функциональную активность биологических систем // Биохимия. – 1997. – **62**, № 2. – С. 176-186.

Божков А.И., Голтвянский А.В. Индукция резистентности к сернокислой меди у *Dunaliella viridis* Teod. // Альгология. – 1998. – **8**, № 2. – С. 162-169.

Божков А.И., Мензянова Н.Г. Влияние этилового спирта на метаболизм водорослей. Метаболизм нуклеиновых кислот и белка в клетках *Dunaliella viridis* Teod. // Там же. – 2002. – **12**, № 3. – С. 300-308.

Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы его практического использования. – Киев: Наук. думка, 1973. – 243 с.

Сукач А.Н., Божков А.И., Мензянова Н.Г., Скляр А.И., Белоус А.М. Выделение двух фракций гепатоцитов и характеристика их липидного состава // Укр. биохим. журн. –1997. – **69**, № 4. – С. 53-60.

Усенко Е.В., Божков А.И. Влияние тяжелых металлов на динамику роста и функциональную активность генетического аппарата *Chlorella vulgaris* // Биол. науки. – 1991. – № 3. – С. 69-76.

Федорова А.И., Калаев В.Н., Просвирина Ю.Г., Горяйнова С.А. Мутагенная активность тяжелых металлов в почвах придорожной полосы // Почвоведение. – 2007. – № 8. – С. 998-1005.

Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практ. пособие). – М.: Наука, 1981. – 288 с.

Flora S.J.S., Mittal M., Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy // Ind. J. Med. Res. – 2008. – **128**. – P. 501.

Huff J., Lunn R.M., Waalkes M.P., Tomatis L., Infante P.F. Cadmium-induced cancers in animals and in humans // Int. J. Occup. Environ. Health. – 2007. – **13**. – P. 202.

Kägi J., Kajima Y. Chemistry and biochemistry of metalothioneines // Exp. Suppl. – 1987. – **52**. – P. 25-61.

Lau A.T., Zhang J., Chiu J.F. Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: roles of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein // Toxicol. Appl. Pharm. – 2006. – **215**, N 1. – P. 1-8.

Leignel V., Marchand J., Moreau B., Chénais B. Metallothionein genes from hydrothermal crabs (*Bythograeidae*, *Decapoda*): characterization, sequence analysis, gene expression and comparison with coastal crabs // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharm. – 2008. – **148**, N 1. – P. 6-13.

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.

Margoshes M., Vallee B.L. A cadmium protein from equine kidney cortex // J. Amer. Chem. Soc. – 1957. – **79**. – P. 4813-4814.

Remondelli P., Minichiello L., Cigliano S., Leone A. // Cell. Biol.: Intern. Repts. 3rd Europ. Cong. Cell Biol. (2-7 Sept., 1990, Firenze, Italy). – London, etc., 1990. – P. 7.

Ritossa F. A new puffing pattern induced by shock DNP in *Drosophila* // Experientia. – 1962. – **18**. – P. 571-573.

Roelofs D., Janssens T.K., Timmermans M.J. et al. Adaptive differences in gene expression associated with heavy metal tolerance in the soil arthropod *Orchesella cincta* // Mol. Ecol. – 2009. – **18**, N 15. – P. 3227-3239.

Saffiotti U., Bertolerro F. Neoplastic transformation of BALB/3T3 cells by metals and the quest for induction of a metastatic phenotype // Biol. Trace Elem. Res. – 1989. – **21**. – P. 475.

Saha P., Mishra D., Chakraborty A. et al. In vitro radiation induced alterations in heavy metals and metallothionein content in *Plantago ovata* Forsk // Ibid. – 2008. – **124**, N 3. – P. 251-261.

Sarkar S, Floto R.A., Berger Z. et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase // J. Cell Biol. – 2005. – **170**. – P. 1101.

Shibuya K., Suzuki J.S., Kito H. et al. Protective role of metallothionein in bone marrow injury caused by X-irradiation // J. Toxicol. Sci. – 2008. – **33**, N 4. – P. 479-484.

Vergani L., Lanza C., Scarabelli L. et al. Heavy metal and growth hormone pathways in metallothionein regulation in fish RTH-149 cell line // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharm. – 2009. – **149**, N 4. – P. 572-580.

Xue T., Li X., Zhu W., Wu C., Yang G., Zheng C. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast // J. Exp. Bot. – 2009. – **60**, N 1. – P. 339-349.

Yamasaki M., Nomura T., Sato F., Mimata H. Metallothionein is up-regulated under hypoxia and promotes the survival of human prostate cancer cells // Oncol. Rep. – 2007. – **18**, N 5. – P. 1145-1153.

Zhang B., Xue L.Q., Li L.L. et al. Effects of exogenous metallothionein on thermoresistance and SOD gene expression of dairy cattle // Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. – 2007. – **18**, N 1. – P. 193-198.

Получена 11.11.09

Рекомендовала к печати Е.И. Шнюкова