■ ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.17 + 576.311.348.7 + 546.95 + 632.95.02

УЧАСТИЕ ЦИТОСКЕЛЕТА РАСТЕНИЙ В РЕАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ТОКСИЧНОСТИ МЕТАЛЛОВ

И.И. ГОРЮНОВА, Ю.А. КРАСИЛЕНКО, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев
E-mail: inna.horiunova.ukr@gmail.com

Обобщены литературные данные и результаты собственных исследований авторов, касающиеся участия цитоскелета растительных клеток в реализации клеточных механизмов токсичности металлов. Рассмотрены особенности цитотоксического действия металлов на растительный цитоскелет, в частности, на микротрубочки и актиновые филаменты. Особое внимание уделено клеточным и молекулярным механизмам действия металлов на цитоскелет. Обсуждены наиболее вероятные сайты связывания с тяжелыми металлами, а также альтернативные механизмы их воздействия на цитоскелет.

Ключевые слова: *эукариотические клетки, цитоскелет, микротрубочки, актиновые филаменты, тяжелые металлы, цитотоксичность.*

Введение. Согласно наиболее распространенной химической классификации под определение «тяжелые металлы» подпадают элементы с металлическими свойствами и атомной массой свыше 40–50 Да и плотностью 4 ± 1 г/см^3 [1]. Существуют также классификации тяжелых металлов по буквенному названию орбитали, на которой размещен последний атом металла (*s-, p-, d-* и *f*-блоки), а также на основе свойств кислоты Льюиса [1]. Следует отметить, что многие распространенные тяжелые металлы, к примеру, железо, медь, цинк, молибден и др. выполняют ряд регуляторных функций в клетках про- и эукариот, выступая в роли микро- и ультрамикроэлементов [2]. Однако при превышении физиологических концентраций указанные элементы способны вызывать цитотоксические эффекты [3]. Поэтому в настоящем обзоре нами использована классификация металлов, согласно которой можно выделить две группы на основе их роли в минеральном питании растений: 1) металлы – микро- и ультрамикроэлементы (так называемые *essential elements* – Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co и др.), становящиеся токсичными при превышении их определенных концентраций; 2) металлы с выраженными токсическими свойствами в минимальных концентрациях, функциональная роль которых неизвестна (*non-essential elements* – Cd, Pb, Hg и др.) [4]. «Несущественные» металлы, или же «неэссенциальные», условно объединенные во вторую группу, заведомо токсичны, если их внутриклеточная биологически доступная концентрация превышает возможности физиологических систем детоксикации клеток растений [5].

На клеточном уровне в ответ на поступление токсичных металлов происходит изменение свойств клеточной стенки, деградация плазмалеммы, их компартментализация в вакуолях, ограничение функционирования хлоропластов и митохондрий, сдвиг фитогормонального баланса, усиленный синтез полиаминов, фитохелатинов, металлотионеинов и других стрессовых соединений белковой природы [6]. Одним из специфических проявлений цитотоксического влияния металлов являются изменения скорости пролиферации клеток и организации обеспечивающих ее клеточных структур, а также запрограммированная гибель и/или некроз клеток [7]. Поскольку большинство токсичных металлов влияют и на морфогенез растений, представляется целесообразным обобщить особенности их взаимодействия с компонентами цитоскелета (микротрубочками и микрофиламентами), проясняющие возможные клеточные механизмы их токсических эффектов.

© И.И. ГОРЮНОВА, Ю.А. КРАСИЛЕНКО, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2016

Микротрубочки, высокодинамичные составляющие цитоскелета растительной клетки, обеспечивают ряд важных клеточных процессов, таких как деление и рост, позиционирование органелл, поддержание постоянной формы и полярности клеток, микрокомпартментализацию и внутриклеточный транспорт [8]. Организация микротрубочки крайне чувствительна к действию разнообразных абиотических факторов [9]. Кроме того, различные образования микротрубочек восприимчивы к действию таких внутриклеточных сигналов, как фитогормоны [10], окиси азота [11] и др. Известно, что процессы полимеризации/деполимеризации микротрубочек нарушаются вследствие высокоспецифического взаимодействия с тубулином ряда веществ, обладающих антимитотической активностью (таксол, колхицин и др.) [12]. Установлено, что они являются мишенью для ряда токсичных металлов [13].

Микрофиламенты, или же актиновые филаменты, также участвуют в обеспечении отдельных этапов деления клетки, поддерживают ее постоянную форму и подвижность одновременно, процессы внутриклеточного транспорта и движение органелл [14]. Организация и динамика актинового цитоскелета определяется фитогормонами и другими типами внутриклеточных сигнальных молекул [10], а также такими абиотическими факторами, как патогены вирусной, бактериальной или грибковой природы [15, 16], осмотическим стрессом [17], низкими температурами [18], силой тяжести [19], УФ-В [20, 21]. Известен ряд химических веществ, специфически взаимодействующих с актином: фаллоидин [22, 23], цитохалазины B/D [15] и лантрункулины A/B [24, 25]. Накапливается все больше информации о непосредственном действии токсичных металлов на микрофиламенты растительной клетки [13].

Таким образом, регулярно появляющиеся новые сведения о влиянии ряда металлов на микротрубочки и микрофиламенты растительной клетки, а также полученные нами экспериментальные результаты, дополнительно проливающие свет на эту проблему, побудили авторов к написанию настоящего обзора.

Действие на цитоскелет металлов с выраженными токсическими свойствами. *Кадмий.* Кадмий (Cd), один из наиболее токсичных водорастворимых поллютантов из промышленных отходов и фосфатных удобрений, аккумулируется преимущественно в клетках зон активного роста корней, а именно меристемы и растяжения [26–29]. Обработка Cd^{2+} приводит к уменьшению количества боковых корней у *Thlaspi caerulescens* и *Nicotiana tabacum* [30]. В свою очередь $CdCl_2$ в концентрациях 5–40 мкМ ингибирует рост главных корней и появление корневых волосков у проростков *Arabidopsis thaliana* [31]. Нами проведено исследование влияния 5, 10 и 20 мкМ $CdSO_4$ на рост и морфологию главных корней *A. thaliana* (GFP-FABD2) с последующей демонстрацией причины нарушений роста и строения корней, которые связаны с изменением нативной организации микрофиламентов. На протяжении 24, 48 и 72 ч экспозиции с $CdSO_4$ нами отмечено дозозависимое ингибирующее влияние кадмия на рост главных корней, а также появление различных нарушений их морфологии. Так, обнаружено отмирание клеток зоны деления, переходной зоны и частично зоны элонгации, а также свеллинг клеток зоны элонгации. В зоне дифференциации увеличивалась длина и повышалось количество корневых волосков. Причиной возникновения таких изменений служило непосредственное влияние Cd на цитоскелет, в частности на микрофиламенты, а также на микротрубочки (рис. 1, см. вклейку). Установлено, что наиболее чувствительны к кадмию актиновые филаменты эпидермальных клеток зон деления, переходной зоны и зоны элонгации, а также меристематических клеток, что является одной из причин ингибирования роста и морфологии главных корней. Менее подверженными влиянию оказались глубинные слои клеток, а именно клетки кортекса переходной зоны и зоны элонгации, что объясняется разным градиентом концентрации этого металла при обработке корней [32]. Известно, что избыток Cd^{2+} накапливается в везикулах цитоплазмы эпидермальных клеток *Allium cepa* L., вызывая нарушения структуры эндоплазматического ретикулума [4].

Наравне с ингибированием роста при обработке семян *Pisum sativum* $Cd(CH_3COO)_2$ (0,125–1 мМ) происходит задержка и/или нарушение митоза (появление *к*-митозов, одинарных и двойных мостов, преждевременное расхождение хромосом), в том числе и вследствие деполимеризации веретена деления [33–35]. $CdCl_2$ (0,05–0,8 мМ) в меристематических клетках корней *Vicia faba* приводит к появлению мультиполярности, полиплоидии, хромосомных мостов и фрагментации веретен деления [29]. В клетках меристемы главных корней *Hordeum vulgare* под действием $CdCl_2$ в концентрациях 10–300 мкМ существенно возрастает процент митотических клеток, находящихся на стадии профазы, и одновременно снижается интенсивность клеточных делений по причине реориентации/деполимеризации микротрубочек веретена деления [34]. Схожие изменения в прохождении митоза проявляются под действием Cd и в меристематических клетках корней *P. sativum*. Это может свидетельствовать о том, что структурные белки цитоскелета являются основной мишенью влияния Cd на пролиферирующие клетки [27].

Для исследования влияния тяжелых металлов на микротрубочки были использованы корни линии *A. thaliana* экотипа Landsberg erecta (Ler), экспрессирующей химерный ген *gfp-map4*, который позволяет визуализировать микротрубочки и изучать особенности их организации в разных типах клеток

in vivo. Так, в эпидермальных клетках зоны деления (рис. 1, *а*) и переходной зоны (дистальной зоны растяжения) корней (рис. 2, *и*, см. вклейку) кортикальные микротрубочки представлены близко прилежащими друг к другу параллельными рядами с поперечной ориентацией непосредственно под цитоплазматической мембраной.

На стадии интерфазы в клетках меристемы различимы эндоплазматические микротрубочки, радиально отходящие от ядра (рис. 1, *е*). В эпидермальных клетках (рис. 1, *л*) и клетках кортекса зоны растяжения кортикальные микротрубочки ориентированы поперечно и косо относительно основной оси корня. В клетках зоны дифференциации микротрубочки приобретают косую, а в более отдаленных от корневого апекса клетках – продольную ориентацию. В атрихобластах кортикальные микротрубочки имеют косую ориентацию. В развивающихся трихобластах кортикальные микротрубочки ориентированы неупорядоченно, тогда как в зрелых корневых волосках – продольно. Микротрубочки в эпидермальных (рис. 1, *б*) и меристематических клетках (рис. 1, *ж*) зоны деления после обработки 1 мкМ $CdSO_4$ остаются интактными, тогда как в эпидермальных клетках переходной зоны, а также эпидермальных клетках (рис. 1, *м*) и клетках кортекса зоны элонгации формируются микротрубочки с частично продольной или неупорядоченной сетью. Нативная организация микротрубочек незначительно изменяется в атрихобластах, трихобластах и корневых волосках.

Более существенные изменения зафиксированы при обработке корней 5 мкМ $CdSO_4$. Так, наблюдали выраженную неупорядоченность микротрубочек в эпидермальных клетках зоны деления (рис. 1, *в*) и меристематических клетках (рис. 1, *з*). В то же время в эпидермальных клетках переходной зоны и зоны элонгации, помимо дезорганизации микротрубочек, происходила их частичная (переходная зона) и/или полная (зона элонгации) деполимеризация (рис. 1, *н*). Клетки кортекса зоны элонгации, а также трихобласты, атрихобласты и корневые волоски оказались менее восприимчивы к упомянутой концентрации, ориентация их микротрубочек практически не была изменена. Наиболее выраженными эффектами обладали концентрации 10 и 20 мкМ $CdSO_4$. В эпидермальных клетках зон деления (рис. 1, *г*, *д*), переходной зоны и элонгации (рис. 1, *о*, *п*), а также в меристематических клетках (рис. 1 *и*, *к*) происходило сильное разрушение микротрубочек, а в клетках кортекса зоны растяжения – формирование сети хаотически расположенных укороченных микротрубочек. В трихобластах и атрихобластах ориентация изменялась с косой на поперечную, часть микротрубочек была полностью деполимеризована. Аналогичные эффекты обнаружены и в корневых волосках.

Одной из причин возникновения описанных нарушений является, вероятно, связывание ионов Cd^{2+} с сульфгидрильными группами β-тубулина, нарушающее его способность формировать митотические структуры [29, 36]. Появление хромосомных аберраций в клетках *Allium sativum* под воздействием различных концентраций $CdCl_2$ может быть объяснено конкурентным взаимодействием Cd^{2+} и Ca^{2+}, связанных кальмодулином (CaM) в составе митотического веретена, что приводит к различным нарушениям расхождения хромосом [34], в том числе и вследствие деполимеризации микрофиламентов [31]. Cd^{2+} способен замещать Ca^{2+} в кристаллической структуре гельзолина, Ca^{2+}-зависимого актин-деполимеризирующего белка, после чего происходит его активация с последующей деполимеризацией актиновых филаментов [31]. В культуре одноклеточных водорослей *Spirogyra decimina* $CdCl_2$ в концентрациях 10–100 мкМ вызывает ингибирование пролиферации клеток, сопровождаемое различными нарушениями митоза и необратимой дезорганизацией кортикальных микротрубочек в интерфазных клетках, в то время как актиновые филаменты более устойчивы к действию $CdCl_2$, поскольку обратимо реориентируются и фрагментируются при повышении его концентрации до 40 мкМ [13].

Подобные эффекты отмечены в клетках меристемы *Allium cepa* под действием 50 мкМ $CdCl_2$, что может быть объяснено инициацией ионами Cd^{2+} реорганизации микротрубочек на незаякоренных плюс-концах [37]. Обработка проростков *A. sativum* $CdCl_2$ (5–10 мкМ) нарушает процессы организации кортикальных микротрубочек интерфазных клеток меристемы корней, а именно их обратимую сборку, что проявляется в дозозависимой рандомизации или же частичной деполимеризации. В то же время в митотических клетках нарушается процесс формирования препрофазных лент и деградируют уже сформированные, замедляется образование митотического веретена в профазе перинуклеарными микротрубочками, а также происходит частичное разрушение веретен деления, реориентация кинетохора и отклонение его от экваториальной плоскости клетки [38]. Реорганизацию и деполимеризацию микротрубочек интерфазных и митотических растительных клеток под действием разных концентраций Cd^{2+} отмечают и другие авторы [13, 27, 37].

Продемонстрировано, что кадмий влияет на процессы полимеризации тубулина [27, 38]. Так, $CdCl_2$ (0,01–1 мМ) препятствует сборке микротрубочек на 30–40 %, возможно, вследствие присоединения к двум из восьми SH-группам тубулина, что нарушает нормальный процесс его полимеризации [5, 39].

Известно, что сборка мономеров цитоплазматической популяции актина нуждается в присутствии ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} и определяется актин-связывающими белками – α-актинином, гельзолином

и виллином, которые регулируются кальмодулином [40], однако сайты их связывания могут вовлекаться также во взаимодействие с другими двухвалентными катионами, в том числе и тяжелыми металлами. Поскольку Cd^{2+} и Ca^{2+} обладают подобными ионными радиусами (0,099 и 0,097 нм соответственно), незамедлительно после попадания Cd^{2+} в цитоплазму происходит его связывание с определенными сайтами в апопласте корней, что определяет концентрацию свободного цитоплазматического Ca^{2+} и активность кальмодулинов, ассоциированных с полимеризацией микротрубочек [41]. Показано, что Cd^{2+} способен замещать ионы Ca^{2+} при переходе цитоплазмы гепатоцитов из золя в гель и влиять на организацию таких актин-связывающих белков, как кальдесмон, кальмодулин-зависимым путем [40, 42, 43].

Таким образом, микротрубочки служат одной из основных мишеней Cd^{2+}, что является важным условием реализации токсичности этого металла на клеточном уровне.

Свинец. Свинец (Pb) относится к основным поллютантам окружающей среды [44], поскольку его соли проявляют ярко выраженные фитотоксические эффекты [2]. В частности, под действием Pb^{2+} наблюдается существенное снижение пролиферативной активности клеток главных корней растений [45]. Обработка растений *V. faba, P. sativum* и *P. vulgaris* L. 1 мМ $Pb(NO_3)_2$ приводит к замедлению роста главных и уменьшению количества боковых корней [45].

Ингибирование пролиферации клеток меристемы корней *Zea mays* и, соответственно, синтеза ДНК проявляется при концентрациях Pb^{2+} 1 мМ, что происходит вследствие уменьшения количества полимеризованного тубулина и неполного формирования веретен деления [45, 46]. Подобный эффект описан для клеток корневой меристемы *A. cepa*, в которых после обработки тканей корня $Pb(NO_3)_2$ на 55 % возрастает продолжительность клеточного цикла в основном за счет увеличения времени прохождения синтетического и постсинтетического периодов [47]. В митотических клетках Pb^{2+} влияет на полимеризацию микротрубочек и актиновых филаментов при формировании веретен деления, что проявляется в неправильном размещении кинетохоров и выстраивании хромосом по центру клетки, их неподвижности и появлении анафазных мостов [48]. В клетках корней *Z. mays* отмечается образование *к*-митозов, хромосомных мостов и других нарушений митоза [46].

Способность Pb^{2+} вызывать широкий спектр хромосомных аберраций также можно объяснить его влиянием на белки веретена деления, в частности тубулин и/или кинезин [49, 50]. Кортикальные микротрубочки в интерфазных клетках корней *A. sativum* под воздействием $Pb(NO_3)_2$ рандомизируются или же частично деполимеризуются [48]. В основе избирательного воздействия Pb^{2+} на динамику микротрубочек лежит его прямое взаимодействие с тиоловыми группами тубулина, что приводит к потере способности микротрубочки к полимеризации или деполимеризации уже сформированных микротрубочек *in vitro* [51, 52]. Помимо специфических сайтов связывания Pb^{2+} с микротрубочками существуют общие для большинства тяжелых металлов сайты, в частности сульфгидрильные группы [52]. Свободные димеры тубулина более чувствительны к действию Pb^{2+}, чем полимеризованный тубулин, что объясняет выраженное влияние Pb^{2+} на процессы сборки и динамику микротрубочек, а не на их ориентацию и организацию [50].

Ртуть. Ртуть (Hg) в силу своих физико-химических свойств является одним из наиболее опасных загрязнителей окружающей среды с высокой цито- и генотоксичностью [53, 54]. Так, на клеточном уровне Hg^{2+} влияет на пролиферацию клеток, ингибируя синтез РНК и белков, а также непосредственно взаимодействуя с ДНК и белками цитоскелета в составе веретен деления [53, 54]. Поэтому очевидным является влияние соединений Hg^{2+} на морфогенез растений. В частности, $HgCl_2$ в концентрации 2,5 мкМ ингибирует рост главных корней и уменьшает количество боковых корней *Vigna unguiculata* [55].

Вероятнее всего ингибирование полимеризации микротрубочек может быть объяснено способностью Hg^{2+} блокировать свободные сульфгидрильные группы тубулина [56]. Так, при наличии в молекуле тубулина 15 свободных сульфгидрильных групп на растущем и заякоренном концах, а также по всей длине молекулы, CH_3Hg^+ занимает все доступные сайты связывания, хотя ингибирование сборки микротрубочек начинается уже при связывании двух из 15 сульфгидрильных групп [57, 58]. При этом мишенью для Hg^+ является только тубулин, поскольку белки, ассоциированные с микротрубочками, остаются незатронутыми [58].

Очевидно, возможным клеточным механизмом изменений динамики и организации основных компонентов цитоскелета эукариот является непосредственное связывание Hg^{2+} с белками, его образующими. Однако до сих пор детальные исследования по изучению действия Hg^{2+} на цитоскелет растительной клетки не были проведены.

Вольфрам. Исследования роли вольфрама (W) в клетках эукариот немногочисленны, хотя известно, что этот металл является частым загрязнителем окружающей среды и проявляет ряд цитотоксических эффектов, воздействуя в том числе и на цитоскелет [59]. Так, в эпидермальных клетках зоны растяжения главных корней *A. thaliana*, обработанных Na_2WO_4 в концентрации 1 мкМ, установлены нарушения структуры кортикальных микротрубочек и веретена деления, а также обнаружена деполимеризация микрофиламентов, конденсация хроматина и

фрагментация ДНК [60, 61]. Аналогичные, однако менее выраженные эффекты наблюдаются в *A. cepa*, *Pinus brutia*, *Adiantum capillus-veneris, Physcomitrella patens, Tortula muralis,* в то время как в клетках *Z. mays* L. кортикальные микротрубочки не изменяют свою ориентацию [61].

Никель. Никель (Ni) – жизненно важный элемент для клеток эукариот, вместе с тем относящийся к общепризнанным поллютантам окружающей среды. Фитотоксические свойства, проявляющиеся при превышении физиологических норм внутриклеточного содержания никеля, заключаются в его высокой мутагенности [62]. Нами впервые продемонстрировано влияние различных концентраций никеля (5, 10, 20 мкМ) на микрофиламенты клеток корней *Arabidopsis thaliana* (GFP-FABD2). Так, наиболее чувствительными оказались микрофиламенты эпидермальных клеток зоны деления, меристематических клеток и клеток переходной зоны, а также зоны элонгации, и в меньшей мере – глубинные слои корня, а именно клетки кортекса, а также архибласты и трихобласты зоны дифференциации. Кроме того, обнаружено ингибирование пролиферации меристематических клеток, их отмирание, а также свеллинг эпидермальных клеток корневого апекса и зоны деления. Причиной подобных изменений являлось влияние никеля на микрофиламенты [63]. В клетках меристемы главных корней *A. cepa* после обработки 100 мкМ $NiSO_4$ наблюдалось ингибирование пролиферации клеток вследствие деполимеризации веретен деления, стабилизации кортикальных микротрубочек, а также нарушался рост главных и боковых корней [37].

При исследовании влияния Ni на микротрубочки клеток корней четырехдневных проростков *A. thaliana* (GFP-MAP4) (рис. 2) установлено, что обработка 5 и 10 мкМ $NiSO_4$ приводит к нарушению ориентации микротрубочек в эпидермальных клетках зоны деления (рис. 2, *б*, *в*) и частичной их деполимеризации, и эти эффекты значительно усиливаются при повышении концентрации никеля до 20 мкМ (рис. 2, *г*).

В клетках меристемы обработка 5 мкМ не приводила к видимым изменениям в организации микротрубочек (рис. 2, *е*), тогда как Ni^{2+} в концентрации 10 и 20 мкМ вызывал нарушение нативной организации микротрубочек (рис. 2, *ж*, *з*), что, как мы полагаем, явилось одной из причин дозо- и времязависимого ингибирования роста главных корней [63]. В эпидермальных клетках, начиная с 5 мкМ обработки переходной зоны (рис. 2, *к*) и зоны элонгации (рис. 2, *о*), наблюдалась рандомизация микротрубочек, которая усиливалась при увеличении концентрации до 10 (рис. 2, *л*, *п*) и 20 мкМ (рис. 2, *м*, *р*), при этом разрушение микротрубочек не выявлено. Ориентация микротрубочек в клетках кортекса зоны растяжения после обработки всеми исследуемыми концентрациями была в большинстве случаев, подобно контролю, поперечной и косой, в то время как в трихобластах, атрихобластах и корневых волосках микротрубочки были в незначительной мере реориентированы.

Влияние Ni на компоненты цитоскелета проявлялось также в нарушении ацетилирования α-тубулина, которое является маркером стабильности микротрубочек [64]. Стабилизация микротрубочек обусловлена способностью Ni^{2+} замещать в молекуле ГТФ кофакторный ион Mg^{2+} из-за близких значений их радиусов (0.69 и 0.66 Å соответственно) и невозможности гидролиза комплекса Ni – тубулин – ГТФ, а также возможным взаимодействием Ni^{2+} с белками, ассоциированными с микротрубочками [65].

Ванадий. При культивировании *Allium cepa* L. в присутствии V_2O_5 ванадий (V) накапливается в корневой системе, в особенности в клетках меристемы, что приводит к уменьшению числа нормальных митозов, неподвижности хромосом, хромосомным мостам и *к*-митозам [66]. Возможно, причиной этих эффектов также являются нарушения со стороны цитоскелетных структур. О деструктивном влиянии ванадия на пролиферацию эукариотических клеток может свидетельствовать тот факт, что его соли используются в качестве противоопухолевых препаратов [67]. Описаны ингибирование сборки микротрубочек и активная деполимеризация тубулина *in vitro* под влиянием 0,001–0,01 мкМ V_2O_5 [68]. Ванадий взаимодействует как с G-актином, окисляя остатки цистеина, так и F-актином, связываясь *in vitro* с АТФ-сайтами [69]. Более детально влияние ванадия на цитоскелет растительной клетки до сих пор не изучено.

Хром. Хром (Cr), несомненно выполняя ряд важных функций в клетках эукариот, вместе с этим проявляет в клетках растений цито- и фитотоксическое действие [70]. Установлено, что $K_2Cr_2O_7$ в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ вызывает выраженное дозозависимое ингибирование прорастания семян *A. cepa*, сопровождаемое рандомизацией и деполимеризацией кортикальных микротрубочек в меристематических клетках их корней, находящихся на стадии профазы [70]. Отмечено также нарушение организации кинетохоров и полярных микротрубочек в клетках, образование двух- и мультиядерных клеток с фрагментированными ядрами, нарушение организации веретен деления и фрагмопластов [70]. Кроме того, в культуре клеток *Euglena gracilis* после обработки 1,5–9 г/мл $K_2Cr_2O_7$ наблюдается ингибирование их пролиферации, снижение подвижности, появление гигантских мультиядерных клеток (~5–10 % популяции), что можно объяснить прямым или опосредованным воздействием хрома на компоненты цитоскелета [71]. В клетках корня *Amaranthus viridis* $K_2Cr_2O_7$ в диапазоне концентраций 10^{-6}–10^{-3} М вызывает колхицино-

подобные эффекты, в частности, появление анафазных мостов и замедление пролиферации клеток [72].

Влияние хрома на структуру микрофиламентов в растительной клетке еще не изучалось. Подобные изменения, вызванные Cr^{3+}, объясняются по аналогии с другими ионами тяжелых металлов. Известно, что Cr^{3+} способен присоединяться *in vitro* к свободным сульфгидрильным группам молекул тубулина, необходимых для сборки микротрубочек. Однако на основании того, что количество свободных SH-групп не уменьшается значительно, можно предположить существование альтернативных сайтов связывания Cr^{3+} и тубулина [56]. Цитотоксичность хрома проявляется в реориентации, деполимеризации или стабилизации кортикальных микротрубочек в клетках *Vicia faba, Pisum sativum, Vigna sinensis, Vigna angularis* и *Medicago sativa*. При этом низкий уровень ацетилирования α-тубулина сопровождался деполимеризацией микротрубочек, а высокий уровень – стабилизацией микротрубочек. Стабилизированные микротрубочки, по мнению авторов, теряли свои динамические свойства [73].

Кобальт. Кобальт (Co) также является необходимым элементом для функционирования эукариотических клеток. Одним из биохимических механизмов ингибирования полимеризации микротрубочек *in vitro* ионами Co с переменной валентностью является характерная для тяжелых металлов способность связывать свободные SH-группы, количество которых при действии $CoCl_2$ в диапазоне концентраций 10^{-3}–10^{-6} М сокращается на 60–73 % [56]. Несмотря на то что распространенным эффектом Co *in vitro* является деполимеризация микротрубочек, при определенном соотношении Co/тубулин (например, 0,5 мМ $CoCl_2$/0,2 мМ) этот элемент действует *vice versa*, стимулируя формирование протофиламентов [56]. Известно также, что некоторые двухвалентные катионы металлов, в том числе и Co^{2+}, могут присоединяться к ГТФ вместо Mg^{2+}, стимулируя сборку тубулина и образование протофиламентов, неотличимых от сформированных в присутствии Mg^{2+} [74]. Физико-химические свойства Co позволяют использовать его в нанотехнологии, в частности, для выравнивания микротрубочек *in vitro* посредством присоединения наночастиц феррита кобальта ($CoFe_2O_4$), обладающих сродством к кинезину [75].

Реакции цитоскелета на металлы, не обладающие выраженными токсическими свойствами. *Цинк.* Цинк (Zn) в клетках растений регулирует баланс фитогормонов, в частности ауксинов, а также активность триптофан-синтетазы [44]. Помимо этого, Zn^{2+} входит в состав более чем 300 белков и является кофактором ряда ключевых ферментов, например, карбоангидразы, гексокиназы, энолазы, альдолазы и пр., а в клетках животных – молочнокислой и глутаминовой дегидрогеназ, щелочной фосфатазы, углеродистой ангидразы, карбоксипептидазы, дисмутазы, ДНК и РНК-полимераз [76]. В составе негистоновых белков из 20 аминокислотных остатков, образующих петлю, Zn^{2+} формирует «цинковые пальцы», которые придают белкам форму, комплементарную поверхности молекулы ДНК. Цинк-пальцевая нуклеаза относится к классу инженерных ДНК-связывающих белков, которые облегчают целевое редактирование генома путем создания двунитевых разрывов ДНК [77].

Фитотоксические эффекты Zn^{2+} известны довольно широко. Например, при обработке $ZnCl_2$ (5–25 мМ) в клетках *Oryza sativa* происходит замедление роста главных корней и частичный некроз его клеток [78]. В митотических клетках меристемы *Allium cepa* L. при добавлении дитиокарбоната цинка в концентрации 1–10 мкг/мл, используемого для проращивания семян этого растения, наблюдаются *к*-митозы, формирование хромосомных мостов, нарушения прохождения анафазы, деполимеризация веретена деления и фрагмопласта [79].

Установлено, что Zn (500 мкМ) в клетках животных стимулирует сборку микротрубочек и способствует формированию двумерных кристаллических «тубулиновых листов» на стадии образования протофиламентов [80]. Поскольку концентрация Zn для прохождения указанных процессов невысока, можно предположить физиологическую необходимость этого элемента для их образования [80]. Действительно, Zn^{2+} в составе $^{65}ZnCl_2$ наравне с Mg^{2+} и Mn^{2+} стимулирует полимеризацию димеров тубулина в протофиламенты в присутствии ГТФ; всего описано около 60 потенциальных сайтов для связывания тубулина с Zn^{2+} [81, 82]. В конечном счете добавление Zn^{2+} вызывает стабилизацию микротрубочек в результате образования связующих мостов между субъединицами димеров тубулина [83]. В наших же исследованиях обработка 5 мкМ $ZnSO_4$ не вызвала существенных изменений в организации микротрубочек эпидермальных (рис. 3, *б*, см. вклейку) и меристематических клеток зоны деления. При обработке 10 и 20 мкМ Zn наблюдалась реориентация микротрубочек эпидермальных клеток (рис. 3, *в*, *г*), в то время как они оставались интактными в меристематических клетках.

Более подверженными влиянию Zn оказались клетки переходной зоны и зоны элонгации. В то время как обработка 5 мкМ эпидермальных клеток переходной зоны не вызывала видимых изменений (рис. 3, *е*), при концентрации 10 и 20 мкМ наблюдалась неупорядоченность ориентации микротрубочек (рис. 3, *ж*, *з*), а также их незначительное разрушение. В эпидермальных клетках и клетках кортекса зоны растяжения обработка 5 мкМ приводила к изменению ориентации микротрубочек с поперечной на частично косую (рис. 3, *к*), при этом под влиянием 10–20 мкМ в эпидермальных клетках формировалась преимущественно неупорядоченная сеть

микротрубочек с их частичной деполимеризацией (рис. 3, *л*, *м*), в то время как в клетках кортекса ориентация микротрубочек не изменялась и была сходна с контролем. Организация микротрубочек в трихобластах, атрихобластах и корневых волосках после 5 и 10 мкМ обработки также оставалась неизменной (рис. 3, *о*, *п*), только после действия 20 мкМ наблюдалось незначительное нарушение нативной организации микротрубочек (рис. 3, *р*).

Медь. Медь (Cu) в клетках растений входит в состав компонентов электрон-транспортной цепи митохондрий и хлоропластов, многих ферментов, в частности, хлоропластной, митохондриальной и пероксисомальной полифенолоксидаз, тирозиназы, аскорбатоксидазы и пр. [44, 84]. Cu также принимает участие в окислении полифенолов в процессе синтеза фитоглобина и регуляции активности ферментов, обеспечивающих биологическую фиксацию азота [44]. В свою очередь в клетках животных Cu обнаруживается в составе оксидазы, каталазы, пероксидазы, лактазы, тирозиназы и ряда других ферментов, влияет на образование меланина, переносит кислород в реакциях сшивания коллагена, а также играет определенную роль в метаболизме фенольных соединений [44]. В то же время при превышении физиологических концентраций $CuSO_4$ (0,6–1,6 мкМ) в клетках растений проявляет себя как ингибитор пролиферации клеток корней *Vigna unguiculata* [55] и *Allium sativum* [85]. Кортикальные микротрубочки после обработки меди неупорядоченно ориентируются и/или же стабилизируются; происходит фрагментация веретена деления, а с увеличением времени обработки – полная деполимеризация микротрубочек [85]. В клетках главных корней *Brassica napus*, обработанных 25 и 50 мкМ $CuSO_4$ *in vitro*, наблюдается уменьшение количества полимеризованного актина (F-актина) с одновременным увеличением количества свободного глобулярного актина (G-актина), однако в отдельных случаях не происходит деполимеризация микрофиламентов, что указывает на возможную сборку актина *de novo* [86]. Недавно нами продемонстрировано влияние 5–20 мкМ $CuSO_4$ на актиновые филаменты разных типов клеток корней *A. thaliana in vivo*. Наиболее чувствительными зонами к действию Cu оказались меристематические, эпидермальные клетки зоны деления и переходной зоны, о чем свидетельствует их частичное отмирание и свеллинг эпидермальных клеток зоны элонгации, а также увеличение длины и количества корневых волосков. Актиновые филаменты также чувствительны к Cu. К примеру, самое сильное влияние Cu на микрофиламенты наблюдалось в эпидермальных клетках разных зон (далее по возрастанию силы воздействия): зона роста < зона растяжения < переходная зона < зона дифференциации [87].

Кроме того, установлено, что медь наиболее сильно из всех исследуемых нами металлов разрушала микротрубочки клеток корней *A. thaliana*. Так, уже начиная с обработки 5 мкМ, происходила интенсивная деполимеризация микротрубочек во всех исследуемых типах клеток, которая усиливалась при увеличении концентрации до 10 и 20 мкМ (рис. 4, *б*, *в*, *г*, *е*, *ж*, *з*, *к*, *л*, *м*, *о*, *п*, *р*, см. вклейку).

Ранее показано, что Cu вызывает активную деполимеризацию микротрубочек *in vitro* и ингибирование сборки тубулина, очищенного от белков, которые ассоциированы с микротрубочками [87]. Вероятным объяснением этого является возможность Cu присоединяться к двум из восьми свободных SH-групп и формировать устойчивые комплексы с тубулином, в возникновение которых могут вовлекаться атомы S, амины или карбоксильные группы [5, 56].

В заключение можно сказать, что одним из механизмов токсического действия тяжелых металлов на растительные организмы является ингибирование роста и развития их клеток вследствие нарушения цитоскелета. Микротрубочки, как и микрофиламенты, могут являться мишенями их действия, что приводит к нарушению организации и динамики цитоскелетных структур в клетках. Установлено, что микротрубочки наиболее чувствительны к действию кадмия, ртути, хрома и меди, тогда как актиновые филаменты проявляют сходную чувствительность лишь к действию кадмия, меди, никеля. Одним из возможных механизмов действия этих металлов может быть присоединение их ионов к свободным сульфгидрильным группам, как это показано для тубулина. К опосредованным механизмам действия следует отнести свойство двухвалентных катионов тяжелых металлов конкурировать с Mg^{2+}, влияя таким образом на ГТФ-зависимую сборку микротрубочек. Помимо этого, существует ряд других специфичных сайтов присоединения тяжелых металлов к белкам цитоскелета. Для получения более точных данных относительно действия тяжелых металлов на микротрубочки и актиновые филаменты растительных клеток необходимо проводить дальнейшие исследования с использованием биохимических, молекулярно-биологических и биоинформационных методов.

INVOLVEMENT OF PLANT CYTOSKELETON INTO CELLULAR MECHANISMS OF METALS TOXICITY

I.I. Horiunova, Yu.A. Krasylenko, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Institute Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Kyiv
E-mail: inna.horiunova.ukr@gmail.com

This review summarizes published date and the results of the author's own researches cantering the participation of plant cells cytoskeleton. It is considered cytotoxic impact of metals on the cytoskeleton's components, including microtubules and actin filaments. Particular attention is

paid to the cellular and molecular mechanisms of influence of metals on cytoskeleton. We discussed the most probable binding sites of heavy metals and alternative mechanisms of their impact on the cytoskeleton

УЧАСТЬ ЦИТОСКЕЛЕТУ РОСЛИН В РЕАЛИЗАЦІЇ КЛІТИННИХ МЕХАНІЗМІВ ТОКСИЧНОСТІ МЕТАЛІВ

І.І. Горюнова, Ю.А. Красиленко, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм

В огляді узагальнено літературні дані і результати власних досліджень авторів, котрі стосуються участі цитоскелету рослинних клітин в реалізації клітинних механізмів токсичності металів Розглянуто особливості цитотоксичного впливу металів на різні складові цитоскелету, зокрема, на мікротрубочки та актинові філаменти. Особливу увагу приділено клітинним і молекулярним механізмам впливу металів на цитоскелет. Обговорюються найбільш ймовірні сайти зв`язування з важкими металами, а також альтернативні механізми їхнього впливу на цитоскелет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duffus, J.H., «Heavy metals» – a meaningless term?, *Pure Appl. Chem.*, 2002, vol. 74, no. 5, pp. 793–807.
2. *Jadia, C.D., and Fulekar, M.H.,* Phytoremediation of heavy metals: recent techniques, *Afr. J. Biotechnol.*, 2009, vol. 8, no. 6, pp. 921–928.
3. Ghosh, M., and Singh, S.P., A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproduct, *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 2005, vol. 3, no. 1, pp. 1–18.
4. Wierzbicka, M., Przedpelska, E., Ruzik, R., Ouerdane, L., Povec-Pawlak, K., Jarosz, M., Szpunar, J., and Szakiel, A. Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells, *Protoplasma*, 2007, vol. 231, pp. 99–111.
5. Liliom, K., Wagner, G., Pacz, A., Cascante, M., Kovacs, J., and Ovadi, J. Organization-dependent effects of toxic bivalent ions. Microtubule assembly and glycolysis, *Eur. J. Biochem.*, 2000, vol. 267, pp. 473–479.
6. Meharg, A.A., and Macnair, M.R. An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*, *New Phytol.*, 1990, vol. 116, pp. 29–35.
7. Krzeslowska, M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy, *Acta Physiol. Plant.*, 2011, vol. 33, pp. 35–51.
8. Ehrhardt, D.W., and Shaw, S.L. Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006, vol. 57, pp. 859–875.
9. Nick P. Microtubules as sensors for abiotic stimuli, *Plant Microtubules. Development and Flexibility*, Nick P., ed., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008, pp. 175–206.
10. Blume, Ya.B., Krasylenko, Yu.A., and Yemets, A.I. Effects of phytohormones on the cytoskeleton of the plant cell // Rus. J. Plant Physiol., 2012, vol. 59, no. 4, pp. 515–529.
11. Yemets, A.I., Krasylenko, Y.A., Lytvyn, D.I., Sheremet, Ya.A., and Blume, Ya.B. Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants, *Plant Sci.*, 2011, vol. 181, pp. 545–554.
12. Nagle, A., Hur. W., and Gray, N.S. Antimitotic agents of natural origin, *Curr. Drug Targets*, 2006, vol. 7, pp. 305–326.
13. Pribyl, P., Cepák, V., and Zachleder, V. Cytoskeletal alterations in interphase cells of the green alga *Spirogyra decimina* in response to heavy metals exposure: I. The effect of cadmium, *Protoplasma*, 2005, vol. 226, pp. 231–240.
14. Heng, Y.W., and Koh, Ch.-G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2010, vol. 42, pp. 1622–1633.
15. Schmidt, S.M., and Panstruga, R. Cytoskeleton functions in plant-microbe interactions, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2007, vol. 71, pp. 135–148.
16. Song, X., Ma, Q., Hao, X., and Li, H. Roles of the actin cytoskeleton and an actin-binding protein in wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Protoplasma*, 2012, vol. 249, pp. 99–106.
17. Komis, G., Apostolakos, P., and Galatis, B. Hyperosmotic stress-induct actin filaments reorganization in leaf cells of *Chlorophiton comosoum*, *J. Exp. Bot.*, 2002, vol. 53, no. 375, pp. 1699–1710.
18. Shibasaki, K., Uemura, M., Tsurumi, S., and Rahman, A. Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: underlying molecular mechanisms, *Plant Cell*, 2009, vol. 21, pp. 3823–3838.
19. Yamamoto, K., and Kiss, J.Z. Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 2002, vol. 128, pp. 669–681.
20. Veseleska, R., and Janisch, R. The effect of UV irradiation on changes in cytoskeleton and viability of mouse fibroblasts L929 cell line, *Scripta medica (BRNO)*, 2000, vol. 73, no. 6, pp. 393–408.
21. Grzanka, D., Domaniewski, J., Grzanka, A., and Zuryn, A., Ultraviolet radiation (UV) induces reorganization of actin cytoskeleton in CHOAA8 cells, *Neoplasma*, 2006, vol. 53, pp. 328–332.
22. Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin, *J. Cell Biol.*, 1987, vol. 105, pp. 1473–1478.
23. Dudás, R., Kupi, T., Vig, A., Orbán, J., and Lrinczy, D. Effect of phalloidin on the skeletal muscle ADF-actin filaments, *J. Trans. Am. Stud.*, 2009, vol. 95, pp. 709–712.
24. Omata, W., Shibata, H., Li, L., Takata, K., and Kojima, I. Actin filaments play a critical role in insulin-induced exocytotic recruitment but not in endocyto-

sis of GLUT4 in isolated rat adipocytes, *Biochem. J.*, 2000, vol. 346, pp. 321–328.
25. Chen, T., Teng, N., Wu, X., Wang, Y., Tang, W., Samaj, J., Baluska, F., and Lin, J. Disruption of actin filaments by latrunculin B affects cell wall construction in Picea meyeri pollen tube by disturbing vesicle trafficking, *Plant Cell Physiol.*, 2007, vol. 48, no. 1, pp. 19–30.
26. Liu, D., Jiang, W., and Gao, X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic, *Biol. Plant*, 2003/4, vol. 47, pp. 79–83.
27. Fusconi, A., Gallo, C., and Camusso, W. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L. Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution, *Mutat. Res.*, 2007, vol. 632, pp. 9–19.
28. Dong, J., Mao, W.H., Zhang, G.P., Wu, F.B., and Cai1, Y. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity – a review, *Plant Soil Environ.*, 2007, vol. 53, no. 5, pp. 193–200.
29. Parween, T., Jan, S., Sharma, M.P.M., Mujib, A., and Fatma, T. Genotoxic impact of cadmium on root meristem of *Vicia faba* L., *Russ. Agricult. Sci*, 2011, vol. 37, pp. 115–119.
30. Boominathan, P., and Doran, P. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*, *Biotech. Bioeng.*, 2003, vol. 83, no. 2, pp. 158–167.
31. Fan, J.-L., Wei, X.-G., Wan, L.-C., Zhang, L.-Y., Zhao, X.-Q., Liu, W.-Z., Hao, H.-Q., and Zhang, H.-Y., Disarrangement of actin filaments and Ca^{2+} gradient by $CdCl_2$ alters cell wall construction in *Arabidopsis thaliana* root hairs by inhibiting vesicular trafficking, *J. Plant Physiol.*, 2011, vol. 168, pp. 1157–1167.
32. Horiunova, I.I., Krasylenko, Yu.A., Zaslavsky, V.A., and Yemets, A.I. Cadmium effect's on the organization of actin filaments in *Arabidopsis thaliana* roots cells, *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, 2014, vol. 9, pp. 127–133.
33. Liu, D.H., Jiang, W.S., and Li, M.X. Effects of Cd^{2+} on root growth and cell division of *Allium cepa* L., *Acta Sci. Circumstantiae*, 1992, vol. 12, no. 4, pp. 439–446.
34. Liu, D., Jiang, W., and Gao, X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic, *Biol. Plant*, 2003/4, vol. 47, pp. 79–83.
35. Siddiqui, S., Meghvansi, M.K., Wani, M.A., and Jabee, F. Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L., *Acta Physiol. Plant*, 2009, vol. 31, pp. 531–536.
36. Bandyopadhyay, D., Chatterjee, A.K., and Datta, A.G. Effect of cadmium on purified hepatic flavokinase: involvement of reactive -SH group(s) in the inactivation of flavokinase by cadmium, *Life Sci.*, 1997, vol. 60, pp. 1891–1903.
37. Dovgalyuk, A., Kalynyak, T., and Blume, Ya.B. Heavy metals have a different action from aluminium in disrupting microtubules in *Allium cepa* L. meristematic cells, *Cell Biol. Int.*, 2003, vol. 27, pp.193–195.
38. Xu, P., Liu, D., and Jiang, W. Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*, *Biol. Plant*, 2009, vol. 53, no. 2, pp. 387–390.
39. Wallin, M., and Hartley-Asp, B. Effects of potential aneuploidy inducing agents on microtubule assembly in vitro, *Mutat. Res.*, 1993, vol. 287, pp. 17–22.
40. Dìaz-Barriga, F., Carrizalaens, L., and Yanez, L. Interaction of cadmium with actin microfilaments in vitro, *Toxicol. In Vitro*, 1989, vol. 3, no. 4, pp. 277–284.
41. Buljan, V., Yeung, S., Rushdi, S., Delikatny, E.J., and Hambly, B. Mercury and cadmium effects on microtubule polymerisation and depolymerisation, *Biophys. J.*, 2001, vol. 80, p. 99.
42. Perrino, B.A., and Chou, I.-N. Role of calmodulin in cadmium-induced microtubule disassembly, *Cell Biol. Int. Rep.*, 1986, vol. 10, no. 7, pp. 565–573.
43. Cheung, W.Y. Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity, *Fed. Proc.*, 1984, vol. 43, no. 15, pp. 2995–2999.
44. Soetan, K.O., Olaiya, C.O., and Oyewol, O.E., The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: a review, *Afr. Food Sci.*, 2010, vol. 4, no. 5, pp. 200–222.
45. Piechalaka, A., Tomaszewskaa, B., Baralkiewiczb, D., and Maleckaa, A. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes, *Phytochemistry*, 2002, vol. 60, pp. 153–162.
46. Jiang, W., and Liu, D. Effects of Pb^{21} on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2000, vol. 65, pp. 786–793.
47. Wierzbicka, M. The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L., *Protoplasma*, 1999, vol. 207, pp. 186–194.
48. Liu, D.H., Xue, P., Meng, Q., Zhe, J., Gu, J., and Jiang, W. Pb/Cu effects on the organization of microtubule cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum* L., *Plant. Cell. Rep.*, 2009, vol. 28, pp. 695–702
49. Their, R., Bonacker, D., Stoiber, T., Böhm, K.J., Wang, M., Unger, E., Bolt, H.M., and Degen, G. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems, *Toxicol. Lett.*, 2003, vol. 140–141, pp. 75–81.
50. Bonacker, D., Stoiber, T., Böhm, K.J., Prots, I., Wang, M., Unger, E., Their, R., Bolt, H.M., and Degen, G.H. Genotoxicity of inorganic lead salts and disturbance of microtubule function, *Environ. Mol. Mutagen*, 2005, vol. 45, pp. 346–353.
51. Faulstich, H., Stournaras, C., Doenges, K.H., and

Zimmermann, H.-P. The molecular mechanism of interaction of EtsPb$^+$ with tubulin, *FEBS Lett.*, 1984, vol. 174, no. 1, pp. 128–131.
52. Zimmermann, H.P., Faulstich, H., Hansch, G.M., Doenges, K.H, and Stournaras, C. The interaction of triethyl lead with tubulin and microtubules, *Mutat. Res.*, 1988, vol. 201, pp. 293–302.
53. Jan, A.T., Murtaza, I., Ali, A., Mohd, Q., and Haq, R. Mercury pollution : An emerging problem and potential bacterial remediation strategies, *World J. Microbiol. Biotech.*, 2009, vol. 25, no. 9, pp. 1529–1537.
54. Kaivalya, M., Nageshwar, Rao, B.N., and Satish Rao, B.S. Mangiferin: a xanthone attenuates mercury chloride induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2011, vol. 25, no. 2, pp. 108–116.
55. Blamey, F.P.C., Kopittke, P.M., Wehr J.B, and Menzies, N.W. Recovery of cowpea seedling roots from exposure to toxic concentrations of trace, *Plant Soil*, 2011, vol. 341, pp. 423–436.
56. Wallin, M., Larrson, H., and Edstrom, A. Tubulin sulfhydryl groups and polymerization in vitro. Effects of di- and trivalent cations, *Exp. Cell Res.*, 1977, vol. 107, pp. 219–225.
57. Vogel, D.G., Margolis, R.L, and Mottet, N.K. The effects of methyl mercury binding to microtubules, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1985, vol. 80, pp. 473–486.
58. Vogel, D.G., Margolis, R.L., and Mottet, N.K. Analysis of methyl mercury binding sites on tubulin subunits and microtubules, *BMC Pharmacol. Toxicol.*, 1989, vol. 64, pp. 196–201.
59. Kennedy, A.J., Johnson, D.R., Seiter, J.M., Lindsay, J.H., Boyd, R.E, Bednar, A.J., and Allison, P. Tungsten toxicity, bioaccumulation and compartmentalization into organisms representing two trophic levels, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, vol. 46, no. 17, pp. 9646–9652.
60. Adamakis, I.-D.S., Panteris, E., and Eleftheriou, E.P The fatal effect of tungsten on *Pisum sativum* L. root cells: indications for endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death, *Planta*, 2011, vol. 234, pp. 21–34.
61. Adamakis, I.-D. S., Panteris, E., and Eleftheriou, E.P. The cortical microtubules are a universal target of tungsten toxicity among land plant taxa, *J. Biol Res.*, 2010, vol. 13, pp. 59–66.
62. Chen, C., Huang, D., and Liu, J. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects, *Clean*, 2009, vol. 37, no. 4–5, pp. 304–313.
63. Horiunova, I.I., Krasylenko, Ya., and Yemets, A.I. Nickel effect's on the organization of actin filaments in *Arabidopsis thaliana* roots cells, *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, 2015, vol. 1, pp. 21–28.
64. *Li W., Zhao Y., Chou I.-N.* Nickel (Ni^{2+}) enhancement of α-tubulin acetylation in cultured 3T3 cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1996, vol. 140, pp. 461–470.
65. *Li W., Zhao Y., Chou I.-N.* (Ni^{2+}) enhancement of microtubule assembly in vitras dependent on GTP-function, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, vol. 193, pp. 202–208.
66. Marcano, L., Carruyo, I., Fernandez, Y., Montiel, X., and Torrebla, Z. Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and its correlation with toxicity, *Biocell*, 2006, vol. 30, no. 2. pp. 259–267.
67. Rivadeneira, J., Barrio, D., Arrambide, G., Gambino, D., Bruzzone, L., and Etcheverry, S. Biological effects of a complex of vanadium (V) with salicylaldehyde semicarbazone in osteoblasts in culture: Mechanism of action, *J. Inorgan. Biochem.*, 2009, vol. 103, pp. 633–642.
68. Ramirez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P., and Ostrosky-Wegman, P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide, *Mutat. Res.*, 1997, vol. 386, pp. 29l–298.
69. Ramos. S., Mouraa, J.J.G., and Aureliano, M. Recent advances into vanadyl, vanadate and decavanadate interactions with actin, *Metallomics*, 2012, vol. 4, pp. 16–22.
70. Eleftheriou, E.P., Adamakis, I.-D.S., and Melissa, P. Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L., *Protoplasma*, 2011, vol. 249, no. 2, pp. 401–416.
71. Fasulo, M., Bassi, M., and Domini, A. Cytotoxic effects of hexavalent chromium in *Euglena gracilis*: first observations, *Protoplasma*, 1982, vol. 110, pp. 39–47.
72. Zou, J.H, Wang, M., Jiang, W.S., and Liu, D.H. Effects of hexavalent chromium (VI) on root growth and cell division lin root tip cells of *Amarantus viridis* L., *Pak. J. Bot.*, 2006, vol. 38, no. 3, pp. 673–681.
73. Eleftheriou, E.P., Adamakis, I.D., and Michalopoulou, V.A. Hexavalent chromium-induced differential disruption of cortical microtubules in some Fabaceae species is correlated with acetylation of α-tubulin, *Protoplasma,* 2015. DOI 10.1007.s00709-015-0831-4.
74. Malerba, M., Crosti, P., and Cerana, P. Effect of heat stress on actin cytoskeleton and endoplasmic reticulum of tobacco BY-2 cultured cells and its inhibition by Co^{2+}, *Protoplasma*, 2010, vol. 239, pp. 23–30.
75. Hutchins, B.M., Hancock, W.O., and Williams, M.E. Magnet assisted fabrication of microtubule arrays, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, vol. 8, pp. 3507–3509
76. van de Mortel, J.E., Almar Villanueva, L., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., Koornneef, M., and Aarts M.G.M. Large expression differences in genes for

iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Phys.*, 2006, vol. 142, pp. 1127–1147.
77. Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., and Gregory, P.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases, *Nat. Rev. Genet.*, 2010, vol. 11, pp. 636–646
78. Chang, H.-B., Lin, Ch.-W., and Huang, H.-J. Zinc-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots, *Plant Growth Regul.*, 2005, vol. 46, pp. 261–266.
79. Andriolia, N.B., Soloneskib, S., Larramendyb, M.L., Mudrya, M.D. Cytogenetic and microtubule array effects of the zineb-containing commercial fungicide formulation Azzurro® on meristematic root cells of *Allium cepa* L., *Mutat. Res.*, 2012, vol. 742, pp. 48–53.
80. Hesketh, J.E. Microtubule assembly in rat brain extracts. Further characterization of the effects of zinc on assembly and cold stability, *Int. J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 16, no. 12, pp. 1331–1339.
81. Gaskin, F., and Kress, Y. Zinc ion-induced assembly of tubulin, *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252, no. 19, pp. 6918–6924.
82. Eagle, G.R., Zombola, R.R., and Himes, R.H. Tubulin-zinc interactions: binding and polymerization studies, *BMC Biochem.*, 1983, vol. 22, pp. 221–228.
83. Lowe, J., Li H., Downing, K.H., and Nogales, E. Refined structure of α-, β-tubulin at 3,5 a resolution, *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 313, pp. 1045–1057.
84. Camakaris, J., Voskoboinik, I., and Mercer, J.F. Molecular mechanism of copper homeostasis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 261, no. 2, pp. 225–232.
85. Liu, D.H., Xue P., Meng Q., Zhe J., Gu J., and Jiang W. Pb/Cu effects on the organization of microtubule cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum* L., *Plant. Cell. Rep.*, 2009, vol. 28, pp. 695–702.
86. Kulikova, A.L., Kholodova, V.P., and Kuznetsov, V.V. Actin is involved in early plant responses to heavy metal stress and associates with molecular chaperons in stress environments, *Russ. J. Rep. Dev. Biol. Sci.*, 2009, vol. 424, pp. 49–52.
87. Horiunova, I.I., and Yemets, A.I. Effect copper on actin filaments organization in *Arabidopsis thaliana* root cells, *Faktori eksperimental'noi evolucii organizmiv*, 2015, vol. 16, pp. 41–45.

Поступила 23.09.15