



УДК 576.314:576.344+581.522.5:582.263

© 2011

В. В. Грубинко, К. В. Костюк

**Образование двойных концентрических мембран
в клетках пресноводных водорослей при действии
токсикантов**

(Представлено академиком НАН Украины В. Д. Романенко)

Розглянуто вплив іонів цинку, свинцю і дизельного палива водного середовища на мембраноутворення в клітинах прісноводних водоростей. Вперше описано адаптацію водоростей до хімічних речовин за рахунок утворення в їх клітинах вторинних концентричних мембран, а також показані зміни структури мембран, які відбуваються в ході їх формування.

Жизнедеятельность клеток, особенно у водных организмов, контактирующих с водной средой непосредственно, во многом определяется составом, структурой и функциональным состоянием их мембран. В обеспечении устойчивости растений к действию факторов внешней среды помимо специфических, эволюционно приобретенных, важную роль играют и неспецифические реакции клетки на стрессоры. Многие из таких реакций связаны с состоянием и функциями мембран [1, 2]. Как динамические структуры, мембраны на изменения условий существования быстро реагируют на их разных сторонах биохимическими перестройками, сопровождающимися формированием гетерогенной физико-химической среды. Так, при попадании клеток в измененную среду поврежденная мембрана не только восстанавливает свои функции после устранения действия ксенобиотиков, но в отдельных случаях наблюдали уникальное явление, которое общепринятого названия еще не имеет, но рассматривается как феномен “индуцированного образования двойных концентрических мембран”. Это явление выявлено на ранней стадии аскоспорогенеза у *Arthroderma vanbreuseghemii* и позже у *Arthroderma simii* [3, 4], а также в течение созревания аск [5], когда обнаруживаются перепончатые структуры, состоящие из двух мембранных единиц в периферической зоне клеток. Выявленная мембранная система состояла из двух вставленных мембранных единиц аморфного характера подобно концентрическим кругам.

У растений мультиламеллярные перепончатые профили, ассоциированные с плазматической мембраной, пузырьками, эндоплазматической сетью и десмосомами, выявлены в су-

хой пыльце груши *Pyrus communis* L. [6]. У животных концентрическая система мембран обнаружена в изолированных нервных клетках гвинейской свиньи [7]. При моделировании внутриклеточных мембран *in vitro* под воздействием перманганата калия получены электронные микрофотографии миелиновых фосфолипидов двух индивидуальных мембран разной плотности, составляющих концентрический массив, в котором было от 200 до 1000 мембран [8]. В работе [8] предполагается регуляция формирования концентрической системы искусственных фосфолипидных мембран в аралдите под влиянием перманганата. Таким образом, установлено, что модулировать концентрические мембранные образования могут и химические вещества.

Что касается водорослей, то при выращивании хлореллы и микрококка в среде, содержащей 6–9% тяжелой воды (H- и D-среды), их клетки имели более толстую клеточную стенку, чем контрольные, а на микрофотографиях дейтерированных клеток были видны плотные и электроннопрозрачные участки упакованных мембран, наподобие мезосом [9]. Сделан вывод о том, что клеточная мембрана компенсирует реалогические параметры (вязкость, текучесть, структурированность) изменением количественного состава.

Таким образом, образование двойной мембраны в клетках сопряжено либо со структурно-функциональными перестройками при активной дифференциации клеток, либо с химическим воздействием. Следует заметить, что такую реакцию мембран наблюдали только у клеток, находящихся в экстремальных состояниях, и проявлялась она фенотипически в различных модификациях. В связи с последним обнаруженное явление в каждом случае авторами названо по-разному: “гомогенные внутренние и внешние треки двойной мембранной системы” [10], “многоцветные мембраны концентрической мембранной системы” [4], “система двойной мембраны” [5]. Поскольку все названия отображают явление с аналогичными изменениями, будем придерживаться определения “двойная концентрическая мембрана”.

В настоящем сообщении приведены результаты изучения индуцируемого токсикантами (тяжелыми металлами и нефтепродуктами) процесса образования двойных концентрических мембран у водорослей, отличающихся таксономическим положением и устойчивостью к факторам среды.

Исследования проводили на хлорелле *Chlorella vulgaris* Beijer., элодее *Elodea canadensis* и ряске *Lemna minor* L. Хлореллу выращивали в условиях накопительной культуры в люменостате при освещении лампами дневного света (2500 лк) и температуре (20 ± 1) °C на питательной среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горхема (№ 11) [11]. Элодею и ряску выращивали в аквариумах с отстоянной водопроводной водой при тех же условиях. В экспериментальных условиях к культуре растений в каждом случае отдельно добавляли водные растворы $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $Pb(NO_3)_2$ из расчета на ион: Zn^{2+} — 1,0, 2,0 и 5,0 мг/дм³; Pb^{2+} — 0,1, 0,2 и 0,5 мг/дм³, что соответствует 1, 2 и 5 ПДК, а также дизельное топливо 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 мг/дм³, что соответствует 1, 5, 10, 20, 30 ПДК [12, 13]. Период выдерживания водорослей в токсической среде составлял 1, 3, 7 и 14 сут. Контролем были растения, которые росли в среде без токсикантов.

Выделение клеточных мембран осуществляли из гомогенатов водорослей в 40 мМ *трис*-HCl (pH 7,6) по методике Финдлея и Эванса [14]. Осадок, полученный центрифугированием гомогенатов при 5000 об/мин в течение 15 мин при 4 °C, ресуспензировали в верхней фазе раствора, образованного при смешивании 0,25 М сахарозы, 30%-го полиэтиленгликоля, 0,2 М фосфата натрия, после чего полученную суспензию делили поровну на три поликарбонатные пробирки объемом 50 мл, в каждую добавляли 10 мл нижней фазы, смешивали



Рис. 1. Микрофотографии клеток хлореллы, элодеи и ряски, которые росли в среде без токсикантов (контроль)

и центрифугировали при 2000 g 15 мин в бакет-ротаторе. Мембранный материал собирали на поверхности деления фаз с помощью шприца.

Микроскопическое исследование мембран осуществляли с использованием красителя “хлор — цинк — йод” (водный раствор $ZnCl_2$, КЖ, насыщенный J_2) при увеличении 9000 (МБИ-15) [15]. Толщину мембран определяли метрически с учетом масштаба увеличения.

Все три вида растений, как известно, отличаются экологическими требованиями к среде обитания, обладают широкими адаптационными возможностями, поэтому представляют собой удобные модели для сравнительного изучения реакции на стрессовые воздействия.

В результате микроскопического анализа в клетках растений, которые росли в среде с тяжелыми металлами (ТМ) и дизтопливом (ДТ), по сравнению с клетками контрольных растений выявлены существенные морфологические изменения (рис. 1–4), которые в основном касались толщины мембран и размеров клеток (табл. 1).

С возрастом в среде концентрации ионов цинка уже в течение 1 сут в клетках хлореллы увеличивается зернистость цитоплазмы (см. рис. 2). По истечении 3 сут действия цинка в клетках появляется второй концентрический круг мембран, зернистость цитоплазмы возрастает, наблюдается повышенная вакуолизация и конденсация вещества белого цвета. На протяжении 7–14 сут концентрическая мембрана утолщается, а площадь ядерно-цитоплазматического пространства уменьшается. В клетках элодеи такие изменения наиболее ярко выявлялись в течение 1–3 сут действия цинка, после чего отчетливо видна деградация клеток, разрывы мембран и уменьшение ядерно-цитоплазматического пространства (см. рис. 2). Аналогичные изменения отмечены и у ряски. Наиболее заметный мембраногенез выявлен по истечении 3 сут действия цинка в концентрации 5 ПДК.

Ионы свинца индуцируют образование концентрических мембран у хлореллы уже в 1 сут действия, а начиная с 3 сут и далее происходит разрушение мембран, выход цитоплазмы (см. рис. 3) из клеток, максимальное уменьшение ядерно-цитоплазматического пространства. Такие эффекты в клетках элодеи и ряски видны уже на 1 сут действия токсиканта с их усилением как по мере возрастания его концентрации, так и увеличения времени действия до 14 сут.

Таким образом, действие свинца вызывает более значительные патологии раньше и в меньших концентрациях токсиканта, чем действие цинка.

При выращивании водорослей в среде с ДТ отмечены следующие изменения (см. рис. 4). У хлореллы при уровне токсиканта 1 ПДК образуется вторичная концентрическая мембрана, при 5 ПДК в клетках обнаруживаются уплотнения, которые формируют отчетливую мембрану при 10 ПДК. У ряски при 10 ПДК ДТ видны разрывы мембран, а концентрическая мембрана образуется уже при 1 ПДК вещества. У элодеи этот процесс также развивается при 1 ПДК токсиканта, а по мере возрастания его концентрации клетки гибнут.

Таблица 1. Основные морфометрические параметры клеток исследуемых водорослей, мкм

Водоросли	Срок действия токсиканта, сут	Влияние солей тяжелых металлов																	
		Цинк									Свинец								
		1 ПДК			2 ПДК			5 ПДК			1 ПДК			2 ПДК			5 ПДК		
		R	M1	M2	R	M1	M2	R	M1	M2	R	M1	M2	R	M1	M2	R	M1	M2
Хлорелла	1	4,0	1,0	0,2	3,0	1,0	0,4	2,6	0,9	0,6	3,0	1,0	0,7	2,9	0,6	0,9	3,0	0,6	1,0
	3	3,5	1,2	0,8	1,7	0,9	1,1	2,0	1,1	0,9	2,0	0,8	0,7	2,0	1,0	1,5	3,0	1,0	1,5
	7	2,0	0,5	0,5	1,5	0,5	1,0	3,0	1,0	3,0	2,0	1,0	1,0	1,7	1,0	1,0	3,0	1,0	2,0
	14	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0	0,7	1,0	2,0	1,0	1,0	2,2	1,0	1,0	2,0	1,0	1,3
Ряска	1	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,2	1,3	1,0	1,2	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3
	3	1,0	1,0	1,3	1,0	1,0	1,3	2,5	1,0	1,8	1,1	1,0	1,0	1,5	1,0	1,5	1,3	1,0	1,0
	7	1,0	0,7	0,6	1,5	0,7	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0	1,0	1,5	1,0	1,6	0,5	0,6	0,6
	14	1,7	1,0	0,3	1,6	1,0	0,8	3,0	1,0	0,5	3,8	0,7	0,5	1,0	0,7	0,6	1,5	1,0	1,5
Элодея	1	1,5	0,7	0,5	3,9	0,7	0,3	1,0	1,0	0,5	4,0	1,0	0,5	2,1	1,0	0,5	1,0	1,4	0,8
	3	1,0	1,0	0,3	0,9	0,9	0,8	0,7	1,0	0,6	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,5	1,2	0,7	1,5
	7	1,0	1,0	0,6	0,8	0,6	0,5	0,5	1,0	0,7	1,0	0,7	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0	1,0	2,0
	14	2,6	1,0	0,5	3,0	1,0	0,6	2,0	1,0	1,0	2,5	1,1	1,1	5,3	0,5	1,0	2,0	1,0	0,6
Водоросли	Срок действия токсиканта, сут	Контроль			Влияние дизельного топлива														
					1 ПДК			5 ПДК			10 ПДК			20 ПДК			30 ПДК		
		R	M1	M2	R	M1	M2	R	M1	M2	R	M1	M2	R	M1	M2	R	M1	M2
Хлорелла	14	1,5	1,0	0	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	0,2	1,0	0,8	0,4	2,4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5
Ряска	14	4,5	1,0	0	2,5	1,0	1,3	0,7	1,0	0,2	2,4	1,0	0	2,2	1,0	0,5	3,0	1,0	0,5
Элодея	14	2,0	1,0	0	2,1	1,0	0,7	1,5	1,0	1,0	3,1	1,0	2,0	2,5	1,0	0,6	3,0	1,0	0,3

Примечание. R — радиус клетки, мкм; M1 и M2 — толщина соответственно внешней (первичной) и внутренней (вторичной) мембран, мкм.

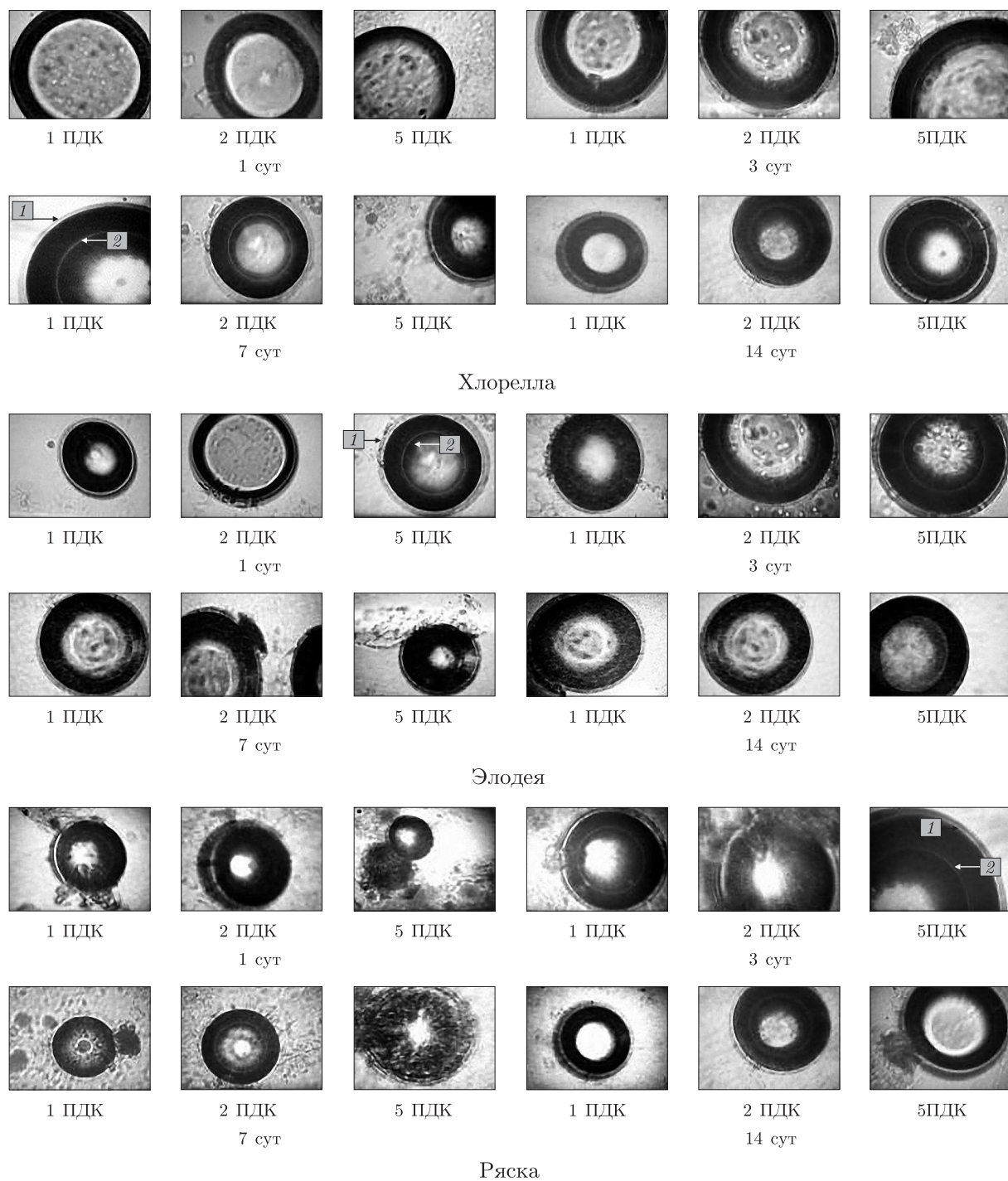


Рис. 2. Микрофотографии клеток хлореллы, элодеи и ряски, выращенных при действии цинка. $\times 9000$

Измеренные нами линейные размеры клеток и толщина мембран соотносятся с выявленными микроскопически изменениями (см. табл. 1).

В целом, при действии цинка у хлореллы радиус клеток уменьшается в 2–4 раза по сравнению с контролем при всех исследованных концентрациях металла. Практически не

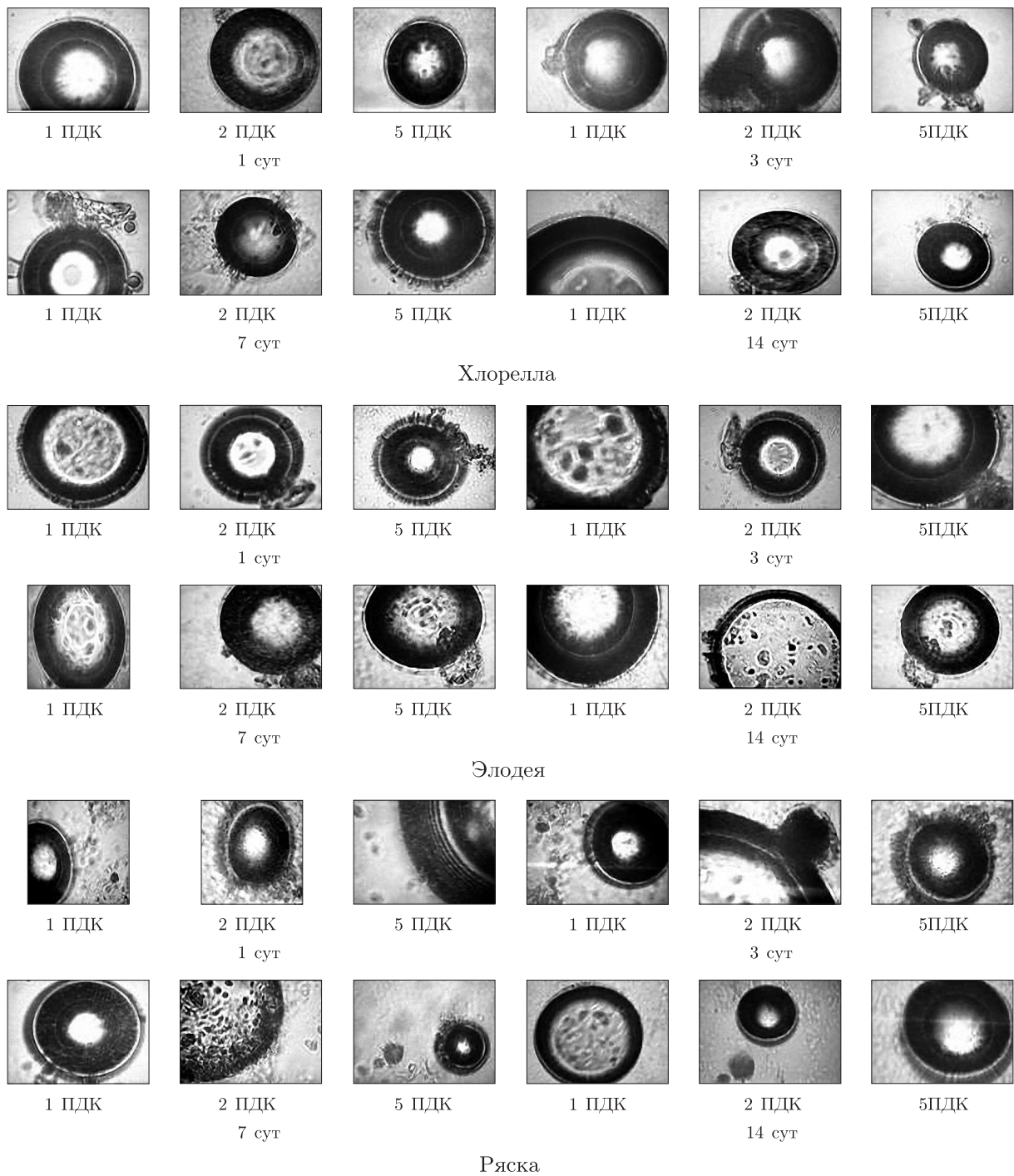


Рис. 3. Микрофотографии клеток хлореллы, элодеи и ряски, выращенных при действии свинца. $\times 9000$

изменяется при этом толщина внешней мембраны, но почти в 5 раз увеличивается толщина внутренней концентрической мембраны, которая становится по толщине такой же, как и внешняя. Таким образом, толщина клеточной мембраны при увеличении концентрации вещества и времени его действия возрастает практически в 2 раза. Ранее аналогичные изме-

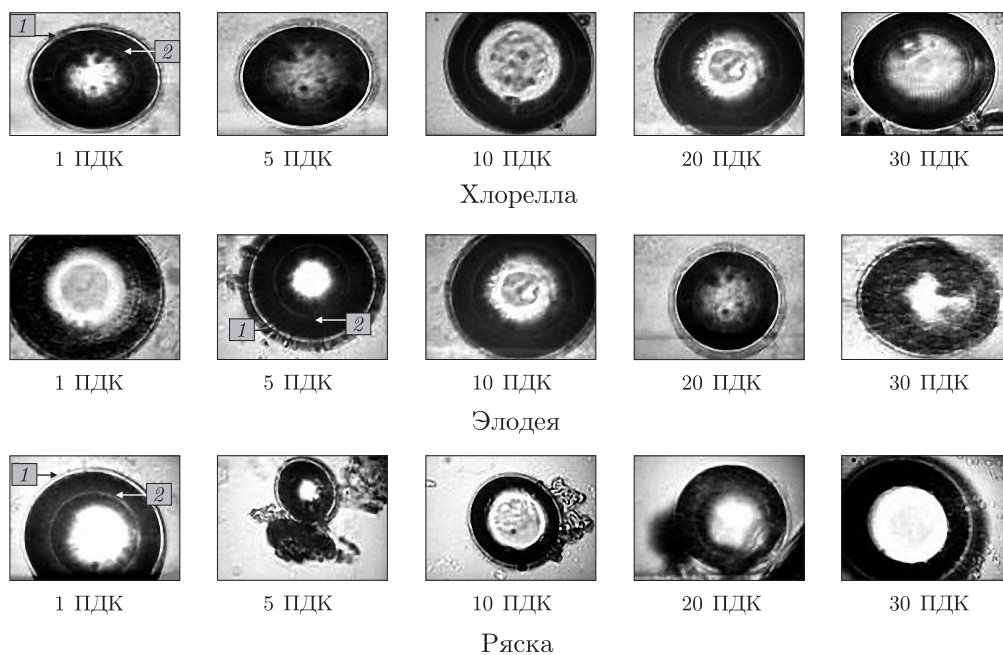


Рис. 4. Микрофотографии клеток хлореллы, элодеи и ряски, выращенных при действии дизельного топлива. $\times 9000$

нения выявлены у клеток хлореллы, выращенных на H- и D-средах [9], у которых клеточная стенка была в 2–3 раза толще, чем у контрольных клеток.

При действии свинца линейные размеры клеток также уменьшаются в 1,5 раза. При этом толщина внешней мембраны увеличивается приблизительно на 40%, а внутренней — в 1,3 раза по сравнению с 1 сут действия токсиканта.

У ряски радиус клеток возрастает в 1,5–3 раза как при действии цинка, так и при действии свинца. Толщина внешней мембраны изменяется в пределах статистических отклонений от среднего значения, а внутренней — больше в случае ярко выраженного ее формирования и менее заметно — у гибнущих клеток.

У элодеи в целом наблюдаются те же эффекты и по градиенту концентрации, и по градиенту времени действия токсиканта.

В целом, средние размеры клеток больше у хлореллы, но с увеличением времени действия металлов они уменьшаются в отличие от клеток ряски и элодеи. Значение средней толщины концентрической мембраны при всех концентрациях токсикантов у всех исследованных организмов близки, хотя чуть больше при уровне металлов в среде 5 ПДК.

При действии ДТ у хлореллы и ряски размер клеток уменьшается в 1,5 раза, а у элодеи — аналогично увеличивается. Толщина внешней мембраны по мере возрастания концентрации ДТ практически не изменяется, а толщина внутренней мембраны имеет максимальное значение у хлореллы при 5 ПДК, у ряски — при 1 ПДК, у элодеи — при 10 ПДК ДТ. Образование концентрических мембран в клетках при действии ДТ происходит, как и при действии металлов, при уровне токсиканта до 5 ПДК.

Процесс образования концентрических мембран у всех исследованных организмов универсален и наблюдается уже на 1 сут действия веществ-стрессоров независимо от их природы: биогенный цинк, токсичный свинец или неспецифический токсикант ДТ. Вместе с тем

существует видоспецифичная реакция на действие токсиканта, выражающаяся в скорости образования, толщине и времени дезадаптационного разрушения внутренней концентрической мембраны. Внешняя (первичная) мембрана при этом консервативна по толщине, за исключением разрывов и выхода из клеток цитоплазматического содержимого.

Высказано предположение, что в основе мембранной адаптации растений к неблагоприятным факторам может лежать гиперплазия эндоплазматического ретикулума, а именно увеличение его количества может сопровождаться образованием структур, которые в микроскопе часто видны как участки эозинфильной цитоплазмы [1, 2]. Биохимически доказано, что в структурах, сформированных гладким эндоплазматическим ретикуломом, увеличивается содержание ферментов, ответственных за детоксикацию. Таким образом, это явление свидетельствует об участии мембран в процессах детоксикации, что соотносится с моделью нашего исследования, однако требует более детального изучения.

Для более глубоких выводов о природе и механизмах образования двойных концентрических мембран необходимы экспериментальные исследования физиологических и биохимических свойств адаптированных клеток.

1. Чиркова Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Сорос. образоват. журн. – 1997. – № 9. – С. 12–17.
2. Чиркова Т. В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии. – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1988. – 244 с.
3. Ito H., Hanyaku H., Harada T., Tanaka S. Fine structure in ascosporegenesis of freeze-substituted *Arthroderma simii* // Rev. Iberoamer. Micol. (Bilbao, Spain). – 2000. – Ap. 699, E – 48080. – P. 13–16.
4. Tanaka S., Fujigaki T., Watanabe S. Ultrastructure of the concentric membrane system in asci of *Arthroderma vanbreuseghemii* // Med. Mycol. – 1982. – 20, No 2. – P. 127–136.
5. Tanaka S., Fujigaki T., Watanabe S. Differentiation of the double membrane system during ascospore-maturation of *Arthroderma vanbreuseghemii* as revealed by periodic acid-alkaline bismuth staining // Mycopathologia. – 1984. – 86, No 1. – P. 55–58.
6. Tiwari S. C., Polito V. S., Webster B. D. In dry pear (*Pyrus communis* L.) pollen, membranes assume a tightly packed multilamellate aspect that disappears rapidly upon hydration // Protoplasma. – 1990. – 153, No 3. – P. 157–168.
7. Fawcett D. W., Ito S. Observations on the cytoplasmic membranes of testicular cells examined by phase contrast and electron microscopy // J. Biophys. and Biochem. Cytol. – 1958. – 4, No 2. – P. 135–142.
8. Revels J. P., Ito S., Fawcett D. W. Electron micrographs of myelin figures of phospholipide simulating intracellular membranes // Ibid. – 1958. – 4, No 4. – P. 495–501.
9. Мосин О. В. О феномене клеточной адаптации к тяжелой воде. – 2007. – 7 с.: www.gaudeamus.omsk-city.com/.../Mosin.
10. Vaerwald R. J., Delcarpio J. B. Double membrane-bounded intestinal microvilli in *Oncopeltus fasciatus* // Cell and Tissue Res. – 1983. – 232, No 3. – P. 593–600.
11. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Ред. А. В. Топачевский. – Киев: Наук. думка, 1975. – 247 с.
12. Давыдова С. Л., Тагасов В. И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века: Учеб. пособие. – Москва, 2002. – 140 с.
13. Тяжелые металлы как фактор экологической опасности: Метод. указания / Сост. Ю. А. Холопов. – Самара: СамГАПС, 2003. – 16 с.
14. Финдлей Дж., Эванз У. Биологические мембраны. Методы: Пер. с англ. – Москва: Мир, 1990. – 423 с.
15. Broda B. Metody histochemii roslinnej. – Warszawa: Panstwowy zaklad wydawnictw lekarskich, 1971. – 255 p.

V. V. Grubinko, K. V. Kostyuk

Formation of the double concentric membranes in cells of freshwater algae at the action of toxicants

The impact of metals and petroleum products of the aquatic environment on membranogenesis in cells of freshwater algae is studied. The adaptation of algae to chemicals through the induction formation of secondary concentric membranes in their cells is first described. The changes in the membrane structure that occur during their formation are shown.