



УДК 576.314:576.344+581.522.5:582.263

В.В. Грубинко¹, К.В. Костюк²**СТРУКТУРНЫЕ АДАПТАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ
К ДЕЙСТВИЮ ЦИНКА И СВИНЦА**¹*Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира
Гнатюка, Украина*²*Институт гидробиологии НАН Украины, Киев*

Выявлены специфические и неспецифические ответы клеток и участие их мембранных структур в формировании сопротивляемости клеток водных растений (хлорелла, элодея, ряска) к действию ионов цинка и свинца. Обсуждается участие клеточных стенок в адаптации к токсикантам: образование наростов, мультипликация, флюидизация, формирование аквапоринов, апоптоз. Выявленные изменения в клеточных стенках предложены как биомаркеры токсичности.

Ключевые слова: ионы, адаптация, водоросли, клеточная стенка, цинк, свинец.

В. В. Грубінко¹, К.В. Костюк²**СТРУКТУРНІ АДАПТАЦІЇ КЛІТИННИХ СТІНОК ВОДНИХ РОСЛИН ДО ДІЇ
ІОНІВ ЦИНКУ І СВИНЦЮ**¹*Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка,
Україна*²*Інститут Гідробіології НАН України, Київ*

Виявлені специфічні і неспецифічні відповіді клітин і участь їх мембранных структур у формуванні опірності клітин водних рослин (хлорела, елодея, ряска) до дії іонів ЦИКу та свинцю. Обговорюється участь клітинних стінок в адаптації до токсикантів: утворення наростів, мультиплікація, флюїдизація, формування аквапоринів, апоптоз. Виявлені зміни в клітинних стінках запропоновані як біомаркери токсичності.

Ключові слова: іони, адаптація, водорості, клітинна стінка, цинк, свинець.

V.V. Grubinko¹, K.V. Kostyuk²**STRUCTURAL ADAPTATIONS OF CELLULAR WALLS OF AQUATIC PLANTS TO
THE ACTION OF IONS OF ZINC AND LEAD**¹*Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine*²*Institute of Hydrobiology of NAS, Ukraine*

Main specific and nonspecific cells responses and membrane structures participation in formation of cells resistance in stress conditions, caused by heavy metals (chlorella, waterweed, duckweed) in toxic concentrations are analyzed. The cell membranes participation in adaptation to toxicants (formation of growths, multiplication, fluidization, forming of aquaporin, apoptosis), which are first exposed to stressors, is discussed. Found specific and nonspecific reactions in membrane formation are proposed to use as biomarkers of toxicity.

Key words: ions, adaptation, algae, cell wall, zinc, lead.

Раскрытие клеточных механизмов адаптации водных растений к токсикантам является важным в связи с решением проблем устойчивости гидробионтов в условиях хронического загрязнения и роли биоты в формировании качества воды (Гандзюра, 2008; Арсан, 2010). Известно, что устойчивость гидробионтов к неблагоприятным факторам определяется скоростью формирования и адекватностью реакции на действующий фактор защитных систем клеток, среди которых определяющее значение

имеют клеточные мембраны (Финдлей, 1990; Патологические...). В связи с этим, важно проанализировать, как мембранный ответ клеток на действие токсикантов, так и их участие в формировании общей клеточной реакции на них.

Представление о клетке как биологическом триггере позволяет размежевать специфические и неспецифические ответы клеток. Считают, что специфическими являются любые изменения соотношений характеристик в начале ответа клетки в пределах толерантной зоны (нормы реакции), а неспецифической реакцией – процесс перехода в новое устойчивое состояние при силе и частоте действия фактора выше порогового уровня, сопровождающееся кардинальной перестройкой системы – диссипативно-континуальный переход системы (Грубінко, 2010; Уголев, 1989). К специфическим ответам клеток на токсичный стресс относят: антиоксидантный статус, активность ферментов, например, АТФ-аз, фосфатаз, гидролаз, липаз, изменения жирнокислотного состава мембран, особенно соотношение насыщенных и ненасыщенных их форм, направленность энергетических процессов (Mehrle, 2002).

При хронических токсичных влияниях и высоких концентрациях веществ, когда исчерпываются базовые защитные ресурсы в клетке, имеет место спонтанное, генетически не детерминированное протекание неспецифических явлений: неконтролируемая проницаемость мембран и деполяризация мембранного потенциала плазмалеммы (Веселова, 1993), вход ионов кальция в цитоплазму из клеточных стенок и внутриклеточных компартментов, закисление цитоплазмы, активация микрофиламентов (Пахомова, 1995), ускоренная затрата АТФ, хаотическое развитие свободнорадикальных процессов, усиление активности протонного насоса в плазмалемме с одновременным разобщением окисления и фосфорилирования, образование стрессовых белков, повышение содержания аминокислоты пролина и как следствие структурно-функциональные модификации белков и др. (Чиркова, 1997).

Вместе с тем, проблема заключается, в первую очередь, в эффективной характеристике рецепции действия и предвидения возможного повреждения неспецифическим фактором («сигналы беды») на субклеточном и клеточном уровнях, которые могут обеспечить раннее предупреждение развития патологий в клетке и, в результате, снижение продуктивности экосистем (Гандзюра и др., 2008). Вышеупомянутые специфические и неспецифические ответы являются качественными и количественными изменениями в клетках, развивающиеся во времени, и отображают патологическое состояние клеток и в связи с этим необъективны для мониторинга (Гандзюра, 2008). Поэтому целесообразно рассматривать те реакции клеток на стресс, которые проявляются и идентифицируются как мгновенные ответы и являются более объективными маркерами устойчивости клеток гидробионтов к токсичному загрязнению. Целью исследования было установить специфические и неспецифические ответы клеток водных растений в зависимости от природы, концентрации и времени действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использовали водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer. и высшие водные растения *Elodea canadensis* Michx., *Lemna minor* L. Их выбор связан с эволюционными и экологическими отличиями развития неспецифических ответов у одноклеточных и многоклеточных организмов. Водоросль культивировали в среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горхема № 11 при температуре 22-25⁰С и освещении 2500 лк в течение 16 час/сут (Топачевский, 1975). Элодею и ряску выращивали в отстоянной водопроводной воде при 20-24⁰С и аналогичном освещении. В экспериментальных условиях в среду добавляли водные растворы солей $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ и $Pb(NO_3)_2$ в расчете на количество ионов: Zn^{2+} – 1,0 мг/дм³, 2,0 и 5,0 мг/дм³ и ионов Pb^{2+} – 0,1 мг/дм³, 0,2 и 0,5 мг/дм³ – 1, 2 и 5 ПДК соответственно для водоемов рыбохозяйственного назначения (Давыдова и др., 2002). Отбор биомассы растений осуществляли на 1, 3, 7, и 14 сутки эксперимента при действии тяжелых металлов. Контролем служили растения, выращенные в среде без токсикантов.

Исследовали выделенные клеточные мембраны, полученные как описано ранее (Грубинко и др., 2011). Изменения в мембранах фиксировали микроскопически (МБИ-15 с последующим интегрирующим цифровым анализом на комплексе "SSTU-camera Manual Vision SSD-color-WOYV00020) после их окраски "хлор-цинк-йод" реактивом (Broda, 1971).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Мембраны клеток гидробионтов являются первым барьером на пути токсикантов внутрь клетки и фиксирует их сайтами связывания (Грубинко, 2010). Поэтому нами выявлено ряд мембранных эффектов у исследованных растений в зависимости от концентрации и длительности действия токсикантов. При кратковременном влиянии токсикантов в концентрациях ниже порогового уровня первично поврежденные клеточные мембраны способны быстро затягивать разрывы (рис. 1) с возобновлением функциональной активности, о которой можно судить по восстановлению активности мембранных АТФ-аз (Костюк и др., 2010а).

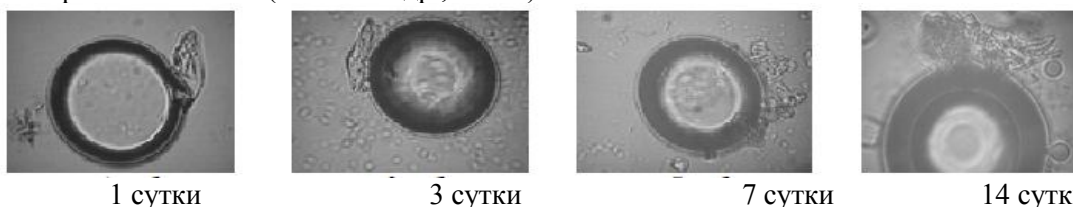


Рис. 1. Репарация клеточных мембран у элодеи при действии ионов свинца (2 ПДК). На этом и в последующих рисунках увеличение x9000.

При этом могут образовываться разнообразные внешние «наросты» на клетках, которые со временем уменьшаются, а в последствие могут исчезать (рис. 2).

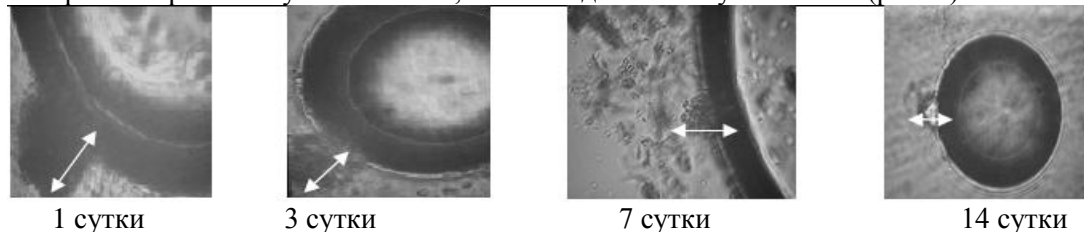


Рис. 2. Образование внешних "наростов" на клеточных стенках элодеи при действии ионов свинца (2 ПДК)

При хронических влияниях токсикантов в концентрациях выше порогового уровня клетки переходят на новый метаболический уровень, в новое дискретно-функциональное состояние, которое характеризуется индуцированным действующим веществом формированием вторичных концентрических мембран (Грубинко и др., 2011), которые формируют дополнительную защитную систему, способствующую нормализации функционального и метаболического гомеостаза клеток при токсичном влиянии и их выживанию (рис. 3).

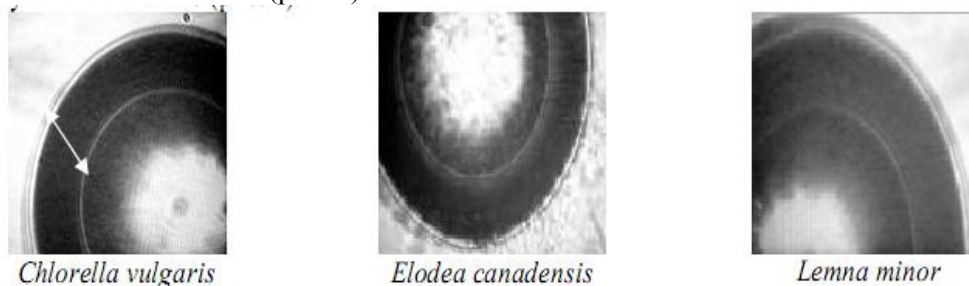


Рис. 3. Образование вторичных концентрических мембран в клетках водных растений при действии ионов цинка (5 ПДК)

Процесс образования двойной концентрической мембранной системы у всех растений универсален, что подтверждает общебиологическую природу выявленного явления, и происходит он уже вначале действия стрессоров независимо от их природы (биогенный цинк, токсичный свинец или дизельное топливо) (Грубинко и др., 2011). Считаем, что система концентрических мембран является одним из обязательных звеньев специфического ответа клеток на повреждение и особенно важной для клеток гидробионтов.

Допускаем, что в основе мембранной адаптации к неблагоприятным факторам лежит гиперплазия эндоплазматического ретикулума, поскольку доказано, что в структурах, сформированных гладким эндоплазматическим ретикулумом, увеличивается содержание ферментов, ответственных и за детоксикацию (Патологические....). Выявленное нами явление мультипликации мембранной системы в клетках водных растений согласуется с установленной для некоторых организмов способностью их клеток адаптироваться к действию стрессовых факторов за счет утолщения и мультипликативной фрагментации клеточных мембран, как например у *Arthroderma vanbreuseghemii* и *Arthroderma simii* (Ito. et al, 2000), высушенной пыльце *Pyrus communis* L. (Tiwari. et al, 1990), при выращивании хлореллы и микрококка в радиоактивной по дейтерию воде (Мосин, ресурс), и свидетельствует о его адаптивном значении. При этом выявлено разрушение первичной мембраны, в основе чего может лежать явление флюидизации мембран (рис. 4), которое наблюдается также при гипоосмотическом и высокотемпературном стрессах (Thewke. et al, 2003).

Вероятно, что, чем толще вторичная концентрическая мембранная, тем меньше первичная, а в ней больше концентрических кругов расхождения (растекание) липидных структур.

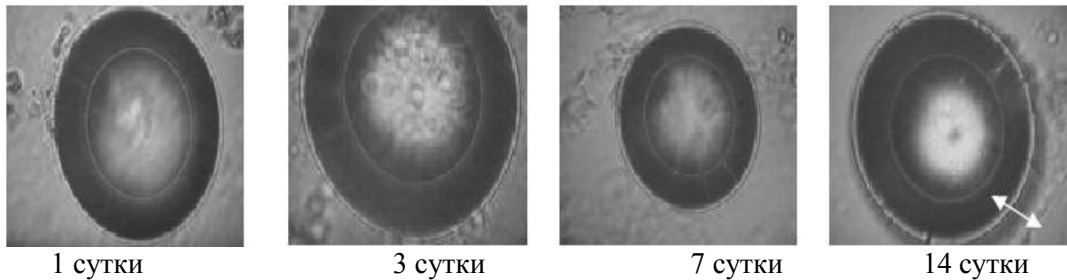


Рис. 4. Флюидизация мембран в клетках элодеи при токсичном воздействии ионов свинца (5 ПДК)

На основе исследования состава и функциональных параметров мембран предполагаем, что вторичная мембрана является полноценной мембранной структурой, которая функционирует как первичная после потери функций или разрушения последней. В первую очередь, это подтверждается ее липидным и белковым составом, а также проявлением активности специфических ферментов (АТФ-аз, щелочной фосфатазы), активность которых после первичного ее снижения при действии токсикантов возобновляется синхронно с формированием вторичной мембраны (Костюк и др., 2010а; Костюк и др., 2010б). В дальнейшем, в клетках возможно образование мультимембранной системы (рис. 5). Однако, следующие мембраны, скорее всего, являются “неполноценными”, неспецифическими образованиями и функционируют неэффективно, что может привести к образованию патологических структур, в связи с чем этот процесс сопровождается апоптозом.

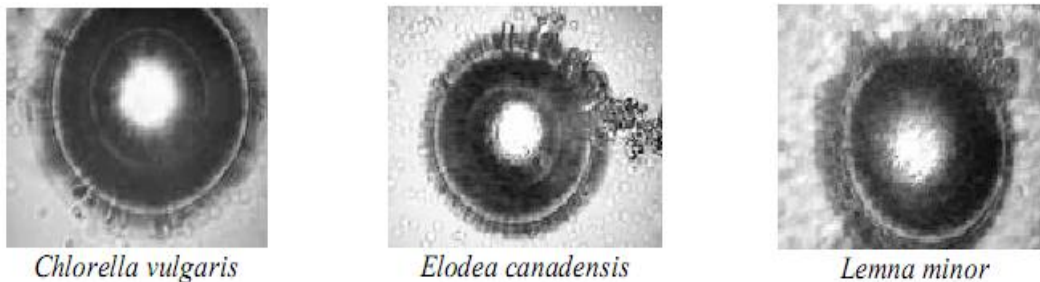


Рис. 5. Формирование мультимембранной системы и апоптоз в клетках водных растений при действии ионов свинца в концентрации 5 ПДК (14 сут.)

В результате изменения структуры клеточных стенок увеличивается их проницаемость, наблюдается выход из клеток веществ, нарушается ионный баланс, который приводит к обратному выходу ионов калия из клетки и входа ионов натрия (Чиркова, 1997). Существенную роль в развитии клеточных адаптационных реакций играет Ca^{2+} . Рассматривается его участие в генерировании потенциала действия у растений, что может быть одним из механизмов передачи сигнала о стрессе (Чиркова, 1997). При разных неблагоприятных влияниях в цитоплазме значительно возрастает доля свободного кальция, который приводит к деполяризации мембран и активации НАДФН-оксидазы, в результате чего происходит усиление продукции активных форм кислорода (Кулинский, 1999) и в дальнейшем увеличение проницаемости мембран и массовому выходу электролитов. При этом регуляторную роль в стабилизации ионного статуса клеток и их pH играют аквапорины (Блюма, 2006) – см. рис. 6.

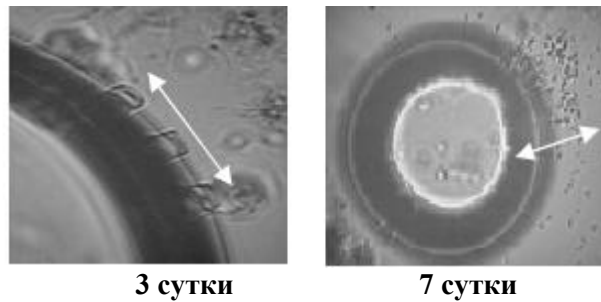


Рис. 6. Аквапорины в клетках ряски при действии ионов свинца (5 ПДК)
За счет подобного потока молекул воды и низкомолекулярных нейтральных соединений через липидный матрикс клетка возобновляет гомеостаз.

ВЫВОДЫ

- Первичные реакции клеток водных растений на действие токсикантов в значительной степени определяются изменениями в клеточной стенке. Первичными реакциями внешних мембран на стресс являются: разрывы мембран и их репарация, мультипликация и флюидизация, формирование аквапоринов.
- Выявленная нами связь между устойчивостью клеток к разным токсикантам и состоянием их внешних стенок дает возможность утверждать, что стабильность клеточных мембран является интегральным фактором обеспечения устойчивости водных растений к неблагоприятным условиям среды.
- Генерирование мембранных образований в клетках растений может водной средой может служить биомаркером неблагополучия этой среды.
- Преимуществом выявленных эффектов как биомаркерных является их ранняя идентификация.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Арсан О.М. Нова концепція в гідроекології – нові можливості системної оцінки негативних впливів на екосистеми // Гидробиол. журн. – 2010. – Т. 46, № 2. – С. 115–118.
- Блюма Д.А. Аквапорины растений // Физиология и биохимия культурных растений. – 2006. – Т. 38, № 5. – С. 396–404.
- Веселова Т.В. Веселовский В.А., Чернавский Д.С. Стресс у растений (Биофизический подход). – М.: РАН, 1993. – 144 с.
- Гандзюра В.П., Грубинко В.В. Концепція шкодочинності в екології. – Київ-Тернопіль: Вид-во ТНПУ ім. Володимира Гнатюка, 2008. – 144 с.
- Грубинко В.В. Регуляторная роль металлов в адаптации гидробионтов: эволюционно-экологические аспекты // Совр. пробл. физиол. и биохим. водных организмов: III Межд. конф., (Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 22-26 июня 2010 г.): тез. докл. – Петрозаводск: Ин-т биологии Карельского НЦ РАН, 2010. – С. 43–46.
- Грубинко В.В. Принципи описання стану біо-, еко- систем // Наук. запис. Терноп. нац. пед. ун-ту ім. Володимира Гнатюка. Сер. Біологія. Спец. випуск „Гідроекологія”. – 2010. – № 2(43). – С. 123–136.
- Грубинко В.В., Костюк К.В. Структурные изменения в клеточных мембранах водных растений при действии токсических веществ // Гидробиол. журн. – 2011. – Т. 47, № 6. – С. 43–58.



- Давыдова С.Л., Тагасов В.И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века : учебн. пос. – М.: МГУ, 2002. –140 с.
- Костюк К.В., Грубинко В.В. Роль мембранных АТФ-аз в адаптации гидробионтов к факторам водной среды // Гидробиол. журн. – 2010а. – Т. 46, № 4. – С. 49–62.
- Костюк К., Грубинко В. Вплив іонів цинку, свинцю та дизельного палива на ліпідний склад мембран клітин водних рослин // Віснику Львівського університету. Серія біологічна. – 2010б. – Вип. 54. – С. 257–264.
- Кулинский В.И. Активные формы кислорода и окислительные модификации макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский образов. журн. – 1999. – № 1. – С. 56–63.
- Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / под ред. А.В. Топачевского. – Киев: Наукова думка, 1975. – 247 с.
- Мосин О.В. О феномене клеточной адаптации к тяжелой воде [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.gaudeamus.omskcity.com>.
- Патологическая анатомия и физиология / Ультраструктурная патология клетки [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.nedug.ru/library/doc.aspx?item=34099>
- Пахомова В.М. Основные положения современной теории стресса и неспецифический адаптационный синдром у растений // Цитология. – 1995. – Т. 37, Вып. 1-2. – С. 66–87.
- Уголев А.М. Принципы организации и эволюции биологических систем // Журнал эволюц. биохим. и физиол. – 1989. – Т. 25, № 2. – С. 215–233.
- Финдлей Дж., Эванз У. Биологические мембраны. – М.: Мир; 1990. – 423 с.
- Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросовский образов. журн. – 1997. – № 9. – С. 12–17.
- Broda B. *Metody histochemii roslinnej*. – Warszawa: Panstwowy zaklad wydawnictw lekarskich, 1971. – 255 p.
- Ito H., Hanyaku H., Harada T., Tanaka S. Fine structure in ascosporeogenesis of freeze-substituted *Arthroderma simii* // *Revista Iberoamericana de Micologia (Bilbao, Spain)*. – 2000. – Ар. 699, E-48080. – P. 13–16.
- Mehrle P.M., Bergmann H.L. Biomarkers: Biochemical, Physiological, Histological Markers of Anthropogenic Stress. – Lewis: Boca Raton, FL, USA, 2002. – P. 211–234.
- 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. – Vol. 153, № 3. – P. 157–168.
- Thewke D., Kramer M., Sinensky M. S. Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 273. – P. 1–4.

REFERENCES

- Arsan, O.M. (2010). New conception in a hydroecology: is new possibilities of system estimation of negative influences on the ecosystems. *Hydrobiolog. J.*, 46(2), 115-118.
- Blooma, D.A. (2006). Plants aquaporins. *Physiologi and biochemistry of cultural plants*, 38(5), 396-404.
- Broda, B. (1971). *Metody histochemii roslinnej*. Warszawa: Panstwowy zaklad wydawnictw lekarskich.

- Chirkova, T.V. (1997). Cellular membranes and stability of plants to stress influences. *Sorosovskiy obrazovatelnyy J.*, (9), 12–17.
- Findley, G., & Evans, U. (1990). *Biological membranes*. Moscow: Mir.
- Davydova, S.L., & Tagasov, V.I. (2002). *Heavy metals as supertoxicants XXI of century*. Moscow: MSU.
- Gandzyura, V.P., & Grubinko, V.V. (2008). *Concept of harmfulness in ecology*. Ternopil: Publ. V. Hnatiuk Ternopil National Pedagogical.
- Grubinko, V.V. (2010). *A regulator role of metals is in adaptation of aquatic organisms: evolutionary and ecological aspects*. Current problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms: Proceedings of the III International Conference (June 22-26, 2010), Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia.
- Grubinko, V.V. (2010). Principles characterizing states of bio-, eko- systems. *Naukovi zapiski ternopilskogo universiteta V. Hnatiuka. Biology series*, 2(43), 123–136.
- Grubinko, V.V., & Kostiuk, K.V. (2012). Structural Changes in the Cellular Membranes of the Aquatic Plants under the Impact of Toxic Substances. *Hydrobiol. J.*, 48(2), 40-54.
- Ito, H., Hanyaku, H., Harada, T., & Tanaka, S. (2000). Fine structure in ascosporeogenesis of freeze-substituted *Arthroderma simii*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 699, 13–16.
- Kostiuk, K.V., & Grubinko, V.V. (2010). Role of Membrane ATP-ases in Adaptation of Aquatic Organisms to Environmental Factors. *Hydrobiol. J.*, 46(6), 45-56.
- Kostiuk, K., & Grubinko, V. (2010). The effect of zinc, lead ion and diesel fuel on membrane lipid composition of aquatic plants. *Visnyk of Lviv university. Biology series.*, (54), 257-264.
- Kulinskiy, V.I. (1999). Active forms of oxygen and oxidizing modifications of macromolecules: benefit, harm and defence. *Sorosovskiy obrazovatelnyy J.*, (1), 56-63.
- Mehrle, P.M., Bergmann, H.L. (2002). *Biomarkers: Biochemical, Physiological, Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis: Boca Raton.
- Mosin, O.V. *About the phenomenon of cellular adaptation to heavy water*. Retrieved from <http://www.gaudeamus.omskcity.com>. Pathoanatomy and physiology.
- Pachomova, V.M. (1995). Substantive provisions of modern theory of stress and nonspecific adaptation syndrome at plants. *Cytology*, 37(1-2), 66-87.



- Tiwari, S.C., Polito, V.S., & Webster, B.D. (1990). In dry pear (*Pyrus communis* L.) pollen, membranes assume a tightly packed multilamellate aspect that disappears rapidly upon hydration. *Protoplasma*, 153(3), 157–168.
- Thewke, D., Kramer, M., & Sinensky, M. S. (2003). Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 273, 1–4.
- Topachevskiy, A.V. (Ed.), (1975). *Methods of physiological and biochemical research of algae in hydrobiological practice*. Kyiv: Naukova dumka.
- Ugolev, A.M. (1989). Principles of organization and evolution of the biological systems. *J. evolution Biochem. and Physiol*, 25(2), 215-233.
- Ultrastructural pathology of cell*. Retrieved from:
<http://www.nedug.ru/library/doc.aspx?item=34099>.
- Veselova, T.V., Veselovskiy, V.A., & Chernavskiy, D.S. (1993). *Stress at plants (Biophysical approach)*. Moskov: Russain Academy of Sciences.