

УДК 576.314:576.344 + 581.522.5:582.263

К. В. Костюк, В. В. Грубинко

**ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН
ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ**

В статье рассматриваются изменения качественного и количественного состава мембран клеток водных растений при воздействии ионов цинка, свинца и дизельного топлива. Впервые описана связь образования вторичных концентрических мембран в клетках водных растений с изменениями липидного и белкового состава.

Ключевые слова: водные растения, тяжелые металлы, дизельное топливо, вторичные концентрические мембраны, липиды, белки.

В устойчивости организмов к воздействию факторов внешней среды, помимо специфических реакций клеточных мембран, таких как изменение плотности, вязкости, проницаемости и другие, важную роль играют и неспецифические, которые связаны с изменением их структуры и состава [32, 33]. Часто поврежденная мембрана не только восстанавливает свои функции после снятия воздействия ксенобиотиков. Наблюдается уникальное явление как результат защитно-компенсаторной адаптации клеток к неблагоприятным факторам — «образование вторичных концентрических мембран» [26, 39, 43]. Нами обнаружено образование двойной концентрической мембранной системы у хлореллы, элодеи и ряски при воздействии солей цинка и свинца, а также дизельного топлива [8].

Изменение структуры клеточной мембраны происходит при активной дифференциации клеток, а также при химических воздействиях. Вместе с тем причины и механизм развития этого процесса не установлены. Предполагается, что при образовании вторичных мембран происходит молекулярная перестройка, обуславливающая количественное и качественное изменение их состава, что сопровождается изменениями ферментативной активности, проницаемости и ионных потоков. Устойчивость клеточных мембран растений, приспособленных к стресс-факторам, связывают прежде всего с изменениями их липидов, а адаптивные мембранные перестройки — с изменением представленности и соотношения их различных классов [20, 41]. Кроме того, нами показано, что при влиянии ионов Zn^{2+} и Pb^{2+} на микроводоросли в их клеточных оболочках образуются прочные связи металлов с компонентами мембран, ингибируются постоянно функционирующие фер-

© Костюк К. В., Грубинко В. В., 2012

менты, ионный транспорт, энергетические процессы на мембране, а также изменяется ионный и энергетический гомеостаз в клетках водорослей [4, 17]. Однако до сих пор тонкие механизмы мембранных перестроек при изменении химического состава среды их обитания детально не изучены.

Целью нашей работы было изучение индуцируемого токсикантами (тяжелыми металлами и нефтепродуктами) изменения качественного и количественного состава мембран у разных групп водных растений, отличающихся как таксономически, так и по устойчивости к токсикантам.

Материал и методика исследований. Исследования проводили на хлорелле *Chlorella vulgaris* Beijer., элодее *Elodea canadensis* Michx и ряске *Lemna minor* L. Хлореллу выращивали в условиях накопительной культуры в люминесценте при освещении лампами дневного света (2500 лк) и температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ на питательной среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горема (№ 11) [23]. Элодею и ряску выращивали в аквариумах с отстоянной водопроводной водой при тех же условиях. В экспериментах к культуре растений в каждом отдельном варианте добавляли водные растворы солей тяжелых металлов (ТМ) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ из расчета на ион: Zn^{2+} — 1,0 и 5,0 мг/дм³; Pb^{2+} — 0,1 и 0,5 мг/дм³, что соответствует 1 и 5 ПДК_{рыб}, а также дизельное топливо (ДТ) в количестве 0,05, 0,25, 0,5, 1,0 и 1,5 мг/дм³, что составляет соответственно 1, 5, 10, 20 и 30 ПДК_{рыб} [10, 29]. Период инкубации водных растений с металлами составлял 1, 3, 7 и 14, а с ДТ — 14 суток. В качестве контроля использовали растения, культивируемые в среде без токсикантов.

Клеточные мембраны выделяли по методике Финдлея и Эванза [31] из гомогенатов биомассы водных растений, полученных в механическом гомогенизаторе при 7000 об/мин в 5 мМ трис-НСl буфере (pH 7,6), содержащем 0,5 М сахарозы, 0,005 ЭДТА, 0,01 М КСl и 0,001 М MgCl₂ (сырая масса : объем буфера — 1 : 5), центрифугированием при 5000 об/мин на протяжении 15 мин. Осадок, содержащий клеточные мембраны, ресуспендировали в верхней фазе раствора, полученного смешиванием двухфазной системы растворов 0,25 М сахарозы и 30%-ного полиэтиленгликоля в 0,2 М растворе фосфата натрия, предварительно выдержанного 24 ч при 4°C. Суспензию разделяли поровну в три поликарбонатные пробирки объемом 50 мл, в каждую добавляли 10 мл нижней фазы смеси растворов, смешивали и центрифугировали при 2000 г 15 мин в бакет-ротаторе. Мембранный материал собирали в пространстве разделения фаз с помощью шприца. Все процедуры осуществлены при 4°C.

Липиды экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью в соотношении 2 : 1 по методу Фолча [12]. Нелипидные примеси из экстракта удаляли отмыванием 1%-ным раствором КСl [28]. Количество общих липидов определяли весовым методом после отгонки экстрагирующей смеси [12]. Разделение липидов на отдельные фракции проводили методом восходящей одномерной тонкослойной хроматографии в силикагеле на стеклянных пластинках после предварительного активирования разделяющего слоя [15] с использованием в качестве подвижной фазы смеси гексана, диэтилового эфира и ледяной уксусной кислоты в соотношении 70 : 30 : 1 [28]. Хроматограммы прояв-

ляли в парах кристаллического йода. Количество неполярных липидов определяли бихроматным методом [28] с последующим спектрофотометрированием экстрактов при длине волны 615 нм. Содержание фосфолипидов устанавливали по количеству неорганического фосфора после их минерализации при температуре 180°C по методу В. Е. Васьковского [44]. Содержание белков определяли по Лоури [38]. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики [21].

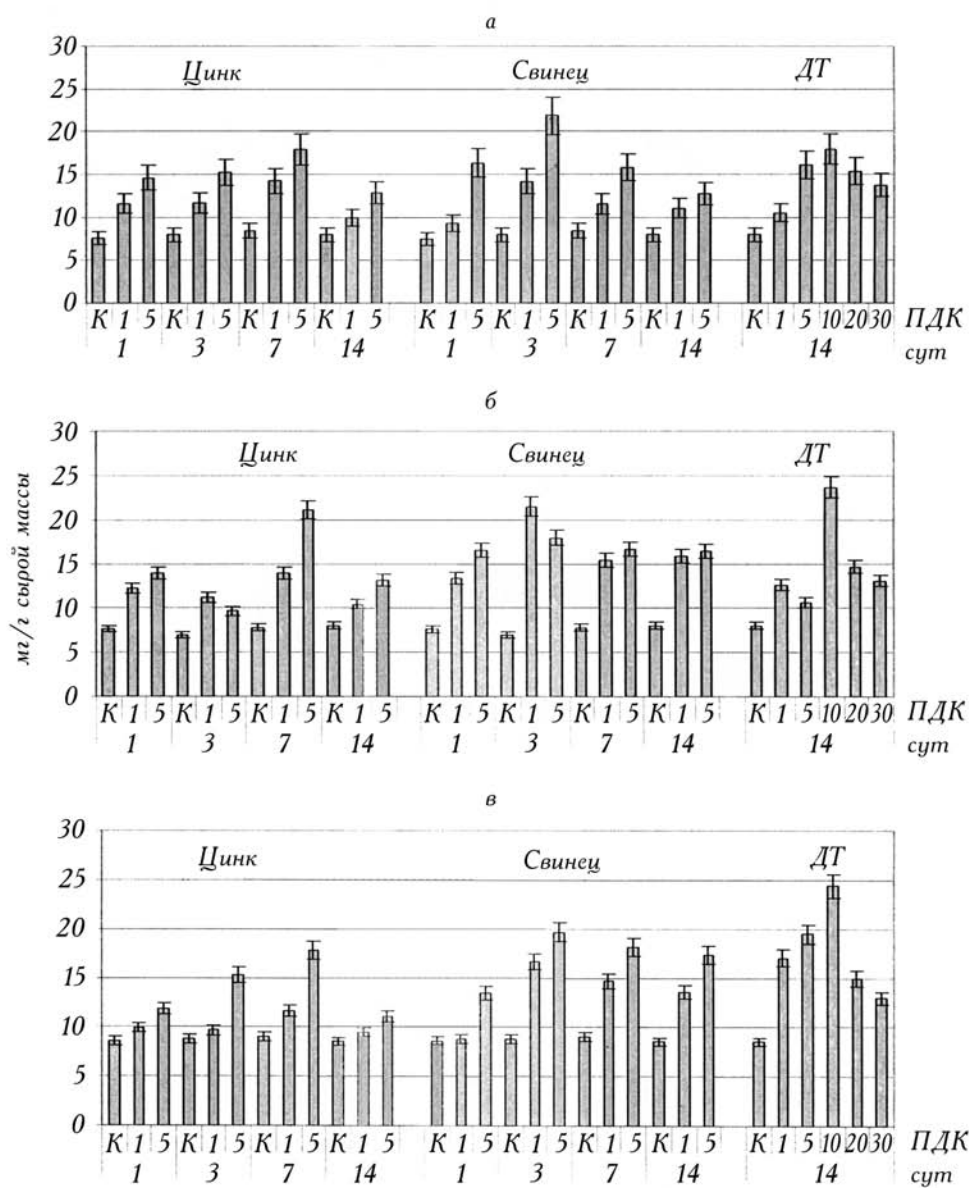
Результаты исследований и их обсуждение

В клетках водных растений, культивируемых в среде с тяжелыми металлами и дизельным топливом, нами выявлены существенные морфологические отличия по сравнению с клетками контрольных растений, состоящие в образовании двойной концентрической мембранной системы и изменении толщины мембран и величины клеток [8]. Для более конкретных выводов о природе и механизмах образования двойных концентрических мембран нами были исследованы изменения их состава под влиянием токсических факторов.

Известно, что структурные и динамические характеристики липидного матрикса могут изменяться в зависимости от ряда факторов: температуры, давления, рН, неорганических ионов, ксенобиотиков и др. [35]. Клетки отвечают на эти воздействия изменением количественного, а иногда и качественного состава мембран. Поэтому изучение влияния токсических факторов на липидный состав мембран как ключевых элементов связи между внешней средой и внутриклеточным откликом водных растений может прояснить вопросы их резистентности. Сравнительный анализ содержания липидов клеток хлореллы, элодеи и ряски, выращенных в среде с ТМ и ДТ, показал различия в содержании мембранных липидов по сравнению с контролем (рис. 1).

При стрессовом воздействии содержание липидов в мембранах существенно увеличивается. Так, цинк стимулирует синтез липидов у всех исследованных водных растений — как по мере возрастания концентрации металлов (до 5 ПДК), так и с увеличением продолжительности воздействия (до 7 суток). К 14-м суткам количество липидов у опытных растений становится близким к контрольным показателям.

У хлореллы накопление липидов было максимальным и при воздействии свинца (рис. 1, а). Их содержание было практически в три и два раза выше, чем в контроле, соответственно на 3-и и 7-е сутки, после чего оно постепенно снижалось до контрольных значений. У элодеи и ряски (см. рис. 1, б, в) динамика содержания липидов аналогична: снижение начиналось уже на 7-е сутки воздействия металла, как и при влиянии цинка. Поскольку длительное (до 14 сут) воздействие токсикантов вызывало снижение содержания липидов, то можно предположить исчерпание способности растений к защите. Показано [40], что при длительном воздействии металлов (медь, кадмий, цинк) на водные растения уменьшается общее содержание липидов, причем чем выше токсичность металла, тем значительнее снижение показателя, что подтверждают полученные нами результаты.



1. Общее содержание липидов в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии тяжелых металлов и дизельного топлива, $M \pm m$, $n = 3$.

По сравнению с цинком, воздействие свинца приводило к увеличению содержания липидов у хлореллы и ряски в среднем в 1,4, а у элодеи — в 1,6 раза, что свидетельствует о стрессовом влиянии свинца как типичного токсиканта для водных растений [47].

Дизельное топливо также стимулировало накопление липидов у всех водных растений, в большей степени у хлореллы и ряски (см. рис. 1, а—в). Воз-

растание содержания липидов в 2 раза отмечено при увеличении концентрации до 10 ПДК. При более высокой оно снижалось, но все же превышало контрольные величины.

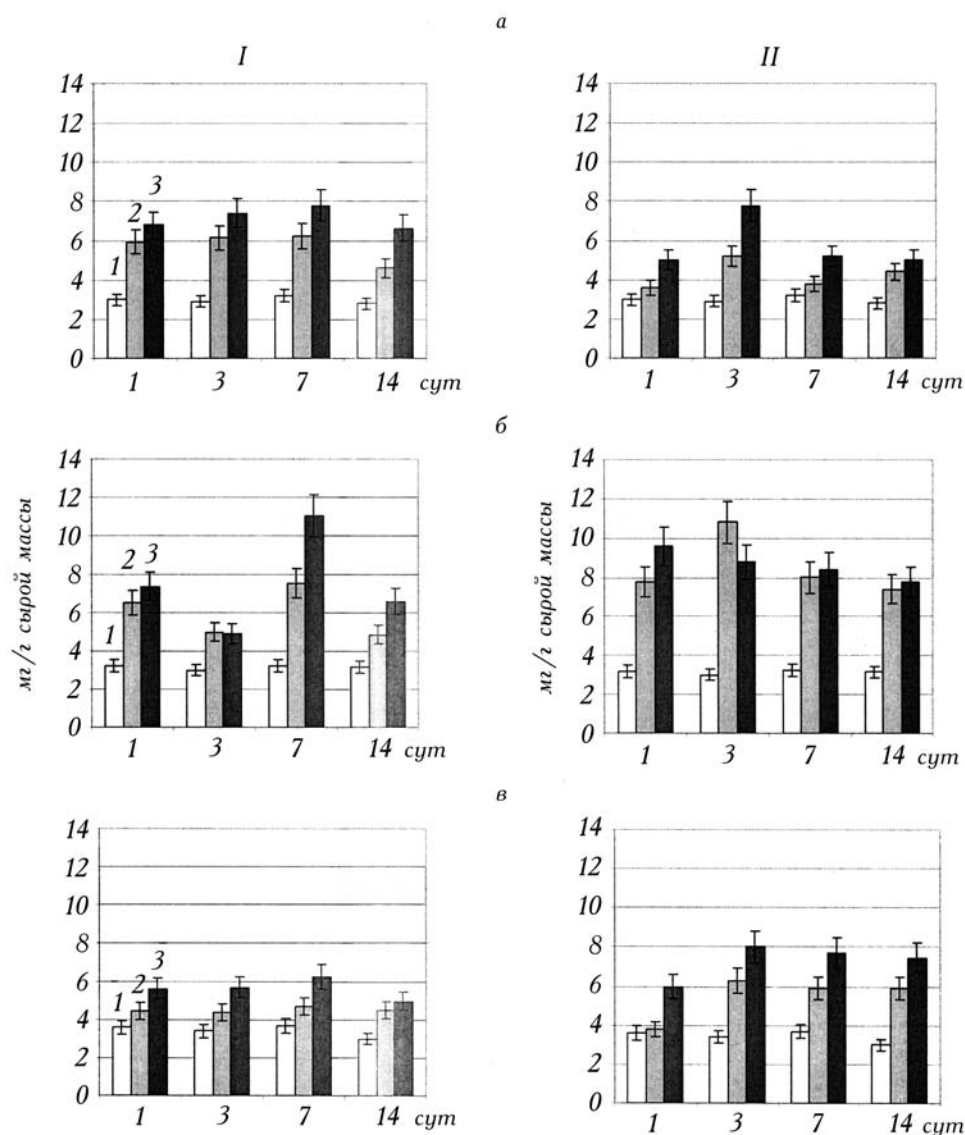
Хлорелла активно накапливает липиды при воздействии всех исследованных токсикантов примерно в равной степени. У элодеи и ряски максимум накопления липидов вызывает ДТ и приблизительно одинаково — ионы металлов. Такие различия могут быть связаны с особенностями строения клеток водных растений [9].

В связи с установленными закономерностями возникает вопрос об изменении соотношения основных классов липидов в процессе образования вторичных концентрических мембран. Устойчивость мембран растений связывают, в частности, с качественными и количественными изменениями в составе их липидов, прежде всего триацилглицеролов и фосфолипидов [32]. Поэтому нами исследованы изменения содержания триацилглицеролов (ТАГ), диацилглицеролов (ДАГ), фосфоглицеролов (ФЛ) и незатерифицированных жирных кислот (НЭЖК). Установлено, что их количество в мембранах водных растений значительно увеличивалось при воздействии всех токсикантов (рис. 2—9). Доминирующими группами были ТАГ и ФЛ.

Повышение содержания ТАГ — один из факторов стабилизации мембран, в физиологических условиях они являются предшественниками образования ДАГ и НЭЖК [37]. Поэтому содержание ТАГ у водных растений в токсических условиях было в 1,5—2,0 раза выше, чем других липидов. Воздействие ионов цинка увеличивало накопление ТАГ в клетках хлореллы более чем в 2 раза, элодеи — в 2—3 и ряски — в 1,5—2,0 раза по сравнению с контролем. Их максимальное возрастание обнаружено на 7-е сутки воздействия ионов цинка (5 ПДК).

При воздействии ионов свинца максимальное накопление ТАГ у всех водных растений было отмечено на 3-и сутки, в дальнейшем их количество уменьшалось. При 5 ПДК обоих металлов содержание ТАГ было на 20—25% выше, чем при 1 ПДК. Дизельное топливо также стимулировало накопление ТАГ, максимум отмечен при 10 ПДК.

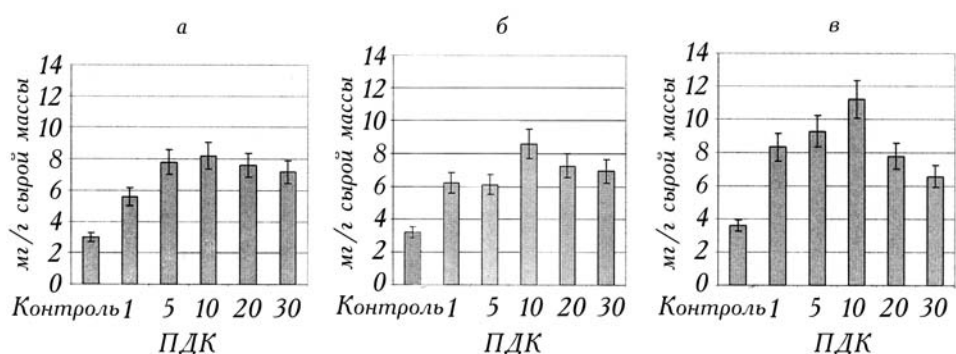
Полученные результаты свидетельствуют о том, что накопление ТАГ является типичным ответом водных растений на воздействие токсикантов, что согласуется с литературными данными, согласно которым уровень накопления триглицеридов в клетках хлореллы при стрессе может достигать 80% их сухой массы [6]. Можно предположить единый механизм участия ТАГ в стабилизации мембран клеток водных растений при токсическом воздействии, поскольку увеличение их содержания связано с уплотнением и уменьшением текучести мембран [11], что свидетельствует об участии этих веществ в формировании барьеров, препятствующих проникновению токсикантов в клетки. Практически двухкратное увеличение содержания ТАГ в мембранах соотносится также с фактом формирования двойной концентрической мембранной системы при воздействии токсикантов.



2. Содержание триацилглицеролов в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии цинка (I) и свинца (II), $M \pm m$, $n = 3$.

Как известно, стрессовое воздействие на мембранные липиды активирует липазы и фосфолипазы [24]. Поэтому наряду с возрастанием содержания ТАГ у всех водных растений увеличивается также количество ДАГ, ФЛ и НЭЖК (рис. 4—9).

У хлореллы ионы цинка и свинца в обеих концентрациях увеличивали содержание ДАГ, при 5 ПДК — практически в два раза по сравнению с контролем. Максимальное накопление ДАГ при воздействии ионов цинка отме-



3. Содержание триацилглицеролов в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии дизельного топлива (на 14-е сутки), $M \pm m$, $n = 3$.

чено на 7-е сутки, а свинца — на 3-и, после чего содержание липидов этой группы уменьшалось на 60—70%.

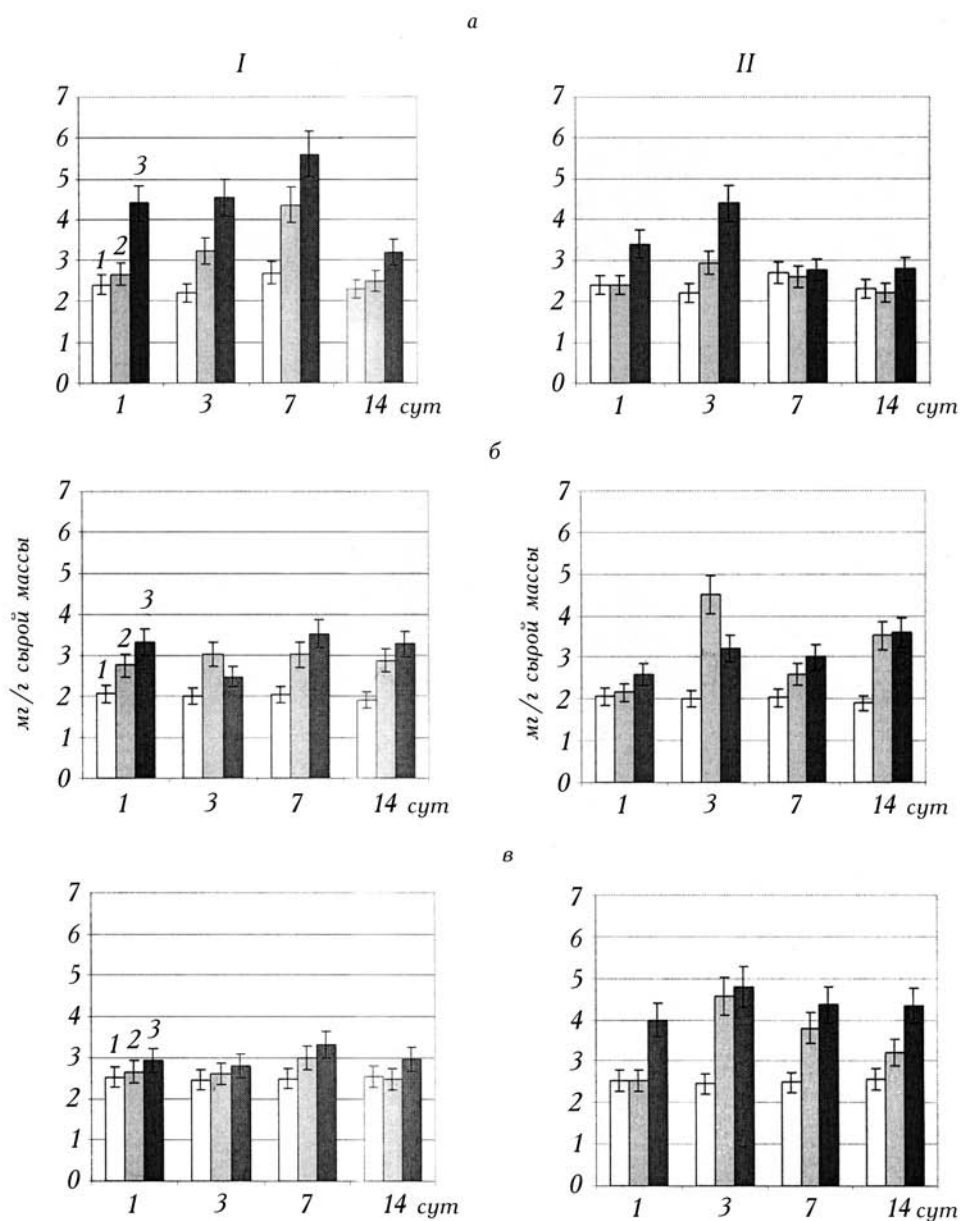
У элодеи и ряски динамика накопления была практически аналогичной, с тем лишь отличием, что содержание ДАГ к концу эксперимента уменьшалось всего на 10—15% от максимальных значений, установленных на 7-е сутки воздействия металлов.

Наибольшее накопление ДАГ у всех водных растений при воздействии ДТ зарегистрировано при 10 ПДК. С увеличением его концентрации содержание липидов в мембранах клеток снижалось до значений, близких к контрольным.

Одними из наиболее функционально значимых компонентов мембран являются фосфолипиды, которые не только влияют на их текучесть, но и формируют микросреду для мембранных ферментов, ионных каналов, а также регулируют связь клеток с внешней средой [34].

У хлореллы ионы цинка стимулировали накопление ФЛ с максимумом на 7-е сутки при 5 ПДК (см. рис. 5). На 14-е сутки их содержание снижалось. Аналогичная зависимость была характерна для элодеи и ряски. Однако, если у хлореллы максимальное отклонение показателя от контроля было двукратным, то у элодеи и ряски содержание ФЛ на 3—7 сут возрастало соответственно в 5—6 и 10—15 раз по сравнению с контролем (5 ПДК). Ионы свинца воздействовали практически аналогично. Уже в концентрации 1 ПДК они вызывали увеличение содержания ФЛ у хлореллы на 1-е сутки в 5 раз, на 3-и — практически в 18 раз. Максимальное их накопление отмечено при 5 ПДК металла в среде на 3-и сутки.

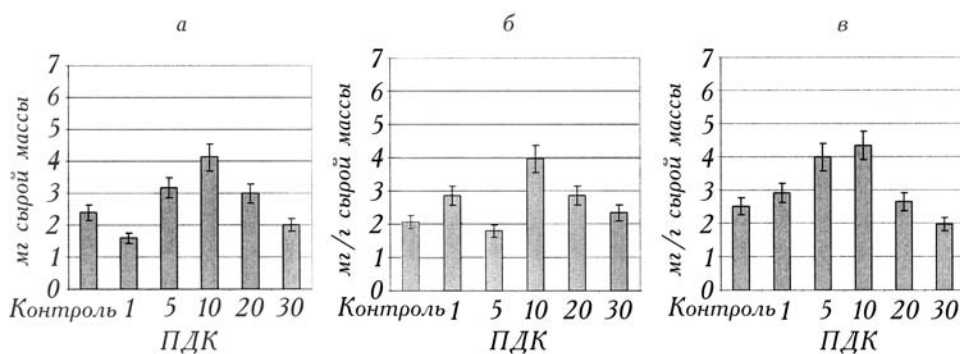
Аналогичная закономерность выявлена при воздействии свинца у элодеи и ряски. Содержание ФЛ у всех исследованных водных растений при воздействии свинца (1 ПДК) на 3-и сутки было выше, чем в контроле: у хлореллы — в 14, у элодеи — в 8 и у ряски — в 7 раз, что отличает воздействие



4. Содержание диацилглицеролов в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии цинка (I) и свинца (II), $M \pm m$, $n = 3$.

свинца от цинка. По-видимому, более высокая токсичность свинца по сравнению с биогенным цинком стимулировала большее накопление ФЛ как защитного компонента мембран.

При всех исследованных концентрациях ДТ стимулировало накопление ФЛ у водных растений практически в 10—15 раз большее, чем в контроле.



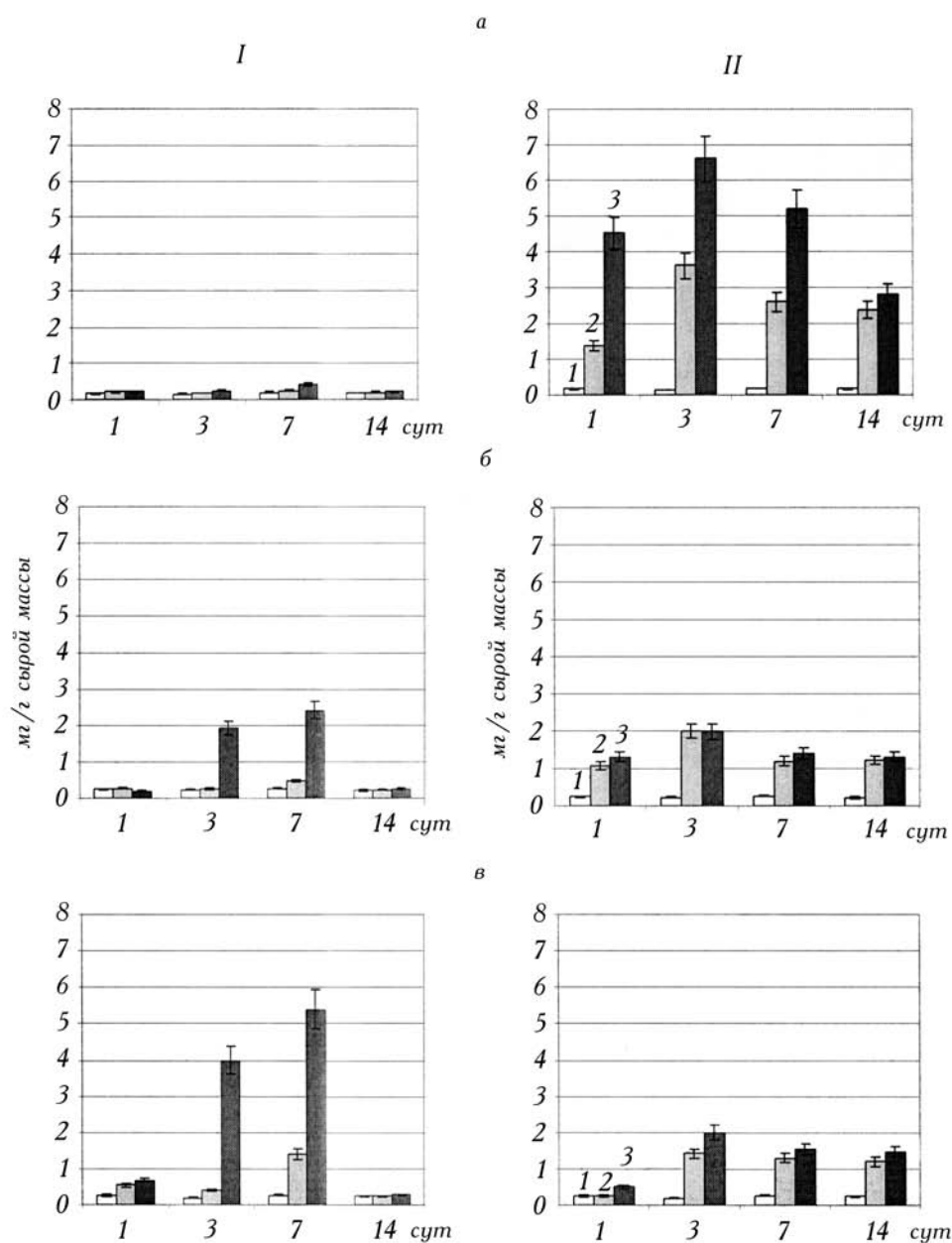
5. Содержание диацилглицеролов в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии дизельного топлива (на 14-е сутки), $M \pm m$, $n = 3$.

Максимум отмечен при 10 ПДК. Таким образом, в ответ на воздействие ионов цинка, свинца и ДТ водные растения накапливали ФЛ как защитный структурно-функциональный компонент мембран. Общей закономерностью реакции клеток исследованных растений был максимум адаптивных возможностей при 5 ПДК металлов и 10 ПДК ДТ на протяжении 7 сут. Увеличение концентрации токсиканта и продолжительности его воздействия снижает адаптивно-защитные возможности клеток, что связано с их повреждениями.

Увеличение содержания фосфолипидов можно рассматривать как общий механизм токсикорезистентности у водных растений к ТМ и ДТ, формирующийся в зависимости от концентрации и времени воздействия. Возможно, интенсивность этого процесса объясняется высокой сорбционной способностью заряженных фосфолипидов, которая выше, чем у пептидогликанов [46]. Кроме того, известно, что фосфолипиды могут выполнять функции мессенджеров, передающих информацию об изменениях окружающей среды внутрь клетки [45], что расширяет их функциональное значение в интоксцированных водных растениях.

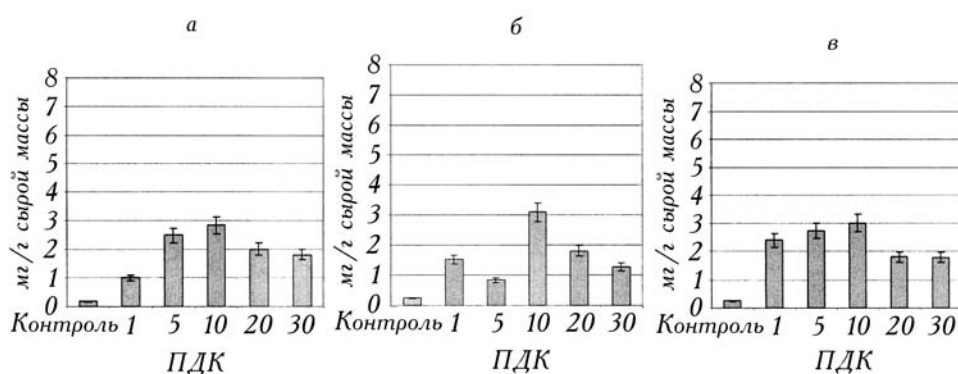
Содержание НЭЖК может быть показателем как усиленного расщепления липидов, так и их синтеза, то есть интенсивности метаболизма [20]; при этом имеет значение их качественный состав. В целом динамика накопления НЭЖК у хлореллы при воздействии обоих металлов практически такая же, как и других классов липидов (см. рис. 8). Ионы цинка стимулировали накопление кислот в 2 раза относительно контроля на 7-е сутки при 5 ПДК. Воздействие свинца скорее всего стрессовое, поскольку содержание НЭЖК возрастало на 80% (5 ПДК) относительно контроля уже в течение первых суток воздействия и постепенно снижалось к 14-м. Возможно, быстрое образование НЭЖК было следствием расщепления липидов, синтез жирных кислот при этом угнетался.

В отличие от хлореллы, у ряски и элодеи содержание НЭЖК возрастало по мере увеличения концентрации металлов и продолжительности воздействия: ионов цинка — до 7—14-х, ионов свинца — до 3-х суток. У всех исследуемых



6. Содержание фосфолипидов в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии ионов цинка (I) и свинца (II), $M \pm m$, $n = 3$.

дованных растений ДТ до концентрации 10 ПДК также увеличивало содержание НЭЖК (у хлореллы — в 1,3, у элодеи — в 4, и у ряски — в 1,5—2 раза), после чего этот показатель снижался.

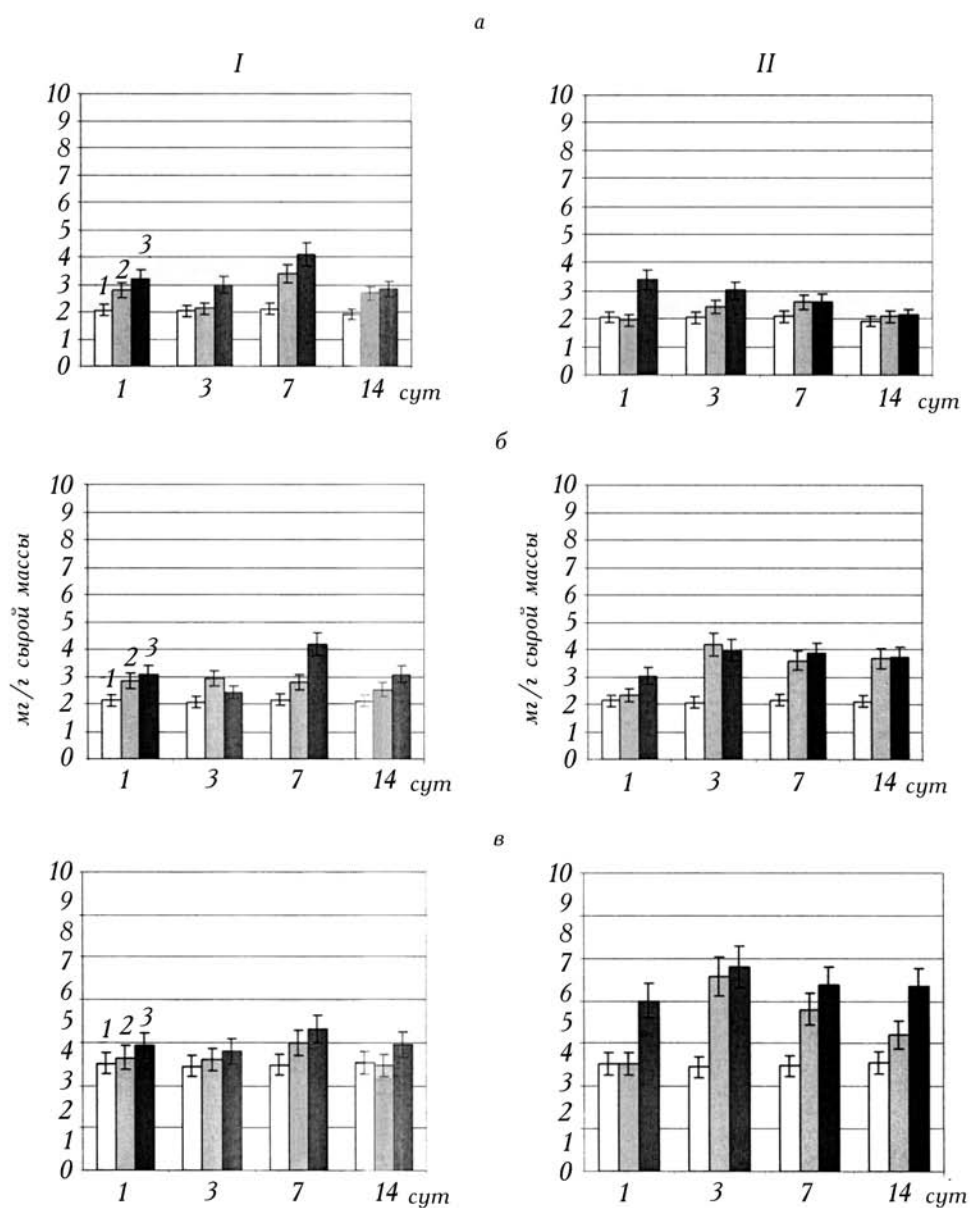


7. Содержание фосфолипидов в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии дизельного топлива (на 14-е сутки), $M \pm m$, $n = 3$.

Поскольку между классами липидов существует метаболическая связь, то соотношение ТАГ : ДАГ : ФЛ : НЭЖК изменялось согласованно (таблица). На этот показатель влияние оказывали ионы цинка и свинца, а также ДТ. При воздействии ионов цинка во всех вариантах опыта у хлореллы и элодеи относительное содержание ТАГ возрастало в пределах 5—10%. У ряски этот показатель при 1 ПДК ионов металла возрастал, а при 5 ПДК — снижался. В контроле относительное содержание ТАГ было близким у всех растений, а при воздействии ионов цинка оно больше изменялось у хлореллы и ряски. Одновременно у хлореллы и ряски на 3-и и 14-е сутки воздействия относительное содержание ДАГ снижалось на 5—10% по сравнению с контролем. Отмечена тенденция увеличения доли ФЛ и снижения — НЭЖК.

Таким образом, общей закономерностью, проявляющейся в основном на протяжении 1—7 сут воздействия токсикантов, является увеличение в мембранах водных растений доли ТАГ и ФЛ за счет снижения относительного содержания ДАГ и НЭЖК, что соответствует биохимической логике образования ТАГ и ФЛ из ДАГ и НЭЖК [24]. Очевидно, воздействие ионов цинка является фактором стабилизации (уплотнения) мембран в клетках водных растений как механизма защиты от повреждающего влияния и проникновения в клетку.

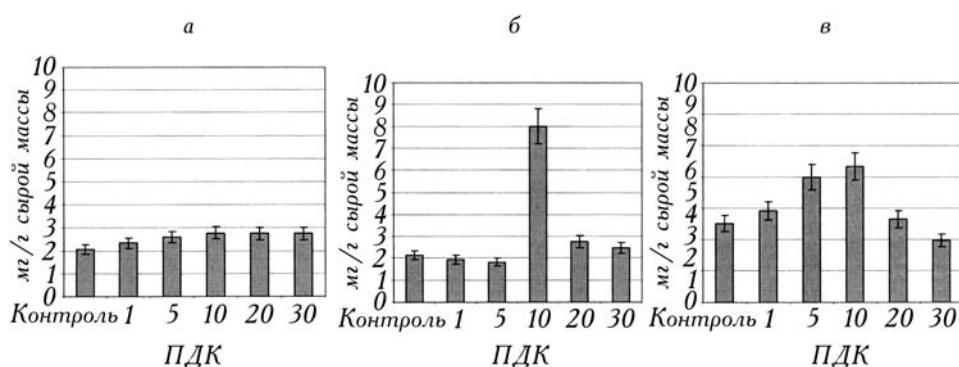
При воздействии Pb^{2+} у хлореллы и ряски доля ТАГ в мембранах клеток по сравнению с контролем изменялась незначительно, у элодеи на 1-е сутки она возрастала, а к 14-м — уменьшалась, но значения показателя были на 5% выше, чем в контроле. Как и при воздействии ионов цинка, снижалась доля ДАГ. Доля ФЛ при воздействии ионов свинца значительно возрастала по сравнению с контролем, особенно у хлореллы (в 11—15 раз), у элодеи и ряски — практически втрое. Доля мембранных НЭЖК наиболее существенно снижалась у элодеи, в меньшей степени — у хлореллы и ряски. Таким образом, результаты воздействия ионов свинца подтвердили тенденцию к накоплению ТАГ и ФЛ и снижению доли ДАГ и НЭЖК в клеточных мембранах водных растений при воздействии ионов металлов. При этом содержание



8. Содержание неэтерифицированных жирных кислот в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии цинка (I) и свинца (II), $M \pm m$, $n=3$.

металла в среде и продолжительность его воздействия не имели определяющего значения для выраженности ответа клетки.

ДТ воздействует на клетки исследованных водных растений аналогично. Увеличение доли ТАГ обнаружено у хлореллы, элодеи и в большинстве случаев у ряски при всех его концентрациях в среде. Доля ДАГ при этом снижа-



9. Содержание незатерифицированных жирных кислот в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии дизельного топлива (на 14-е сутки), $M \pm m$, $n = 3$.

лась в 1,5—2,0 раза, ФЛ — возрастала в 5—8 раз (особенно существенно у хлореллы), а НЭЖК — уменьшалась.

Таким образом, при воздействии всех исследованных токсикантов независимо от продолжительности воздействия и концентрации у водных растений, наблюдалась общая тенденция к накоплению в мембранах ТАГ и ФЛ, которые, очевидно, имеют большое адаптивное значение для защиты клеток. Это согласуется с данными других исследований [42], в которых показано, что ТАГ и ФЛ стабилизируют структурно-функциональное состояние мембран клеток водорослей в ответ на воздействие неблагоприятного фактора. Очевидно, что сдвиг относительного содержания липидов в сторону этих классов также сопряжен с формированием двойной концентрической мембранной системы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки исследованных водных растений реагируют на повреждающее воздействие тяжелых металлов и нефтепродуктов интенсификацией синтеза основных адаптивных липидов. Наши выводы согласуются с данными работы [40], в которой показано, что водные растения, произрастающие в условиях повышенного содержания металлов в среде, характеризуются повторной структуризацией клеточного метаболизма с целью поддержания клеточных структур, обеспечивающих функционирование пигментного аппарата и фотосинтеза за счет изменения содержания липидов, коррелирующего с уровнем токсичности металлов. Согласно нашим данным это сопряжено с образованием двойной концентрической мембранной системы [8]. Наиболее четко это выражено у водных растений, выращенных в присутствии ионов свинца и ДТ, что сопровождается большим увеличением содержания липидов и утолщением клеточной мембраны. Такое адаптивное изменение мембранных липидов в ответ на повышение токсичности среды является обычным для многих растений [42] и представляет собой компенсаторный механизм, направленный на поддержание структурно-функциональной целостности мембран [35]. По-видимому, в начале воздействия липидные перестройки можно рассматривать как первичный ответ мембран на стресс, а в дальнейшем они сопря-

Соотношение содержания ТАГ : ДАГ : ФЛ : НЭЖК у водных растений при воздействии токсикантов, %

Токсиканты	Продолжительность воздействия, сутки	ПДК	Хлорелла	Элодея	Ряска
Контроль		—	39 : 31 : 2 : 27	42 : 27 : 3 : 28	42 : 29 : 3 : 26
Zn ²⁺	1	1	51 : 23 : 2 : 24	52 : 23 : 2 : 23	45 : 26 : 5 : 24
		5	46 : 30 : 2 : 22	53 : 24 : 1 : 22	47 : 25 : 6 : 22
	3	1	52 : 28 : 2 : 18	45 : 27 : 2 : 26	45 : 27 : 4 : 24
		5	48 : 30 : 2 : 20	51 : 25 : 2 : 22	38 : 28 : 6 : 28
	7	1	44 : 30 : 2 : 24	55 : 22 : 3 : 20	40 : 26 : 7 : 27
		5	44 : 31 : 2 : 23	52 : 23 : 4 : 21	39 : 25 : 8 : 28
Pb ²⁺	14	1	46 : 25 : 2 : 27	47 : 27 : 2 : 24	47 : 25 : 3 : 25
		5	51 : 25 : 2 : 22	50 : 24 : 2 : 24	45 : 27 : 3 : 25
	1	1	38 : 26 : 15 : 21	58 : 16 : 8 : 18	43 : 29 : 3 : 25
		5	30 : 21 : 28 : 21	58 : 16 : 8 : 18	44 : 30 : 4 : 22
	3	1	37 : 21 : 25 : 17	50 : 21 : 9 : 20	38 : 27 : 9 : 26
		5	36 : 20 : 26 : 18	49 : 18 : 11 : 22	41 : 24 : 10 : 25
7	1	33 : 22 : 23 : 22	52 : 17 : 8 : 23	40 : 26 : 9 : 25	
	5	33 : 17 : 29 : 21	50 : 18 : 9 : 23	42 : 24 : 9 : 25	
ДТ	14	1	40 : 20 : 22 : 18	47 : 22 : 8 : 23	43 : 24 : 9 : 24
		5	39 : 22 : 22 : 17	47 : 22 : 8 : 23	43 : 25 : 9 : 23
	14	1	53 : 15 : 10 : 22	50 : 23 : 12 : 15	49 : 17 : 14 : 20
		5	49 : 20 : 15 : 16	58 : 17 : 8 : 17	48 : 20 : 14 : 18
	10	46 : 23 : 16 : 15	46 : 17 : 13 : 24	46 : 18 : 12 : 24	
		49 : 20 : 13 : 18	49 : 20 : 12 : 19	52 : 18 : 12 : 18	
30	52 : 15 : 13 : 20	53 : 18 : 10 : 19	51 : 15 : 14 : 20		

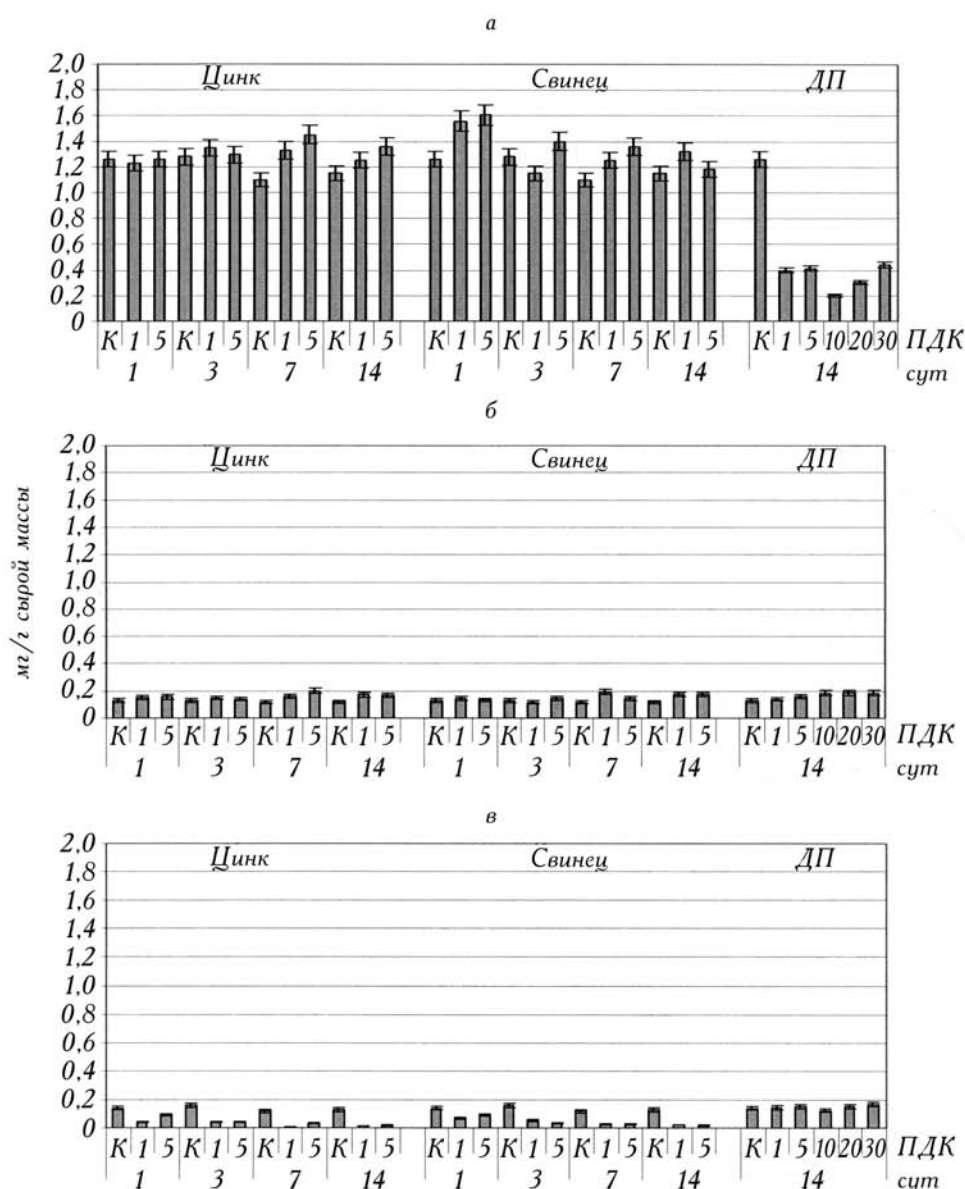
Примечание. Исследованные показатели в контроле не изменялись на протяжении всего эксперимента, поэтому приведены их средние значения.

жены с образованием вторичных концентрических мембран, с формированием которых может быть связано более длительное сохранение способности к поддержанию адаптационного потенциала клеток.

Поскольку повышение содержания ФЛ, ТАГ, ДАГ и НЭЖК, изменение их соотношения и образование вторичной концентрической мембраны наблюдается при самых разнообразных воздействиях внешней среды, оно является, по-видимому, универсальной реакцией водных растений. Наиболее четко оно выражено у объекта, характеризующегося наибольшей устойчи-

востью — хлореллы, у которой интенсивность синтеза липидов при токсическом воздействии значительно выше, чем у ряски и элодеи. Кроме липидов, стабильность мембран определяется также белками. Наши исследования позволяют предположить, что индуцированные токсикантами перестройки мембран реализуются не только за счет липидов, но и белков (рис. 10).

Ионы цинка у хлореллы способствовали накоплению белков на протяжении семи суток воздействия, особенно в концентрации 5 ПДК. Стимулиру-



10. Содержание белков в мембранах клеток хлореллы (а), элодеи (б) и ряски (в) при воздействии цинка, свинца и дизельного топлива, $M \pm m$, $n = 3$.

ющий эффект воздействия свинца, как и в случае липидов, проявлялся уже на первые сутки токсического влияния. ДТ, особенно при 10 ПДК, снижало содержание белков в мембранах клеток хлореллы в три раза по сравнению с контролем, что противоположно закономерности изменения содержания липидов. Следовательно, поверхностно-активный эффект ДТ способствует потере мембранами белков, возможно за счет их уплотнения и предполагаемого уменьшения взаимосвязи с липидами, которые ДТ может растворять [2, 19, 25].

У элодеи и ряски содержание белков в мембранах как в контроле, так и в токсических условиях значительно ниже (в 5—6 раз), чем у хлореллы, в то же время динамика их содержания при воздействии токсикантов аналогична, что свидетельствует об однотипной реакции мембранных белков водных растений на токсические вещества.

Выявленные изменения скорее всего направлены на оптимизацию проницаемости мембран, ионного транспорта и функционирования ферментов [1, 5, 18]. Однако степень накопления белков у водных растений при воздействии металлов намного ниже, чем липидов. По-видимому, это связано не столько с количественными, сколько с их качественными изменениями, а также с тем, что синтез белков более длителен и является энергетически зависимым процессом. Тем не менее, поддержание этого структурного компонента мембран на определенном уровне очевидно имеет большое адаптивное значение.

Обращают на себя внимание некоторые различия в динамике изменения количества белков и липидов. При увеличении содержания липидов количество белков либо вообще не увеличивается, либо оно ниже, чем в контроле, и наоборот. Это согласуется с данными о том, что при возобновлении роста богатых запасным жиром растительных клеток эти запасы под воздействием трансацилаз, липаз и других ферментов быстро мобилизуются и превращаются в подвижные сахара, которые используются как для биосинтеза белков при построении биологических мембран, так и для создания энергетического фонда АТФ в процессе окислительного фосфорилирования [6]. Кроме того, поскольку структурные изменения в мембранах под влиянием неблагоприятных воздействий касаются и освобождения из связанного состояния ионов Ca^{2+} , образующего мостики между карбоксильными группами белков и полярными головками фосфолипидов, то их разрыв способствует высвобождению веществ из мембран и их отдельному метаболизму [32]. Накопление белков мембран может быть также не столько следствием их активного синтеза, сколько результатом торможения разрушения, связанного с ингибированием активности ферментов расщепления белков — протеиназ. Роль ингибиторов протеиназ могут играть такие стрессовые метаболиты, как полиамины, которые обычно накапливаются у растений в неблагоприятных условиях среды [32]. Все это свидетельствует о том, что адаптивные перестройки в мембранах клеток индивидуальны и специфичны, они осуществляются согласно принципам максимальной эффективности и экономии пластических и энергетических ресурсов [7, 30].

Таким образом, в образовании системы концентрических мембран, кроме липидов, задействованы и белки. Прежде всего они могут осуществлять регуляцию конформационных изменений мембран [36]. С ними могут быть связаны также межфазовые липид-белковые перестройки, в значительной степени обеспечивающие интенсивность метаболизма клетки и контроль за ним. В литературе имеются сведения о бóльшей стабильности белкового комплекса мембран растений, которая обеспечивает, вероятно, поддержание структуры макромолекул в состоянии определенной конформационной гибкости даже в токсических условиях [3, 14, 16, 22]. Высказано предположение, что в основе формирования двойной концентрической мембраны лежит гиперплазия эндоплазматического ретикулула (гладкого или шероховатого), то есть увеличение его количества может сопровождаться образованием концентрических структур, которые в световом микроскопе часто видны как участки эозинофильной цитоплазмы [27]. Показано, что в структурах, сформированных гладким эндоплазматическим ретикулулом, увеличивается число энзимов, ответственных за детоксикацию. Выдвинута эндо-мембранная концепция, согласно которой мембраны — динамические, подвижные структуры, постоянно изменяющие свою форму и площадь. Кроме того, внутренние мембраны цитоплазмы (за исключением мембран митохондрий и пластид) представляют собой единое целое и происходят от эндоплазматического ретикулула. Новые цистерны диктиосом образуются из эндоплазматического ретикулула через стадию промежуточных пузырьков, а секреторные пузырьки, отделяющиеся от диктиосом, в конечном итоге способствуют формированию плазматической мембраны, что наблюдалось в нашем исследовании [8]. Переход мембран из одного компонента в другой получил название тока мембран (*membrane flow*), который обеспечивает функциональную непрерывность и целостность мембранной системы [13]. Таким образом, указанное явление свидетельствует об участии гладкого эндоплазматического ретикулула в процессах детоксикации, что соотносится с моделью нашего исследования, однако требует более детального изучения.

Заключение

Как показали результаты наших предыдущих работ [8], ионы цинка, свинца и дизельное топливо индуцируют образование вторичных концентрических мембран в клетках водных растений, что подтверждает общебиологическую природу обнаруженного эффекта, так как он наблюдается у широкого круга объектов (хлореллы, элодеи, ряски) при воздействии различных токсикантов.

Результаты наших последующих экспериментов свидетельствует о том, что уникальный эффект образования вторичной концентрической мембраны влечет за собой каскад изменений ее структуры и состава и, скорее всего, обмена веществ в клетке. Образование вторичных концентрических мембран связано прежде всего с синтезом их основных компонентов — липидов (особенно триацилглицеролов и фосфолипидов) и белков.

Таким образом, реакции клетки на воздействие токсикантов в значительной мере сводятся к изменениям в ее мембранных образованиях, что является первичным компенсаторно-защитным адаптивным механизмом. Вместе с тем в этой проблеме целый ряд вопросов остается открытым, поэтому необходимы исследова-

дования функциональных характеристик видоизмененных мембран и биохимических механизмов их обеспечения.

**

У статті наведено дані про вплив іонів цинку та свинцю і дизельного палива водного середовища на мембраногенез в клітинах водяних рослин — хлорели, елодеї та ряски. Вперше описано зв'язок утворення вторинних концентричних мембран із змінами вмісту ліпідів і білків.

**

The article shows data on effects of toxic factors of the aquatic environment on plasma membranes of freshwater plants and their role in the processes of adaptation. The correlation of formation of secondary concentric membranes with changes of lipids and proteins content is described for the first time.

**

1. Антонов В.Ф. Мембранный транспорт // Соросов. образоват. журн. — 1997. — № 6. — С. 4—12.
2. Биологические аспекты нефтяного загрязнения морской среды / Под ред. О. Г. Миронова. — Киев: Наук. думка, 1988. — 246 с.
3. Блехман Г.И., Шеламова Н.А. Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Успехи совр. биологии. — 1992. — Т. 112, вып. 2. — С. 281—297.
4. Богнар О.І. Адаптивні властивості водорослей за дії іонів металів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2008. — 22 с.
5. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. — М.: Изд-во Москов. ун-та, 1985. — 207 с.
6. Верещагин А. Г. Биохимия триглицеридов. — М.: Наука, 1972. — 307 с.
7. Грубинко В.В. Каскадный принцип организации биохимической адаптации у рыб: шкала времени, интенсивности, специфичности // Экол. физиол. и биохимия рыб. — Ярославль: Изд-во РАН, 2000. — Т. 1. — С. 71.
8. 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.
9. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. Т. 1 / Под ред. В. Л. Кретовича. — М.: Мир, 1986. — 392 с.
10. Давыдова С.Л., Тагасов В.И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века: Учебн. пос. — М., 2002. — 140 с.
11. Дятловицкая Э.В., Безуглов В.В. Липиды как биоэффекторы. Введение // Биохимия. — 1998. — Т. 63, вып. 1. — С. 3—5.
12. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
13. Кирпотин С.Н. Ботаника: морфология и анатомия растений. Плазмалемма: <http://www.ou.tsu.ru/hischool/botanika/gl3.html> # 1.
14. Колупаєв Ю.Є. Стресові реакції рослин. Молекулярно-клітинний рівень. — Харків: Вид-во Харків. держ. ун-ту, 2001. — 172 с.

15. Копытов Ю.П. Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов // Экология моря. — 1983. — Вып. 12. — С. 76—80.
16. Косаківська І.В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. — Київ: Сталь, 2003. — 191 с.
17. Костюк К.В., Богнар О.І., Грубінко В.В. Вплив іонів Zn^{2+} та Pb^{2+} на активність АТФ-аз у одноклітинної водорості *Desmodesmus communis* (*Scenedesmus quadricauda*) Brev. // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2008. — Вип. 2 (36). — С. 143—148.
18. Кравцов А.В., Алексенко И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. — Киев: Наук. думка, 1990. — 176 с.
19. Кравцов А.В., Алексеенко И.Р. Поверхностно-активные вещества как инструменты исследования биомембран. — Киев: Наук. думка, 1993. — 262 с.
20. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 144 с.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
22. Маргулис Б.А., Бухова И.В. Белки стресса в эукариотической клетке // Цитология. — 2000. — Т. 42, № 4. — С. 323—342.
23. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Под ред. А.В. Топачевского. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
24. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. — М.: Мир, 1980. — Т. 2. — 609 с.
25. Михайлова Л.В. Особенности поведения водорастворимой фракции нефти в модельных опытах // Вод. ресурсы. — 1986. — № 2. — С.125—134.
26. Мосин О.В. О феномене клеточной адаптации к тяжелой воде. — 2007. — 7 с.: www.gaudeamus.omskcity.com/.../Mosin.
27. Патологическая анатомия и физиология / Ультраструктурная патология клетки: <http://www.nedug.ru/library/doc.aspx?item=34099>.
28. Прохорова М.И. Методы биохимического исследования. — Л.: Изд-во Ленингр. гос. ун-та, 1982. — 222 с.
29. Тяжелые металлы как фактор экологической опасности: Метод. указ. / Сост. Ю.А. Холопов. — Самара: СамГАПС, 2003. — 16 с.
30. Уголев А. М. Принципы организации и эволюции биологических систем // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1989. — Т. 25, № 2. — С. 215—233.
31. Финглей Дж., Эванз У. Биологические мембраны. Методы. — М.: Мир, 1990. — 423 с.
32. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросов. образоват. журн. — 1997. — № 9. — С. 12—17.
33. Чиркова Т.В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1988. — 244 с.
34. Abbas C.A., Card G.L. The relationship between growth temperature, fatty acid composition and the physical state and fluidity of membrane lipids in *Yersinia enterocolitica* // Biochim. Biophys. Acta. — 1980. — Vol. 602, N 3. — P. 469—476.

35. *Beney L., Gervais P.* Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2001. — Vol. 57, N 1—2. — P. 34—42.
36. *Epand R.* Lipid polymorphism and protein-lipid interactions // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 1376, N 3. — P. 353—368.
37. *Lewis R.N., McElhaney R.N.* Surface charge markedly attenuates the nonlamellar phase-forming properties of lipid bilayer membranes: calorimetric and ³¹P-nuclear magnetic resonance studies of mixtures of cationic, anionic, and zwitterionic lipids // *Biophys. J.* — 2000. — Vol. 79, N 3. — P. 1455—1464.
38. *Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, N 1. — P. 265—275.
39. *Revels J.P., Ito S., Fawcett D.W.* Electron micrographs of myelin figures of phospholipide simulating intracellular membranes // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* — 1958. — Vol. 4, N 4. — P. 495—501.
40. *Rozentsvet O.A., Bosenko E.S., Guschina I.A.* Effect of heavy metals upon lipid metabolism in *P. perfoliatus* / 16th Intern. Plant Lipid symp. Budapest, Hungary, 1—4 June 2004. — Budapest, 2004. — P. 202—204.
41. *Schmid K.M., Ohlrogge J.B.* Lipid metabolism in plants / *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* / Ed. by D.E. Vance, J.E. Vance. — 4th Edition. — Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2002. — P. 93—126.
42. *Seddon J.M., Templer R.H.* Polymorphism of lipid-water systems // *Structure and dynamics of membranes* / Ed. by R. Lipowsky, E. Sackmann. — Incl. in ser.: *Handbook of biological physics.* — Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1995. — Vol. 1. — P. 97—160.
43. *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, N 3. — P. 157—168.
44. *Vaskovsky V.E., Kastetsky E.Y., Vasendin I.M.* A universal reagent for phospholipids analysis // *J. Chromatography A.* — 1975. — Vol. 114, N 1. — P. 129—141.
45. *Vigh L., Horváth I., Thompson G.A.* Recovery of *Dunaliella salina* cells following hydrogenation of lipids in specific membranes by a homogeneous palladium catalyst // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1988. — Vol. 937, N 1. — P. 42—50.
46. *Wang L., Zhou Q., Chua H.* Contribution of cell outer membrane and inner membrane to Cu²⁺ adsorption by cell envelope of *Pseudomonas putida* 5-x // *J. Environ. Science and Health, Part A.* — 2004. — Vol. 39, N 8. — P. 2071—2080.
47. *Wettern M., Lorch D., Weber A.* The effect of lead and manganese on the green alga *Pediastrum tetras* in axenic culture. I. Accumulation rates and influence on growth // *Arch. Hydrobiol.* — 1988. — Vol. 77, N 3. — P. 267—276.