

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 576.8

К. О. Овнаниян¹, Л. А. Навасардян², М. К. Овнаниян¹,
член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян²

Ультроструктурный анализ образования волютин-ацидокальцисом у некоторых видов бактерий, спирохет, дрожжей и простейших при морфогенезе клетки и действии различных внешних факторов

(Представлено 29/VII 2011)

Ключевые слова: *волютин-ацидокальцисомы; бактерии, спирохеты, дрожжи, простейшие; электронная микроскопия; морфогенез; ионизирующие излучения; антибиотики*

Способность бактерий, одноклеточных зеленых водорослей, дрожжей и простейших образовывать волютин-ацидокальцисомы, которые представляют собой структуры многофункциональных полимеров, богатых полифосфатами в комплексе с кальцием и другими катионами [1-4], представляет большой интерес и может найти широкое применение. Показано, что волютин-ацидокальцисомы принимают участие в функционировании клеточной стенки, цитоплазматической мембраны этих клеток [5,6]; они играют также важную роль в клеточной осморегуляции, в сократительных комплексах [7]. Однако их организация в клетке и изменение при действии различных внешних факторов, приводящих к патологическим изменениям, нуждается в дальнейшем изучении. Необходимо определить их связь с протекторными механизмами клетки. В этом отношении примечательно их сходство с лизосомами клеток млекопитающих [8]. Все это делает волютин-ацидокальцисомы важными универсальными структурами для изучения механизмов

действия внешних стресс-факторов, и, в частности, ионизирующего излучения, на прокариоты и эукариотические одноклеточные организмы [9,10].

Целью работы явилось выяснение ультраструктурной организации волютиновых гранул в клеточной архитектонике некоторых видов бактерий, спирохет, дрожжей и простейших при морфогенезе клетки и при действии различных внешних факторов, приводящих к патологическим изменениям.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использованы условнопатогенные и патогенные штаммы бактерий *Salmonella typhi*, штамм 199; *Salmonella typhimurium*, штамм 546; неидентифицированные бактерии *Corynebacteriae*, *Leptospira pomona*, штамм Patos I; дрожжи *Candida guilliermondii* NP-4; паразитические и свободноживущие виды простейших *Entamoeba histolytica*, штамм В; *Entamoeba moshkovskii*, штамм Ер и *Leishmania hertigi*, штамм РП, а также биоптаты слизистой желудочно-кишечного тракта больных – носителей *Helicobacter pylori*. Из физических факторов использованы α -ионизирующее (мощность летальной дозы LD₁₀₀ 1000 Гр) и рентгеновское (мощность дозы LD₅₀ 270 Гр) излучения. В некоторых исследованиях применяли бактериостатические дозы антибиотиков пенициллинового ряда – ампициллин (4000 ед/мл).

Электронная микроскопия. Биообразцы для микроскопирования (клеточные суспензии бактерий, дрожжей и простейших, а также биоптаты желудочно-кишечного тракта) отделяли после центрифугирования при малых скоростях в течение 20 мин, фиксировали с помощью 2.5% глутарового альдегида на 0.1 М какодилатном буфере при рН 7.4 в течение 2 ч. После трехкратного промывания в какодилатном буфере последующую фиксацию проводили с помощью 1% четырехокси осмия на 0.1 М какодилатном буфере при рН 7.4 в течение не менее 1 ч. После промывки в том же буфере обезвоживание биообразцов проводили этанолом или ацетоном возрастающей концентрации (30, 50, 70, 96 и 100%), с последующей пропиткой и заливкой смесью аралдита по Лафту [11]. После полимеризации при температурах 37 и 59⁰С получали ультратонкие срезы на ультрамикротоме «Reichert-Jung» (Австрия); ультратонкие криосрезы получали на ультрамикротоме «LKB-kryokit» (Швеция). Затем ультратонкие срезы окрашивали водным раствором 3% уксуснокислого уранила, а также лимоннокислым свинцом по Рейнолдсу – Венаблу [12] и изучали в просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) «Tesla-500» (Чехия). Для изучения целых клеток бактерий был

использован метод негативного контрастирования 2% фосфорновольфрамовой кислотой или молибденатом аммоний рН 6.4.

Микрофотографии сканировали в разрешении 900 пикселей за дюйм и обрабатывали по компьютерным программам «*Corel Draw*» (версия 11) и «*Photoshop*» (версия 8). Морфометрические показатели определяли с помощью программы «Видео-Тест, 5-Структура, нанотехнология». Следует заметить, что электронная микроскопия с помощью ПЭМ позволяет достаточно четко идентифицировать различные структуры в цитоплазме микроорганизмов [13].

Результаты и обсуждение. *Образование волютин-ацидокальцисом у некоторых видов бактерий и спирохет.* Исследование *Corynebacteriae*, *S. typhi*, *L.pomona* (рис.1,а – в, 2, а, б) с помощью ПЭМ показало, что электронноплотные полифосфатные волютиновые гранулы чаще встречаются в стационарной фазе и фазе гибели бактериальных культур. Наличие волютиновых гранул и их полюсное расположение в бактериальной клетке *Corynebacteriae* в отличие от других бактерий может служить отличительным признаком (рис. 1, а), когда образование волютиновых гранул, по-видимому, детерминировано генетически [14].

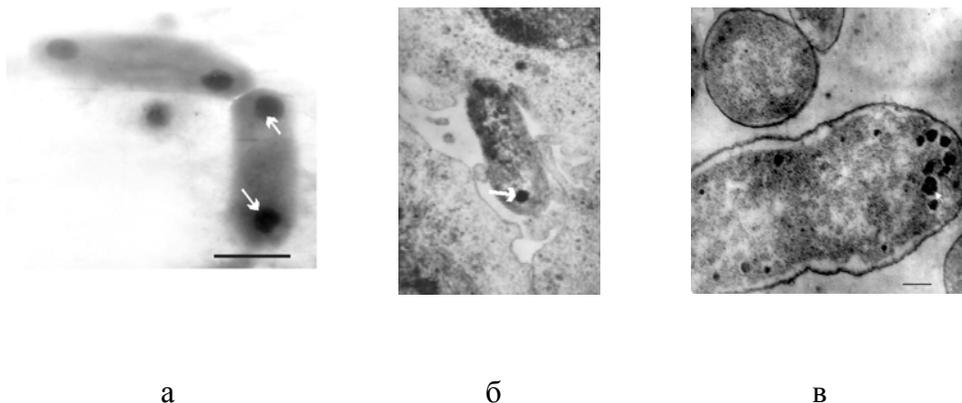
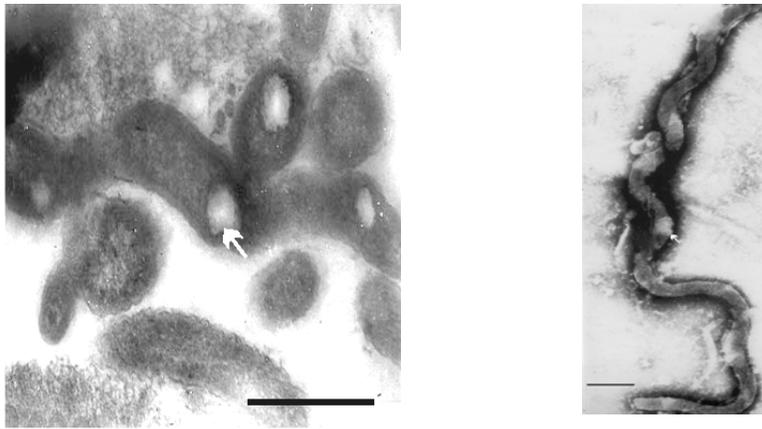


Рис. 1. ПЭМ: а – негативное контрастирование неидентифицированных бактерий из *Corynebacteriae*. Волютиновые гранулы (→) в полюсах бактериальной клетки. Масштаб отмечен в 0.5 микрона; б – ультратонкий срез *S. typhimurium*, штамм 549 при взаимодействии с перитонеальными макрофагами белых мышей. Волютиновая гранула (→) в цитоплазме. Масштаб отмечен в 0.25 микрона; в – ультратонкий срез *S. Typhi*, штамм 199 под действием ампициллина. Волютиновые гранулы (→) в цитоплазме. Масштаб отмечен в 0.25 микрона.

Нами установлено образование цитоплазматической волютиновой гранулы в клетке *S. typhimurium* при взаимодействии с перитонеальными макрофагами белых беспородных мышей (рис.1, б). У *S. typhi* при действии ампициллином (рис. 1, в), наряду с изменением клеточной стенки, под цитоплазматической мембраной выявлены скопления волютина,

что подтверждает возможность волютинообразования у бактерий под действием различных внешних стресс-факторов [16].

Нами обнаружены волютиновые вакуоли у *H. pylori* в биоптатах слизистой оболочки желудка больного *in vivo* (рис. 2, а). Это происходит, по-видимому, под действием пучков электронов в ПЭМ или в процессе подготовки препаратов биоптатов, что приводит к образованию электроннопрозрачных вакуолей на месте локализации волютиновых гранул. Полученные результаты сопоставимы с данными об ультраструктурной организации полифосфатов в виде волютиновых гранул в цитоплазме *H. pylori*, показанными ранее в условиях *in vitro* [15]. Волютиновые гранулы различной величины обнаружены и в цитоплазме культуры спирохет *L. potona* (рис. 2, б).



а

б

Рис.2. ПЭМ: а – ультратонкий срез *H. pylori* в биоптате слизистой желудка больного. Волютиновые вакуоли (→) в клетке. Масштаб отмечен в 0.5 микрона; б – негативное контрастирование *L. potona*, штамм Patos I. Видна гранула волютина (→) в цитоплазме. Масштаб отмечен в 0.2 микрона.

Образование волютин-ацидокальцисом у некоторых видов дрожжей и простейших. На ультратонких срезах клеток дрожжей *S. guilliermondii* НП-4 обнаружена аморфная слоистая клеточная стенка с плотно прилегающей к ней цитоплазматической мембраной, а также гранулярная плотная цитоплазма, где просматриваются матрикс митохондрии и цитоплазматические вакуоли такой же консистенции. Такая ультраструктурная организация клеток дрожжей подтверждает полученные ранее данные [17] и позволяет идентифицировать изменения, возникающие при действии различных внешних факторов. Так, после рентгеновского облучения культур этих дрожжей удалось обнаружить увеличение размеров (до 250-400 нм) и количества электронноплотных волютиновых гранул (рис.3, а). После 24-

часовой инкубации встречаются клетки, находящиеся в процессе восстановления клеточных компартаментов, которые по характеру ультраструктурных показателей напоминают интактные клетки в контрольной культуре, не подвергшейся облучению. Здесь четко отмечается раздробление больших волютиновых гранул на мелкие частицы и их уменьшение в цитоплазме (рис. 3, б). Вместе с тем установлена различная электронноплотность в волютиновых гранулах, что может свидетельствовать о репарационных процессах.

Следует заметить, что волютиновые гранулы располагаются в вакуолях *C. guilliermondii*, окруженных мембраной (см. рис. 3, а) по своему строению, скорее всего, напоминают флуктуационные вакуоли с гранулами волютина, описанными у других дрожжей и простейших, которые играют регулируемую роль во время действия стресс-факторов [18,19].

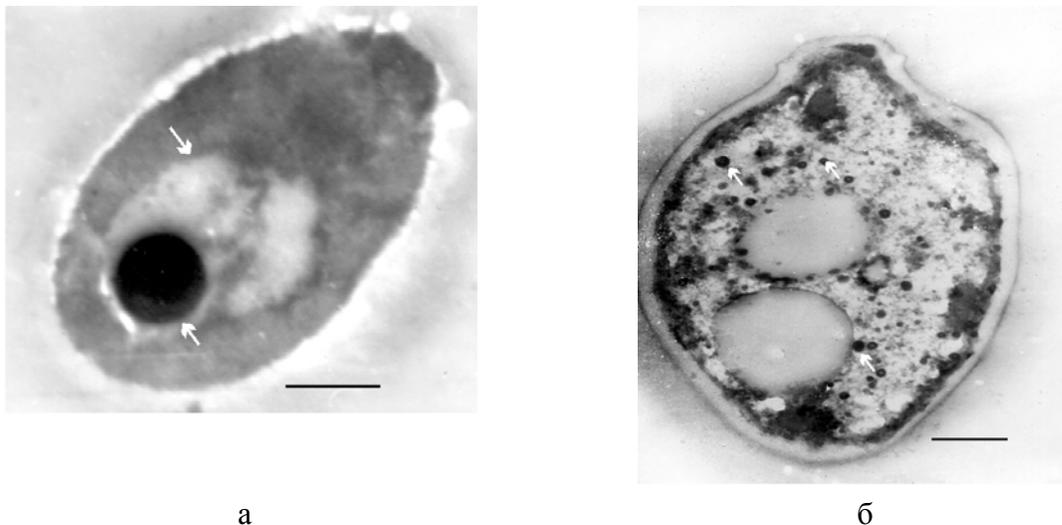


Рис. 3. ПЭМ: ультратонкий срез *C. guilliermondii* NP-4 после рентгеновского облучения. Волютиновая гранула (→) в вакуоли. Масштаб отмечен в 0.25 микрона; б – ультратонкий срез *C. guilliermondii* NP-4 после 24-часового рентгеновского облучения. Волютиновые мелкие гранулы (→), рассеянные по всей цитоплазме. Масштаб отмечен в 0.25 микрона.

Исследование ультратонких криосрезов и стандартных ультратонких срезов культур простейших *Ent. histolytica*, *Ent. moshkovskii* и *L. hertrigi* с помощью ПЭМ (рис. 4, а – г) подтвердило наличие электронноплотных волютиновых гранул в цитоплазме изученных простейших размером в 0.5 микрона в диаметре. Видны также волютиновые гранулы в виде электроннопрозрачных сферических пятен (рис. 4, а). В ядрах отдельных особей цист и трофозоитов установлено наличие электронноплотных скоплений волютин-ацидокальцисом (рис. 4, б).

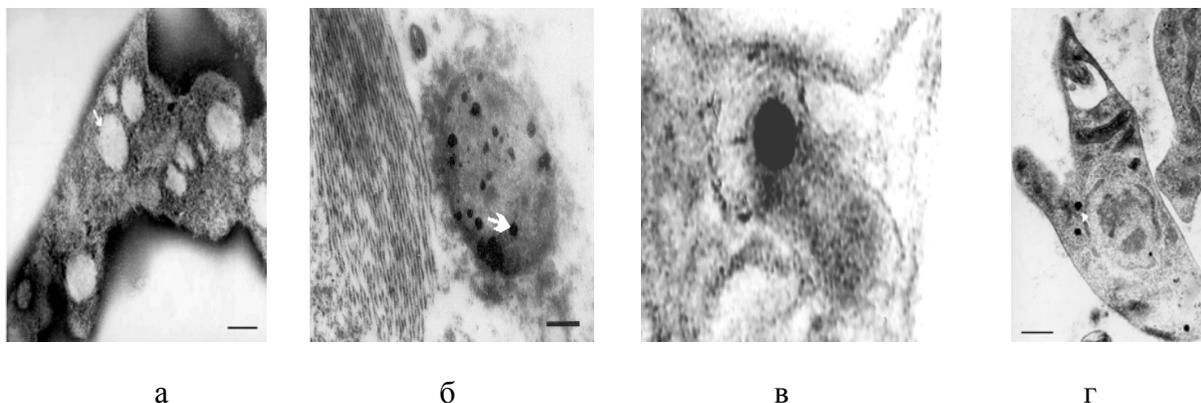


Рис. 4. ПЭМ: а – ультратонкий криосрез *Ent. istolytica*, штамм БВ. Гранулы волютина (→) в цитоплазме трофозоида. Масштаб отмечен в 0.5 микрона; б – ультратонкий срез *Ent. histolytica*, штамм БВ. Гранулы волютин-ацидокальцисом (→) в ядре цисты энтамеб. Масштаб отмечен в 0.5 микрона; в – ультратонкий срез вирусоподобного симбионта *Ent. moshkovskii*, штамм Ер. Волютин-ацидокальцисомовая гранула (→) под оболочкой симбионта. Масштаб отмечен в 35 нм; г: ультратонкий срез *L. hertigi*. Волютиновые гранулы (→) в цитоплазме. Масштаб отмечен в 0.5 микрона.

Электронномикроскопическим и морфометрическим анализом нами ранее был установлен полный лизис клетки энтамеб после действия летальной дозы γ -ионизирующего излучения (1000 Гр) у *Ent. moshkovskii* [13]. На ультратонких срезах на фоне клеточного детрита выделялись вирусоподобные структуры, у которых прослеживался выход электронноплотных гранул из нуклеоида с диаметром 35 нм и общей площадью 11036 нм² (рис. 4, в) и которые напоминали волютин-ацидокальцисомные образования одноклеточных эукариот после действия стресс-фактора [20].

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о возможности существования некоторого механизма образования волютин-ацидокальцисом при \square -ионизирующем облучении, которые в зависимости от компартиментации клетки могут играть цитопротекторную роль.

Заключение. Таким образом, в результате комплексных электронномикроскопических исследований морфогенеза некоторых видов бактерий, спирохет, дрожжей и простейших установлено образование волютин-ацидокальцисом, а при действии ионизирующего рентгеновского и \square -излучения, а также некоторых антибиотиков определены изменения их морфометрических и оптических показателей. Электронномикроскопическая идентификация изменений волютиновых гранул в структурной организации клеток бактерий, спирохет,

дрожжей и простейших может служить удобным экспресс-методом визуальной оценки поражения и восстановительно-компенсаторных процессов при действии различных внешних стресс-факторов.

¹Институт молекулярной биологии НАН РА

²Ереванский государственный университет

**К. О. Овнян, Л. А. Навасардян, М. К. Овнян,
член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян**

Ультраструктурный анализ образования волютин-ацидокальцисом у некоторых видов бактерий, спирохет, дрожжей и простейших при морфогенезе клетки и действии различных внешних факторов

Выяснена ультраструктурная организация волютиновых гранул в клеточной архитектонике некоторых видов бактерий, спирохет, дрожжей и простейших при морфогенезе клетки и действии различных внешних факторов, приводящих к патологическим изменениям.

В результате комплексных электронномикроскопических исследований морфогенеза некоторых видов указанных прокариот и эукариотических организмов установлено образование волютин-ацидокальцисом, а при действии ионизирующего рентгеновского и α -излучения, а также некоторых антибиотиков определены изменения их морфометрических и оптических показателей.

Электронномикроскопическая идентификация изменений волютиновых гранул в структурной организации клеток бактерий, спирохет, дрожжей и простейших может служить удобным экспресс-методом визуальной оценки поражения и восстановительно-компенсаторных процессов при действии различных внешних стресс-факторов.

**Վ. Օ. Հովնանյան, Լ. Հ. Նավասարդյան, Մ. Կ. Հովնանյան,
ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Ա. Հ. Թռչունյան**

Մանրէների, սպիրոխիտների, խմորասնկերի և նախակենդանիների որոշ տեսակների վոլյուտին-թթվակալցիտում գոյացությունների մորֆոգենեզի և արտաքին տարբեր գործոնների ազդեցության ուլտրակառուցվածքային վերլուծությունը

Պարզվել է մանրէների, սպիրոխիտների, խմորասնկերի և նախակենդանիների որոշ տեսակների կազմաձևության և ախտաբանական փոփոխություններ առաջացնող արտաքին

միջավայրի տարբեր գործոնների ազդեցության տակ բջջային ճարտակերտությունում վոլյուտինային մանրահատիկների ուլտրակառուցվածքային կազմակերտումը:

Նշված որոշ պրոկարիոտների և էուկարիոտ օրգանիզմների մոթոգենեզի էլեկտրոնա-մանրադիտակային համալիր ուսումնասիրությունների արդյունքում բացահայտվեցին վոլյուտին-թթվակալցիտոմ գոյացություններ, իսկ ռենտգենյան և γ -իոնիզացնող ճառագայթման, ինչպես նաև որոշ հակաբիոտիկների ազդեցության դեպքում որոշված են դրանց մեջ առաջացած փոփոխությունների ձևաչափական և օպտիկական ցուցանիշները:

Մանրէների, սպիրոխետների, խմորասնկերի և նախակենդանիների կառուցվածքային ճարտակազմությունում վոլյուտինային մանրահատիկների փոփոխությունների էլեկտրոնա-մանրադիտակային նույնականացումը կարող է ծառայել որպես էքսպրես-եղանակ արտաքին միջավայրի սթրես գործոնների ինչպես ապակառուցվածքային, այնպես էլ վերականգնողական-վերակառուցողական գործընթացների դեպքում:

**K. O. Hovnanyan, L. A. Navasardyan, M. K. Hovnanyan,
corresponding member of NAS RA A. A. Trchounian**

Ultrastructural Analysis of Volutin-Acidocalciumosomes Formation in Some Species of Bacteria, Spirochetes, Yeast and Protozoa during Morphogenesis and under Environment Different Factors Action

Ultrastructure organization of volutin granules in some species of bacteria, spirochetes, yeast and protozoa cellular architecture was studied during morphogenesis and under environment different factors action leading to pathological changes.

As the result of complex electron microscopic studies of morphogenesis in some species of prokaryotes and eukaryotic organisms the formation of new structures of volutin-acidocalciumosomes has been established within cell cytoplasm. In addition, under the ionizing roentgen and $\square\square$ irradiation as well as some antibiotics action morphometric changes and changes in optical properties were also shown. Electron microscopic identification of volutin granules changes in structural organization in bacteria, spirochetes, yeast and protozoa might serve as appropriate express-method for visual evaluation of damage and reparation processes during environment different stress-factors action.

Литература

1. *Harold F.M.* - Bacteriol. Rev. 1966. V. 16. P. 772-794.

2. *Wood H.G., Clarck J.E.* Ann. Rev. Biochem. 1988. V. 57. P. 253-260.
3. *Goncharova I. V., Gerasimenko L.M., Zavarzin G.A., Ushatinskaya G.T.* - Curr. Microbiology 1993. V. 27. T. 187-190.
4. *Kulaev I.S., Vagabov V.M., Kulakovskaya T.V., Lichko L.P., Andreeva N.A., Trilisenko L.V.* - Biochemistry (Mosc). 2000. V. 65. P. 271-278.
5. *Kulaev I., Kulakovskaya T.*- Ann. Rev. Microbiol., 2000. V. 4. P. 709-734.
6. *Carolina L.A., Medeiros S., Moreira B., Moraes L., Miranda K., de Souza W., Plattner H., Hentschel J., Barrabin H.* - Mol. Biochem. Parasitol. 2005. V. 140. P. 175-182.
7. *Docampo P., Urich P., Moreno S.N.J.* - Phil. Trans. R. Soc. B 2010. V. 365. P. 775-784.
8. *Kumbe K.D., Kornberg A.* - J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 5818-5822.
9. *Петин В.Г., Морозов И.И., Кабакова Н.М., Горшкова Т.А.*- Радиц. биол. 2003. Т. 43. С. 176-178.
10. *Fraikin G.Y., Pospelov M.E., Rubin L.B.*- Photochem. Photobiol. 1977. V. 26. P. 371-375.
11. *Luft J. H.* In: Proceedings of the 26th Annual Meeting of the Electron Microscopic Society of America, (Edited by C.J. Arceneauh), Baton Rouge, Claitor's Publishing Division, 1968. P. 38-39
12. *Venable J.H., Coggeshall R.*- J. Cell Biol. 1965. V. 25. P. 407-408.
13. *Овнанян К.О., Давтян А.Г., Саргсян К.А., Трчунян А.А.*- ДНАН Армении. 2010. Т. 110. N 3. С. 277-283.
14. *Pallerla S.R., Knebel S., Polen T., Klauth P., Hollender J., Wendisch V.F., Schoberth S.M.*- FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 124. P. 133-140.
15. *McGrath J.W., Quinn J. P.* - Microbiol. 2000. V. 66. P. 4068-4073.
16. *Bode G., Mauch F., Ditschuneit H., Malfeertheine P.* - J. Gen. Microbiol. 1993. V. 139. P. 3029-3033.
17. *Овнанян К.О., Навасардян Л.А., Акопян А.А., Пепоян А.З.* - Биол. ж. Армении, 2008, Т. 60 (4). С. 67-71.
18. *Shiram K., Yazaki Y., Sakano K., Ohsumi Y.* - Plant. Cell Physiol. 1996. V. 37. P. 1090-1093.
19. *Ruiz F.A., Rodriguez C.O., Docampo R.* - J. Biol. Chem. 2001. V. 327. P. 26114-26121..
20. *Seufferheld M., Vieira M.C.F., Ruiz F.A., Rodrigues C.O., Moreno S.N.J.* - J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 29971-29978.