

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

**Попова Антоніна Федорівна**

УДК 531.5:576.331+58.084

**ГРАВІЧУТЛИВІСТЬ ОДНОКЛІТИННИХ ОРГАНІЗМІВ**

03.00.22 – Клітинна біологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2000

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України.

Науковий консультат – доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України **Кордюм Єлизавета Львівна**, Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України, заступник директора.

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук, професор **Демків Орест Теодорович**, Інститут екології Карпат НАН України, завідувачий відділом;
- доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України **Черевченко Тетяна Михайлівна**, Національний ботанічний сад ім. М.М.Гришка, директор;
- доктор біологічних наук, професор **Сіренко Лідія Якимівна**, Інститут гідробіології НАН України, головний науковий співробітник.

Провідна установа: Інститут фізіології рослин і генетики  
НАН України, м. Київ.

Захист відбудеться "21" вересня 2000 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д. 26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 148.

Автореферат розісланий "21" серпня 2000 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

кандидат

біологічних

наук

Тарасенко Л.В.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ. Не дивлячись на актуальність даної проблеми, дослідження ролі сили тяжіння в еволюції і життєдіяльності організмів були неможливі, оскільки гравітація як один із найважливіших геофізичних факторів, від якого не можна екрануватися, постійно діє на Землі. Лише із запуском першого штучного супутника Землі (ШСЗ) відкрилася унікальна можливість проводити експерименти безпосередньо в умовах космічного польоту і вивчати вплив невагомості та прискорень різних за величиною, які імітують величину та направленість гравітаційного вектора, на життєдіяльність організмів.

Постійне перебування організмів в умовах гравітації сприяло тому, що організми реагують на дію гравітації зміною форми, пози чи характеру руху безпосередньо або з допомогою формування спеціальних рецепторів гравітації різного ступеню складності. У спеціалізованих клітинах вищих рослин останні представлені статолітами різних типів (Hodick, 1996; Brown, 1997; Volkmann, Tevinkel, 1996), які можуть переміщатися у клітині в умовах зміни положення відносно напрямку гравітаційного вектора, включаючи механізми передачі гравітаційного сигналу в місця гравітаційної відповіді (Perbal, 1996).

Зовсім не вивченим залишалось принципове питання про гравічутливість організмів, які не мають спеціалізованих органел для гравісприйняття. Стосовно нерухомих одноклітинних, у яких жодна з клітинних органел не виконує спеціалізованої гравірепторної функції, дані про їх гравічутливість взагалі були відсутні. Однак, інформація про гравічутливість організмів та їх адаптаційні можливості в умовах мікрогравітації є необхідною для розробки космічних біотехнологій, пов'язаних з відбором компонентів автотрофної ланки контрольованих екологічних систем життєзабезпечення людини на космічних літальних апаратах. Причому, в таких системах, поряд з вищими рослинами, одноклітинні рослинні та бактеріальні організми будуть виступати як невід'ємні компоненти фітотрофної ланки (Pechurkin, 1998). Дослідження гравічутливості, зокрема одноклітинних, також є актуальними для пізнання ролі гравітації в розвитку і життєдіяльності організмів, що наближає нас до розкриття механізмів дії гравітації та її сприйняття на клітинному та субклітинному рівнях і закладає теоретичні основи космічних клітинних технологій. Особливо слід підкреслити, що результати біологічних експериментів з використанням одноклітинних організмів мають фундаментальне значення, оскільки вони базуються на оцінках стану цілісного організму, а не окремих його клітин.

Результати попередньо проведених на початку 60-х років експериментів з одноклітинними організмами, які перебували у стані спокою в умовах космічного польоту (Семененко, Владимірова, 1961; 1962; Ваулина и др., 1978; Vulban, 1961), показали

відсутність суттєвого впливу факторів космічного польоту на основні фізіологічні показники одноклітинних, мутаційний процес та репродукцію клітин у післяпольотний період, тому в своїх дослідженнях ми перейшли до експериментів на культурах мікроорганізмів, які знаходилися в умовах мікрогравітації у фізіологічно-активному стані. Розпочаті нами в кінці 70-х років космічні експерименти з фізіологічно-активними культурами одноклітинних (Кордюм и др., 1976; Ваулина и др., 1978; Сытник и др., 1979; Сытник и др., 1983; Попова, Кордюм, 1991) дозволили оцінити ефекти факторів космічного польоту за широким спектром показників, включаючи ростові, структурні та фізіолого-біохімічні характеристики.

ЗВ'ЯЗОК ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ З НАУКОВИМИ ПРОГРАМАМИ, ПЛАНАМИ, ТЕМАМИ. Основу для написання дисертаційної роботи складають дослідження автора, проведені протягом 1974 -1999 рр. Узагальнені в дисертаційній роботі матеріали було отримано в процесі виконання наукових планових досліджень у відділі клітинної біології і анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України за темами:

1. "Розробити методи електронно-мікроскопічного аналізу мікроорганізмів, що відносяться до про- та еукаріот, стосовно до досліджень у приладах типу "ІФС-2", 1974–1976 рр., тема № 52.
2. "Розробити методи електронно-мікроскопічного аналізу мікродоз клітин бактерій та рослинних організмів і провести дослідження матеріалу в штатних та контрольних експериментах", III кв. 1975 р.– IV кв. 1978 р., тема № 62;
3. "Розробити методи контролю ростових і метаболічних процесів у рослинних клітинах при культивуванні в екстремальних умовах і видати рекламації для практичного використання цих методів", III кв. 1977 р. – IV кв.1979 р., тема № 84;
4. "Структурно-функціональна характеристика рослинної клітини в умовах зміни основних геофізичних факторів", 197–1980 рр., тема № 79;
5. "З'ясувати закономірності впливу невагомості на структурно-функціональну організацію рослинної клітини", 1979–1981 рр., тема № 103;
6. "Реакції рослинних клітин і їх адаптаційні можливості в умовах зміни сили тяжіння", 1980–1984 рр. № 8007149;
7. "Клітинні механізми адаптації до основних факторів космічного польоту", 1985-1988 рр., № 01.85.0000554;
8. "Сенсорно-реактивні системи рослинних клітин у процесах клітинного росту і диференціювання в умовах зміни геофізичних факторів і космічного польоту", 1989–1991 рр., № 01.89.0036499;

9. "Біологія клітини в умовах мікрогравітації: методологія діагностування фізіолого-біохімічного та імунологічного стану біологічних систем", 1993–1997 рр., № 0193ИЗ2386, (програма "Космобіологія").

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ. Метою даної роботи є узагальнення закономірностей впливу мікрогравітації та кліностагування на структурно-функціональні показники одноклітинних організмів – бактеріальні і водоростеві клітини, які не мають спеціалізованого гравірецептора; критичний аналіз власних та літературних даних і розробка концепції про гравічутливість про- та еукаріотичних одноклітинних організмів.

Для досягнення вказаної мети були поставлені основні конкретні завдання:

- 1) вивчити вплив факторів космічного польоту на ультраструктуру клітин *Proteus vulgaris*, що розвивалися в аеробних і анаеробних умовах з модифікаторами росту;
- 2) дослідити дію факторів космічного польоту різної тривалості на структурно-функціональну організацію клітин двох видів одноклітинної зеленої водорості *Chlorella*, вирощених як монокультура в авто- та гетеротрофному режимах або в складі полікомпонентних систем;
- 3) вивчити вплив симульованої мікрогравітації (горизонтальне повільне кліностагування) на структурно-функціональні показники клітин двох видів *Chlorella*;
- 4) провести аналіз ультраструктурних та цитохімічних особливостей енергетичних органел клітин *Chlorella* в умовах кліностагування;
- 5) визначити активність ряду ферментів енергетичного та вуглеводного обміну, локалізацію вільного і слабко-зв'язаного кальцію, вміст аденілатів та білку в клітинах *Chlorella* в умовах кліностагування;
- б) розробити концепцію гравічутливості одноклітинних організмів.

НАУКОВА НОВИЗНА ТА ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ. Вперше на основі комплексних досліджень виявлена гравічутливість одноклітинних організмів, яка проявлялася у змінах ростових та ультраструктурних показників в умовах мікрогравітації, що заперечує нуль-гіпотезу Е.Полларда (Pollard, 1966) про неможливість впливу мікрогравітації на бактеріальні клітини внаслідок їх невеликого розміру. Вперше проведено цитологічний аналіз клітин двох видів зеленої водорості *Chlorella* в процесі культивування її в авто- та гетеротрофному режимах як монокультури або у складі полікомпонентних систем у різних за тривалістю експериментах в умовах мікрогравітації. На підставі перебудов ультраструктури та метаболізму клітин встановлена закономірність залежності розмаху спектру та глибини змін субмікроскопічної організації клітин від особливостей об'єкту, попередньо заданих умов експерименту та тривалості культивування одноклітинних

організмів в умовах космічного польоту. В модельних дослідах з використанням горизонтальних кліноставів відмічено суттєву подібність спектру ультраструктурних перебудов клітинних компартментів з тими, що спостерігаються у клітинах *Chlorella* в умовах мікрогравітації, хоча часові характеристики таких перебудов не співпадають. Показано, що як в умовах мікрогравітації, так і симульованої мікрогравітації відбуваються перебудови, перш за все, енергетичних органел клітин *Chlorella*, причому виявляється чітка залежність спектру структурних перебудов від тривалості дії мікрогравітації та кліноставування. Отримано докази щодо посилення функціональної активності енергетичних органел, у першу чергу мітохондрій, на основі одержаних нами даних про їх ультраструктурну організацію, активність ферментів енергетичного обміну – АТФаз, сукцинатдегідрогеназ (СДГ), вміст аденілатів та рівень дихання клітин в умовах кліноставування та мікрогравітації. Вперше встановлено інтенсифікацію гідролізу запасних полісахаридів у хлоропластах клітин *Chlorella* як в умовах космічного польоту, так і кліноставування, що проявлялося у підвищенні активності та розширенні спектру множинних молекулярних форм (ММФ) амілаз за рахунок розчинних, функціонально активніших форм. Вперше зареєстровано явище посилення інфікування клітин зеленої водорості *Chlorella* в умовах мікрогравітації бактеріальними клітинами *Pseudomonas sp.* На основі узагальнення одержаних експериментальних і літературних даних розроблена концепція гравічутливості одноклітинних організмів.

Результати досліджень використано для написання 69-го тому серії “Проблемы космической биологии” – “Шляпочные грибы и водоросли – объекты космической биологии”, М., Наука, 1991, а також монографій: “Влияние факторов космического полета на развивающиеся организмы“, К., Наук. думка, 1978; “ Микрорганизмы в космическом полете“, К., Наук. думка, 1983; “Результаты исследований на орбитальных станциях “Салют“, М., Наука, 1984. Отримані дані використовуються у навчальних програмах та спецкурсах з клітинної біології та альгології на кафедрі біології природничого факультету Національного університету “Киево-Могилянська Академія“. Встановлені ростові закономірності та особливості життєдіяльності бактеріальних і водоростевих культур на основі оцінки ультраструктури клітин мають цінність для відбору компонентів автотрофної ланки контрольованих екологічно замкнених систем життєзабезпечення людини на космічних літальних апаратах.

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ. Матеріали дисертації обговорювалися на засіданнях відділу клітинної біології і анатомії та Вченої ради Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України (Київ, 1975-1999 рр.), засіданні відділення Загальної біології

НАН України (Київ, 1997), науково-технічних конференціях з електронної мікроскопії (Ташкент, 1976; Рига, 1978; Кишинів, 1981; 1990), 10-ій нараді з питань кругообігу речовин у замкнених системах на основі життєдіяльності нижчих організмів, (Канів, 1976), конференціях “Гравитация и организм“ (Москва, 1974), “Реакции клеток на внешние воздействия“ (Ленінград, 1986), “Биоспутники“ (Москва, 1991), 10-ій конференції “Космическая и авиакосмическая медицина“ (Москва, 1994), 1-ій всесоюзній та 2-ій міжнародній конференціях “Актуальные вопросы альгологии“ (Черкаси, 1986; Київ, 1998), симпозиумах “Ультраструктура растительной клетки“ (Кишинів, 1983; Київ, 1988), 2-му та 3-му симпозиумах “Клеточные механизмы адаптации“ (Карадаг, 1985; Чернігів, 1988), а також були представлені на сесіях Міжнародного комітету з космічних досліджень (COSPAR) (Бангалор, 1980; Оттава, 1982; Грац, 1984; Тулуза, 1986; Еспоо, 1988; Гаага, 1990; Вашингтон, 1992; Гамбург, 1994; Бірмінгем, 1996, Варшава, 2000), на конгресах Міжнародної федерації астронавтики (IAF) (Рим, 1981; Будапешт, 1983; Вашингтон, 1989; Дрезден, 1989; Єрусалим, 1993; Осло, 1995; Турин, 1997), на Всесвітньому космічному конгресі (Вашингтон, 1992), 4-му Європейському міжнародному конгресі з клітинної біології (Прага, 1994), на міжнародному конгресі “Человек в космосе“ (Вашингтон, 1997), на міжнародних симпозиумах з гравітаційної фізіології (Рено, 1995; Рим, 1998; Орландо, 1999; Нагоя, 2000).

ОСОБИСТІЙ ВНЕСОК АВТОРА полягає у постановці завдань, плануванні експериментів, визначенні методів, проведенні експериментальних робіт і інтерпретації результатів, узагальненні отриманих даних.

ПУБЛІКАЦІЇ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ. Матеріали дисертації викладено у 86 публікаціях, у тому числі у 3 монографіях (у співавторстві), статтях у провідних вітчизняних та міжнародних журналах, збірках, матеріалах вітчизняних і міжнародних конференцій, нарад, симпозиумів, із них 33 статті надруковано у реферованих фахових вітчизняних та іноземних журналах.

СТРУКТУРА РОБОТИ. Дисертаційна робота складається зі вступу, восьми розділів, підсумкової частини, висновків, списку робіт дисертанта та списку цитованої літератури (569 бібліографічних джерел). Текст дисертації викладено на 303 сторінках машинописного тексту, включаючи 11 таблиць, 3 гістограми, 2 графіки, 1 схему та 44 рисунки, змонтовані з 99 електронних мікрофотографій.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Вступ** містить відомості про необхідність і важливість досліджень гравічутливості одноклітинних організмів, у яких не відомі спеціалізовані гравірецепторні органи (за винятком *Loxodes*, у якого роль гравірецептора виконує тільце Мюллера) (Neugebauer, Machemer, 1997). На основі теоретичних розрахунків вважалось (Pollard, 1966), що дрібні одноклітинні організми (розміром до 10 мкм), не можуть сприймати гравітацію, оскільки процеси дифузії у невеликому об'ємі клітини, очевидно, конкурують з конвекцією та Броунівським рухом молекул.

Обґрунтовується доцільність використання для вивчення гравічутливості організмів на клітинному та субклітинному рівнях зручних модельних систем, однією із яких є одноклітинні організми завдяки їх невеликим розмірам, високій здатності до розмноження (завдяки чому протягом короткого періоду можуть сформуватися числені покоління) та досить широкому температурному діапазону для оптимального росту. Підкреслюється, що результати біологічних експериментів із використанням одноклітинних організмів мають фундаментальне значення, оскільки вони базуються на оцінках стану цілісного організму, і тому дають підставу для екстраполяції одержаних результатів з клітинного рівня на організменний. Обговорюється актуальність дослідження гравічутливості для розробки теоретичних уявлень про механізми дії гравітації та сприйняття її на клітинному та субклітинному рівнях, прогнозування поведінки організмів в умовах мікрогравітації на основі їх адаптаційних можливостей, розробки космічних біотехнологій, пов'язаних з відбором компонентів автотрофної ланки для контрольованих екологічних систем життєзабезпечення людини на космічних літальних апаратах.

**Розділ 1. Об'єкти і методи досліджень.** Об'єктами дослідження були грамнегативні паличковидні рухомі бактерії *Proteus vulgaris* Hauser (родина *Enterobacteriaceae*) (Bergy, 1974) та два види одноклітинної зеленої водорості *Chlorella* – *Ch. vulgaris* Beijer. (штам ЛАРГ-1) та *Ch. pyrenoidosa* Chick (штам g-11-1). Добре вивчена біологія даного виду бактерій, а також висока швидкість росту (тривалість ділення клітини складає всього 15-20 хвилин), рухливість (окрім звичайних клітин, є ще особлива рухлива форма – швермери з 10-кратно збільшеною кількістю джгутиків) та широкий температурний діапазон росту (від 18 до 37° С) зумовили вибір *P. vulgaris* для космічних досліджень.

Відібрані штами *Chlorella* використовувалися в космічних експериментах завдяки їх високій швидкості росту на різних поживних середовищах, стійкості до коливання зовнішніх факторів, у першу чергу, до змін температури, здатності рости протягом тривалого часу на



органічних поживних середовищах, не втрачаючи інтенсивності зеленого забарвлення в умовах темряви (штам ЛАРГ-1). Штам g-11-1, жовтого кольору пігментний мутант, дефіцитний за хлорофілом, виявився зручним об'єктом для проведення експериментів у гетеротрофному режимі на борту космічних літальних апаратів. Культивування *P. vulgaris* в аеробних умовах проводили на традиційному м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) з додаванням нейтральних полімерів (декстрану-80 або агару Дифко) для подолання осідання клітин (Сытник и др., 1983). Для анаеробного вирощування *P. vulgaris* також використовували напіврідке поживне середовище (МПБ, розведений дистильованою водою у співвідношенні 1:1 з додаванням нейтральних полімерів). Для чіткої ідентифікації фронту росту бактерій, який у ряді експериментів контролювався космонавтами, в поживне середовище додавали солі тетразолію – 2.3.5 -трифеніл тетразолій бромід (2,3,5-ТФТБ) (Сытник и др., 1983).

Космічні експерименти з культурами бактерій *Proteus* виконано на борту: ШСЗ "Космос-654" (тривалість експерименту 57 год, аеробні умови культивування); космічного корабля (КК) "Союз-19" (експеримент "Ріст мікроорганізмів" згідно з радянсько-американською науковою програмою "Союз-Аполон", тривалість експерименту 6 діб, анаеробні умови); КК "Союз-22" (тривалість експерименту 7 діб, анаеробні умови).

Експерименти з культурами *Chlorella* проведені в умовах космічного польоту в процесі вирощування її як монокультури, так і в складі полікомпонентних систем (ПКС). Дані про їх тривалість, місце проведення, поживне середовище та вид *Chlorella* зведено у таблиці 1.

Інокуляцію культури проводили на Землі за 1-2 доби до старту КК, префіксацію – безпосередньо після закінчення експерименту на борту космічного апарату або через певні проміжки часу після його приземлення. У ряді експериментів інокуляція культури *Chlorella* та префіксація як бактеріальної, так і водоростевої культур для електронно-мікроскопічного дослідження виконана космонавтами в умовах мікрогравітації з метою запобігання впливу динамічних факторів на культури під час спуску КК. Усі процедури подальшої підготовки матеріалу для цитологічних досліджень після приземлення виконані на базі Інституту медико-біологічних проблем МОЗ Росії (м. Москва). Фіксацію культури здійснювали згідно з розробленою нами для даних об'єктів методики (Сытник и др., 1983).

У модельних експериментах використано штам ЛАРГ-1, який вирощували на горизонтальних кліностахах зі швидкістю обертання 2 об/хв та 3 об/хв. Тривалість експериментів в умовах кліностагування була різною, в залежності від поставленої мети (від 15 хв до 45 діб).

Ультратонкі зрізи готували за допомогою ультрамікротому LKB-8800 (Швеція, LKB). Зрізи контрастували як цитратом свинцю за Рейнольдсом (Reinolds, 1976), так і насиченим водним розчином ураніацетату протягом 35-40 хв. Зрізи вивчали в електронних мікроскопах JEM-100 В та 1200 EX (Jeol, Японія) при прискорюючій напрузі 60 або 80 кв. Фотографували об'єкти на негативних фотопластинках типів PA і ORVO.

Електронно-цитохімічне виявлення локалізації  $Mg^{2+}$ -активованих АТФаз виконували за методом Вакстейна-Мейзель у модифікації Н.В. Беліцер (Belitser et al., 1982).

Вміст аденілатів визначали за допомогою високочутливого люциферин-люциферазного методу (люциферин-люцифераза, "Sigma", Німеччина) з використанням поліфункціонального хемілюмінометра ХЛМН-01 (НВО ім. Корольова, Київ) за методикою (Malik, Thimann, 1980).

Таблиця 1. Експерименти, виконані з культурами *Chlorella vulgaris* і *Chlorella pyrenoidosa* на різних космічних апаратах.

Тривалість експерименту	Космічний апарат	Режим культивування	Поживне середовище	Вид <i>Chlorella</i>
4.5 діб	ОС " Салют-6 "	Світло	Напіврідке	<i>Ch. vulgaris</i>
5 діб	ОС " Салют-6 "	Темрява	Напіврідке	<i>Ch. vulgaris</i>
7 діб	ОС " Мир "	Світло	Водне, ПКС	<i>Ch. vulgaris</i>
9 діб	ОС " Салют-6 "	Світло	Напіврідке	<i>Ch. vulgaris</i>
9 діб	ОС " Мир "	Темрява	Тверде	<i>Ch. vulgaris</i>
10.5 діб	ОС " Салют-6 "	Темрява	Тверде	<i>Ch. vulgaris</i>
12 діб	БС " Біон-10"	Темрява	Тверде	<i>Ch. vulgaris</i>
13 діб	БС"Космос-1887"	Світло	Водне, ПКС	<i>Ch. vulgaris</i>
18 діб	ОС " Салют-6 "	Темрява	Тверде	<i>Ch. vulgaris</i>
28 діб	ОС " Салют-6 "	Темрява	Напіврідке	<i>Ch. pyrenoidosa</i>
30 діб	ОС " Мир "	Темрява	Тверде	<i>Ch. vulgaris</i>
4 місяці	ОС " Мир "	Темрява	Тверде	<i>Ch. vulgaris</i>

12 місяців	ОС " Мир "	Темрява	Тверде	<i>Ch. vulgaris</i>
------------	------------	---------	--------	---------------------

Визначення інтенсивності дихання проводили полярографічним методом (Полякова и др., 1983) на полярографі ВА-2 (Угорщина).

Локалізацію іонізованого кальцію вивчали піроантимонатним методом за Тандлером зі співавторами (Tandler et al., 1971).

Загальну активність СДГ визначали калориметричним методом (Ермаков, 1972). Вимірювання активності СДГ проводили на ФЕК М-56 з зеленим світлофільтром, активність ферменту підраховували в мікрограмах відновленого тетразолію (Сысоева, Краснова, 1967).

ММФ СДГ клітин *Chlorella* визначали методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі при силі струму 4 мА з наступним проявленням ізоформ безпосередньо на гелі (Сафонов, Сафонова, 1971; Brevet, 1970). Відносну електрофоретичну рухливість (ВЕР) вимірювали на 4-6 паралельних електрофореграмах. Одержані дані обробляли статистично (Плохинский, 1960). Кількість білку в пробах визначали за Лоурі (Lowry et al., 1953).

ММФ амілаз вивчали методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі (Сафонов, Сафонова, 1971). Вміст моно- та дисахаридів визначали в наважках ліофільно висушеної біомаси культури *Chlorella* калориметричним методом з використанням антронового синього (Борш, Степанова, 1966).

Відносний об'єм органел та складових компонентів пластид (строми, крохмальних зерен та тилакоїдів) розраховували за методом О.В.Кисельової зі співавторами (1974) з використанням негативів або фотографій зрізів цілих клітин *Chlorella* при збільшеннях 35000 та 60000. Для підрахунку брали по 100 клітин з кожного варіанту. Одержані емпіричні дані відносно об'єму різних органел та структурних компонентів клітин, товщини оболонки та площини зрізів клітин обробляли як за стандартними статистичними методами (Плохинский, 1960; Урбах, 1964; Бейли, 1970), так і за статистичними комп'ютерними програмами Statistica (for MS Word) та EXCEL Anova.

## **Розділ 2. Експерименти з одноклітинними організмами в умовах космічного польоту.**

У даному розділі наведено дані літератури про результати космічних експериментів, виконаних з одноклітинними організмами, зокрема бактеріями, найпростішими, дріжджами та водоростями, у яких вивчали інтенсивність росту культур та загальний приріст біомаси, виживання спор у залежності від тривалості перебування їх в умовах мікрогравітації, фагопродукцію бактеріальних культур, життєздатність, морфологічні та ультраструктурні особливості клітин, гравікінез, фото- та гравітаксис рухомих одноклітинних організмів.

Показано досить широкий спектр змін різних параметрів одноклітинних організмів, які перебували в умовах космічного польоту.

**Розділ 3. Структурно-функціональна характеристика клітин *Proteus vulgaris* в умовах стаціонарного контролю.** Описано ультраструктурні особливості клітин *P. vulgaris* за аеробних умов вирощування. Показана наявність у центральній частині клітин зони нуклеоїда, в якій чітко розрізняються осміофільні фібрили ДНК, встановлена присутність у клітині дрібногранулярних включень, простої форми інвагінацій цитоплазматичної мембрани, додаткових шарів клітинної оболонки. Відмічено, що в клітинах *Proteus vulgaris*, які виростили в анаеробних умовах, зона нуклеоїда не так чітко виділяється, спостерігається посилення гірозності клітинної оболонки та наявність на її поверхні матеріалу середньої електронної щільності. Не виявлено відмінностей в ультраструктурі клітин *P. vulgaris* між двома варіантами контролю (Київ – лабораторний контроль, Байконур – транспортний контроль), вирощених у аеробному та анаеробному режимах.

В умовах додавання у поживні середовища (МПБ та МПА) 2.3.5 -ТФТБ у клітинах *P. vulgaris* як в аеробних, так і анаеробних умовах відмічалось утворення гранул формагану яскраво-рожевого кольору в різних зонах клітини, причому в анаеробних умовах спостерігалась більша різноманітність топографії преципітату. За різним ступенем насиченості цитоплазми клітин рибосомами, відносним об'ємом гранул формагану та їх різної локалізації, наявністю фібрилярно-гранулярних та мембранних включень виділено 7 типів клітин.

Для оцінки функціонального стану клітин *P. vulgaris* як факультативного анаероба були вибрані дегідрогенази, зокрема СДГ, яка є найважливішим показником рівня біологічного окислення як в аеробних, так і в анаеробних умовах (Авакян и др., 1982). Проведені дослідження з використанням різних солей тетразолію показали, що в процесі ферментативного відновлення утворюється лише важкорозчинний формаган у місцях, де проявляється активність СДГ. У випадку використання 2.3.5-ТФТБ як індикатора дегідрогеназ, локалізація продукту реакції та розмір гранул, які мають вигляд електронно-прозорих зон внаслідок вимивання продукту реакції підчас зневоднення, дає підставу зробити висновок, що такі відкладення формагану є результатом його неферментативного відновлення внаслідок неспецифічної реакції зв'язування солей тетразолію. Найінтенсивніша реакція на СДГ проявлялася в клітинах у логарифмічній фазі росту культури.

**Розділ 4. Ультраструктура клітин *Proteus vulgaris* в умовах космічного польоту**

**4.1. Ультроструктурна організація клітин *P. vulgaris*, вирощених в аеробних умовах на борту ШСЗ "Космос-654".** На основі порівняльних електронно-мікроскопічних досліджень встановлено відмінності між клітинами *P. vulgaris*, вирощеними в умовах космічного польоту, та контрольними за рядом показників, зокрема, наявністю в дослідних клітинах нетипових для даного виду бактерій різної форми компактних нуклеоїдів (тісно згруповані фібрили ДНК у таких нуклеоїдах розташовані майже паралельно одна до одної). У залежності від щільності групування фібрил ДНК виділено два типи нуклеоїдів. На основі вимірювання площі зрізів клітин, дрібногранулярно-фібрилярних включень та товщини клітинних оболонок встановлено достовірну різницю між дослідними та контрольними клітинами. Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що дослідні клітини характеризувалися: 1) меншим розміром; 2) наявністю компактно розташованих фібрил ДНК (у 7% клітин); 3) більш рівномірним розподілом рибосом у цитоплазмі клітин і відсутністю чітко вираженої зони нуклеоїда в центральній частині клітин; 4) збільшенням відносного об'єму дрібногранулярно-фібрилярних включень та більшою частотою трапляння їх на зрізах клітин; 5) посиленою гірозністю клітинної оболонки; 6) розширенням периплазматичного простору; 7) меншою кількістю гранулярно-фібрилярного матеріалу на поверхні клітинних оболонок, аж до його повної відсутності.

Таким чином, на основі порівняльних досліджень ультроструктури клітин *Proteus vulgaris*, які виростили в аеробних умовах на борту ШСЗ "Космос-654" та в умовах стаціонарного лабораторного контролю, виявлено більш прискорений ріст культури в умовах космічного польоту, що свідчить про зміни рівня клітинного метаболізму, які корелювали з появою ряду ультроструктурних змін дослідних клітин порівняно з контрольними.

**4.2. Ультроструктурна характеристика клітин *P. vulgaris*, вирощених в анаеробних умовах на борту космічного корабля "Союз-19".** Наявність таких модифікуючих факторів, як анаеробіоз та додавання в поживне середовище 2.3.5 -ТФТБ, суттєво впливала на структуру та форму дослідних клітин. Виділено різні типи клітин стосовно їх форми, розміру та форми відкладень формазану в усіх чотирьох каналах приладу "Ріст-3" (ріст бактерій в них проходив: 1) лише в умовах космічного польоту; 2) частково у космосі; 3) продовження росту було вже на Землі або 4) лише на Землі). Аналіз розподілу різних типів клітин у різних каналах приладу "Ріст-3" показав, що кількість клітин 1-го типу (які не мають гранул формазану) значно менша в усіх каналах польотного варіанту порівняно з контрольними. У 2-ому каналі, де клітини росли лише в умовах космічного польоту, клітин 1-го типу було майже у 2 рази менше порівняно з контролем. Відмічено, що ряд інших показників клітин, які виростили у польотному варіанті,

маскувалися анаеробіозом, зокрема, гірозність оболонки, збільшення об'єму дрібногранулярних включень у цитоплазмі клітин та частоти трапляння їх на зрізах.

Таким чином, на основі порівняльних досліджень ультраструктури клітин *P. vulgaris*, які вирости в умовах космічного польоту та стаціонарного контролю на Землі, встановлено відмінності між варіантами як за частотою зустрічаємості клітин різних типів, так і за топографією локалізації відкладень важкорозчинного формагану. Аналіз частоти трапляння клітин різних типів показав певне пригнічення росту клітин *P. vulgaris* як в анаеробних умовах в орбітальному польоті, так і в післяпольотний період на Землі.

**4.3. Ультраструктурна організація клітин *P. vulgaris* у приладах "Ріст -3" в анаеробних умовах на борту космічного корабля "Союз-22".** Аналіз ультраструктурних особливостей клітин 1-го та 2-го каналів (враховуючи 7-добову тривалість експерименту, культура *P. vulgaris* знаходилася у кінці стаціонарної фази росту), показав значну варіабельність клітин за щільністю цитоплазми, наявністю дрібногранулярно-фібрилярних включень та їх об'ємом, а також за об'ємом відкладень легкорозчинного формагану. Встановлена значна подібність клітин, які вирости в умовах мікрогравітації протягом даного експерименту, з такою в експерименті "Ріст мікроорганізмів" (КК "Союз-19"). Це пояснюється безперечно, в першу чергу, наявністю модифікуючих факторів (анаеробіоз, додавання у поживне середовище індикатора росту 2.3.5 -ТФТБ). Особливості росту культури у даному експерименті проявилися, перш за все, у прискореному старінні культури, оскільки морфологічні ознаки її співпадали з такими клітин, які були характерні для стаціонарної фази росту.

Проведені дослідження на клітинах популяції бактерій *P. vulgaris*, які знаходилися в умовах космічного польоту у функціонально-активному стані, показали, що за оптимальних умов росту культури *P. vulgaris* спостерігається поява чітких відмінностей за ультраструктурними показниками порівняно з клітинами контрольних варіантів на фоні прискореного ділення клітин в умовах космічного польоту. Зміна умов культивування бактерій при мікрогравітації (шляхом додавання в поживне середовище індикаторів росту та створення умов анаеробіозу) викликала ультраструктурні перебудови клітин, які не реєструвалися за оптимальних умов вирощування культури. Аналіз частоти трапляння різних типів клітин показав певне інгібування росту клітин *P. vulgaris* за несприятливих умов вирощування бактерій в мікрогравітації, тобто, ступінь прояву ефектів космічного польоту залежав, значною мірою, від умов проведення експерименту, що чітко спостерігалася на структурному рівні.

## **Розділ 5. Структурно-функціональні особливості клітин *Chlorella vulgaris* і *Chlorella pyrenoidosa* в умовах стаціонарного контролю**

**5.1. Ростові показники.** У зв'язку з тим, що вирощування культури *Chlorella* проводили на різних за консистенцією поживних середовищах (рідкому, напіврідкому та твердому агаризованому) в умовах стандартної інокуляції та інокуляції методом окремих колоній (залежно від мети експерименту), було вивчено закономірності росту культури в цих умовах. Показано, що ріст культури *Chlorella* протягом логарифмічної та стаціонарної фаз у рідкому та напіврідкому поживних середовищах як у автотрофному, так і гетеротрофному режимах здійснювався згідно із закономірностями, що описуються S-подібною кривою. На твердому агаризованому середовищі тривалість як лаг-фази, так і логарифмічної та стаціонарної фаз значно подовжувалася, вихід культури на плато спостерігався після 25-30 діб її росту з моменту інокуляції. На основі вимірювання розміру колоній та підрахунку кількості клітин у колоніях однакового діаметра не встановлено достовірної різниці за кількістю клітин в умовах вертикального і горизонтального положення чашок Петрі в процесі вирощування культури.

**5.2. Ультраструктура клітин *Chlorella vulgaris* і *Chlorella pyrenoidosa*.** У даному розділі наведені результати порівняльного електронно-мікроскопічного аналізу клітин обох штамів *Chlorella*, вирощених в авто- та гетеротрофному режимах на різних за консистенцією поживних середовищах. Виявлено певні відмінності у субмікроскопічній організації клітин, перш за все хлоропластів, в умовах росту культури в рідкому, напіврідкому та твердому поживних середовищах. Показано, що клітини обох штамів містять усі основні органели, які властиві для рослинної клітини, у тому числі для водоростевих клітин (Rosen et al., 1984) – ядро з ядерцем, мітохондрії, диктіосоми, нечисленні канали ендоплазматичного ретикулуму та дрібні вакуолі. Штам ЛАРГ-1, який відноситься до типу крохмалоносних, характеризується наявністю масивного хлоропласта чашовидної форми (40-60% об'єму клітини) з великою кількістю крохмалю. Мембранна система хлоропласта представлена пучками тилакоїдів. Загальний об'єм зерен крохмалю в хлоропласті клітин у логарифмічній фазі росту культури складає, в основному, 23,7% від загального об'єму, в стаціонарній фазі – 45-64%, що співпадає з його вмістом у клітинах інших видів *Chlorella* (Dodge, 1973).

Для хлоропласта клітин *Chlorella* штаму ЛАРГ-1 характерна наявність 1-2 піреноїдів з відносно великою амілогенною обкладкою із крохмальних зерен лінзовидної форми. Ядро клітин *Chlorella* відноситься до еухроматинового типу. Мітохондрії клітин *Chlorella* нечисленні, ортодоксальної конфігурації, з вузькими кристами, розташованими без будь-якої впорядкованості. У цитоплазмі клітин обох штамів відмічається наявність 1-2

диктіосом, мікротілець типової для водоростей структури, дрібних вакуолей та ліпідних крапель.

У клітинах штаму ЛАРГ-1, вирощених в автотрофному режимі, виявлено цікаву особливість, не описану в літературі, а саме, утворення цитоплазматичною мембраною на окремих її ділянках різних складок у вигляді петель різної форми, локалізованих переважно в периплазматичному просторі. У стаціонарній фазі росту культури відмічалася інтенсивніша вакуолізація клітин, збільшення кількості ліпідних крапель у цитоплазмі, зниження активності апарату Гольджі та ступеню розвитку ендоплазматичного ретикулуму, утворення локальних розширень перинуклеарного простору та поява дрібногранулярного матеріалу високої електронної щільності як у периплазматичному просторі, так зрідка і в складках цитоплазматичної мембрани.

Клітини пігментного мутанта штаму g-11-1 відрізняються від клітин автотрофного штаму ЛАРГ-1, перш за все, ультраструктурною організацією пластид, мембранна система яких представлена у вигляді поодиноких ламел та везикул різного розміру. Піреноїд клітин *Ch. pyrenoidosa* порівняно зі штамом ЛАРГ-1 має менший розмір, його матрикс не так чітко відмежовано від цитоплазми.

Таким чином, ультраструктурна організація клітин двох видів *Chlorella* – штам ЛАРГ-1 і штам g-11-1, використаних нами для досліджень, виявляє значну подібність за багатьма показниками. Основні відмінності спостерігаються у субмікроскопічній організації пластид.

## **Розділ 6. Структурно-функціональні особливості клітин *Chlorella vulgaris* і *Chlorella pyrenoidosa* в умовах космічного польоту**

### **6.1. Ультраструктура клітин *Chlorella vulgaris* у експериментах, виконаних в автотрофному режимі**

**Експеримент тривалістю 4,5 доби.** Культура штаму ЛАРГ-1, яка виросла в умовах космічного польоту, за інтенсивністю забарвлення та ультраструктурною організацією клітин була подібна до контрольних. Проте, в багатьох клітинах дослідного варіанту відмічено зменшення амілогенної обкладки піреноїда та посилення вакуолізації у порівнянні з контролем (в 5% клітин – прогресуючу вакуолізацію). Порівняльний аналіз відносного об'єму клітинних органел показав статистично достовірні відмінності між дослідними та контрольними клітинами за об'ємом пластид та вмістом у них крохмалю ( $55.7 \pm 4.2\%$  – політ,  $62.5 \pm 4.6\%$  – контроль,  $22.4 \pm 2.5\%$  та  $29.1 \pm 3.0\%$ , відповідно).

**Експеримент тривалістю 9 діб.** Ультраструктурні показники ядра, ядерця, мітохондрій та апарату Гольджі клітин дослідного варіанту, в основному, були подібні таким контрольних варіантів. Однак, у дослідних клітинах відмічено зменшення кількості і розміру зерен



крохмалю; потоншення амілогенної обкладки піреноїдів хлоропласта; появу в стромі останнього електронно-прозорих зон, не обмежених мембраною, повністю позбавлених рибосом; посилення вакуолізації не лише сформованих вегетативних клітин, але і автоспор.

Таким чином, на основі електронно-мікроскопічного та морфометричного аналізів встановлена значна подібність ультраструктури клітин дослідного та контрольного варіантів в умовах нетривалого вирощування *Chlorella* в автотрофному режимі в умовах космічного польоту, що дозволяє зробити висновок про відсутність суттєвого інгібуючого ефекту факторів космічного польоту на ріст культури та ультраструктуру клітин під час короткочасної дії мікрогравітації. Відмічені, в основному, зміни кількості запасних полісахаридів у хлоропластах та посилення вакуолізації свідчать про порушення вуглеводного обміну та високу активність автолітичних процесів у дослідних клітинах.

## **6.2. Ультраструктура клітин *Chlorella vulgaris* в експериментах, виконаних у гетеротрофному режимі**

**Експеримент тривалістю 5 діб.** Як за інтенсивністю забарвлення культур обох варіантів, так і за ультраструктурою виявлена значна подібність контрольних і дослідних клітин. Основні відмінності клітин, які виростили в умовах космічного польоту, від контрольних полягали у формуванні більш складних профілів ев- та інвагінацій цитоплазматичної мембрани, які на зрізах мали різну форму (у вигляді петель різного розміру, неправильно закручених чи мієліноподібних структур або не зовсім паралельних складок на певних відрізках чи купки мембран, розташованих як у периплазматичному просторі, так і в периферійних шарах цитоплазми). Крім того, відмічали появу в стромі хлоропластів електронно-прозорих зон, позбавлених рибосом. На основі морфометричного аналізу структурних компонентів хлоропласта зареєстровані достовірні відмінності за об'ємом фотосинтетичних мембран, який у дослідних клітинах зменшувався ( $14.0 \pm 1.6\%$ ) порівняно з варіантами двох лабораторних контролів ( $24.0 \pm 2.4\%$  і  $24.8 \pm 2.6\%$ ) та двох транспортних контролів ( $23.3 \pm 2.3\%$  і  $31.1 \pm 3.1\%$ ), тоді як відносні об'єми зерен крохмалю та строми пластид в усіх варіантах експерименту достовірно не відрізнялися.

**Експеримент тривалістю 9 діб.** Ультраструктура клітин 9-добової культури була типовою для клітин, які вирощуються за гетеротрофним режимом. Відмічалось інтенсивне нагромадження зерен крохмалю різного розміру, проте його кількість у дослідних клітинах була нижча, ніж у контролі ( $21.0 \pm 2.2\%$  та  $47.0 \pm 3.7\%$  відповідно). Крім того, спостерігали потоншення амілогенної обкладки піреноїдів, посилення вакуолізації дослідних клітин, появу мітохондрій більшого розміру ( $0.9 - 1.0$  мкм у повздовжній вісі) із щільнішим, ніж у контролі, матриксом та більшою кількістю інтрамітохондріальних гранул. Наявність ультраструктурних перебудов деяких клітинних органел, перш за все хлоропластів клітин,

під час нетривалого вирощування культури *Chlorella* в умовах космічного польоту свідчить про зміну метаболізму клітин, у першу чергу, про порушення їх вуглеводного обміну. Експериментальне підтвердження одержаних цитологічних даних отримано нами в результаті біохімічного дослідження культури, коли було виявлено зміни в активності амілаз та різний вміст моно- та дисукрів у дослідних клітинах порівняно з такими у контрольних.

**Експеримент тривалістю 10,5 діб.** Субмікроскопічна організація дослідних клітин за структурою ядра, диктіосом, ендоплазматичного ретикулуму була, в основному, подібна до такої клітин контрольних варіантів. Проте, спостерігалися певні відмінності, переважно в ультраструктурі енергетичних органел, зокрема, поява мітохондрій збільшеного розміру з розширеними кристами, а також різного розміру електронно-прозорих зон у сторомі хлоропластів, які інколи поширювалися і на пучки тилакоїдів, посилення вакуолізації клітин та порушення процесу цитокінезу.

**Експеримент тривалістю 12 діб.** Клітини мали ультраструктурну організацію, характерну для темнових умов вирощування культури. Загальний об'єм крохмалю в клітинах, згідно з морфометричним аналізом, досягав  $53.4 \pm 4.1\%$ . Клітини, які виростили в умовах космічного польоту, відрізнялися від обох варіантів контролю, перш за все, за вмістом крохмалю ( $14.0 \pm 1.5\%$ ). Електронна щільність строми хлоропластів більшості дослідних клітин знижувалася порівняно з такою у контролі. Суттєво змінювалися також ультраструктура і форма мітохондрій – збільшувався їх розмір (1.3 -1.5 мкм довжиною) та розмір крист, підвищувалася електронна щільність матриксу, зростав загальний об'єм мітохондріуму ( $5.3 \pm 0.1\%$ , контроль –  $2.5 \pm 0.3\%$ ). Певна кількість клітин (до 7%) польотної популяції містили ядра з більшою кількістю конденсованого хроматину. Відмічалися нерівномірні розширення на певних ділянках периплазматичного простору.

Порівняльний аналіз структури дослідних клітин і клітин контрольного варіанту, виконаного згідно термограми польотного варіанту (з урахуванням підвищення температури до  $30^\circ \text{C}$  на борту біосупутника "Біон-10" в останній день експерименту), показав, що спектр ультраструктурних перебудов органел в умовах космічного польоту був ширшим у порівнянні з даним варіантом контролю, що свідчить про високу стабільність клітин *Chlorella* до дії підвищеної температури.

**Експеримент тривалістю 18 діб.** Ультраструктура клітин усіх варіантів (дослідного та двох варіантів контролю) була типовою для темнових умов вирощування культури. Дослідні клітини відрізнялися від контрольних меншим загальним об'ємом крохмалю в хлоропластах; зниженою електронною щільністю строми та наявністю в ній електронно-прозорих зон; формуванням глибоких ін- та евагінацій цитоплазматичної

мембрани; більшим об'ємом конденсованого хроматину в периферійній зоні певної субпопуляції ядер; появою на мембранах оболонки ядра, пластид і мітохондрій поодиноких  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих центрів мембран.

**Експеримент тривалістю 30 діб.** За структурою хлоропластів, мітохондрій та відносним об'ємом запасних речовин встановлено значні відмінності між польотним та контрольними варіантами. Так, у дослідних клітинах значно зменшився відносний об'єм крохмалю у хлоропласті ( $11.5 \pm 2.5\%$ , контроль –  $62.1 \pm 4.6\%$ ), з'явилися везикулярні утворення в стромі, очевидно, внаслідок розширення інтратилакоїдного простору ( $3.2 \pm 0.1$  контроль –  $0.03 \pm 0.01\%$ ), формувалися вирости оболонки пластид, направлені в цитоплазму або до клітинної оболонки, зростав загальний об'єм мітохондрію ( $4.5 \pm 0.3\%$ , контроль –  $2.2 \pm 0.2\%$ ) за рахунок збільшення популяції мітохондрій в клітині та появи органел великого розміру.

**Експеримент тривалістю 4 місяці.** Субмікроскопічна організація клітин, які росли протягом 4 місяців в умовах космічного польоту, відрізнялася від такої контрольних клітин, перш за все, за структурою пластид та мітохондрій. У дослідних клітинах відмічалось збільшення розміру мітохондрій та їх крист, впорядкування топографії крист, зменшення відносного об'єму хлоропласта та кількості крохмалю, а також розміру піреноїдів, посилення вакуолізації певної частини клітин дослідного варіанту, підвищення компактизації хроматину і збільшення його частки в об'ємі ядра у багатьох дослідних клітинах, поява дрібно-гранулярного матеріалу високої електронної щільності у периплазматичному просторі. Нерідко відмічали появу  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих центрів на мембранах багатьох органел дослідних клітин.

**Експеримент тривалістю 12 місяців.** Ультраструктура контрольних клітин була типовою для стаціонарної фази її росту в гетеротрофному режимі. Для більшості клітин була характерна наявність вакуолей різного розміру, зниження активності апарату Гольджі, збільшення кількості і розміру ліпідних крапель, поява в окремих клітинах ділянок автолізу цитоплазми клітин, тобто, виявлялися ознаки старіючих клітин.

Дослідні клітини за багатьма показниками відрізнялися від клітин контрольних варіантів, а саме, зменшенням загального об'єму хлоропласта та крохмалю в ньому ( $26.2 \pm 2.8\%$ , контроль –  $38.4 \pm 4.1\%$ ;  $7.1 \pm 0.9\%$  та  $24.1 \pm 2.5\%$  – відповідно), посиленням проліферації мітохондрій та зростанням загального об'єму мітохондрію ( $5.9 \pm 0.9\%$  – дослід,  $2.2 \pm 0.1\%$  – контроль), формуванням згинів тилакоїдів та везикулярних утворень у стромі хлоропластів, суттєвим посиленням вакуолізації клітин, компактизації хроматину певної частини ядер та проліферації каналів ендоплазматичного ретикулу, появою дрібно-гранулярного матеріалу в периплазматичному просторі клітин та в інвагінаціях цитоплазматичної мембрани.

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що навіть під час нетривалого вирощування культури *Chlorella* за гетеротрофних умов (протягом 5 і 9 діб) відмічалися модифікації ускладнення конфігурації складок цитоплазматичної мембрани, а також зменшення відносного об'єму фотосинтетичних мембран у хлоропластах дослідних клітин, що може вказувати на певні зміни рівня метаболізму клітин. Подовження терміну культивування даного штаму в умовах космічного польоту (12-ти та 18-ти добові експерименти) приводило до зміни енергетичного та вуглеводного обміну, що проявлялося в перебудовах частини популяції мітохондрій та зменшенні вмісту крохмалю в хлоропластах.

Під час тривалого вирощування культури *Chlorella* на твердому поживному середовищі в умовах космічного польоту відмічався ширший спектр перебудов субмікроскопічної організації органел, що свідчить про значні зміни метаболізму клітин, перш за все, вуглеводного та енергетичного обміну в умовах мікрогравітації. Разом з тим, виявлений спектр перебудов клітинних органел під час тривалого вирощування культури *Chlorella* в умовах космічного польоту дає підставу розглядати більшість ультраструктурних перебудов органел як адаптаційні, що здійснюються для підтримання функціональної активності клітин в екстремальних умовах.

Вцілому, незважаючи на наявність досить широкого спектру перебудов ультраструктурної організації клітинних органел, який відображає зміни рівня та направленості метаболізму клітин в умовах космічного польоту, культура зберігала свою життєздатність протягом досить тривалого періоду її вирощування (4 і 12 міс) у цих умовах, що свідчить про її високі адаптаційні можливості.

### **6.3. Ультраструктура клітин *Chlorella pyrenoidosa*, вирощених у гетеротрофному режимі в умовах космічного польоту**

**Експеримент тривалістю 28 діб.** Культура штаму g-11-1, яка виросла на борту ОС "Салют-6," за щільністю клітин у 4,5 рази перевищувала ( $357.6 \pm 23.1$ ) такі в усіх варіантах контролю ( $24.6 \pm 2.8$  – лабораторний контроль;  $79.6 \pm 4.5$  – лабораторний контроль з перемішуванням;  $25.9 \pm 2.3$  – транспортний контроль;  $55.9 \pm 0.8$  – транспортний контроль з перемішуванням) (Сытник и др., 1983). Встановлено також суттєві відмінності між варіантами за ультраструктурною організацією клітин. У дослідних клітинах відмічали значну вакуолізацію; зменшення кількості запасних полісахаридів; підвищення компактизації хроматину та його розподіл у периферійній зоні ядра; значний поліморфізм мітохондрій за їх розмірами, формою, щільності матриксу, розміром та топографією крист; підвищення частоти трапляння складок цитоплазматичної мембрани; збільшення кількості

ліпідних крапель у цитоплазмі клітин ( $6,0 \pm 0,5\%$  – дослід,  $0,7 \pm 0,1\%$  та  $0,6 \pm 0,1\%$  – транспортний та лабораторний контроль).

Таким чином, під час тривалого вирощування культури *Ch. pygmeoidosa* (пігментний мутант g-11-1) в умовах космічного польоту останні різнобічно та істотно впливали на ріст і життєдіяльність фізіологічно-активної культури. Результати ультраструктурного аналізу свідчать, що на фоні підвищення приросту біомаси відбувалося прискорене старіння клітин дослідної культури, про що свідчили певні ультраструктурні зміни. Порівняльна ультраструктурна характеристика двох штамів *Chlorella*, вирощених протягом однакового за тривалістю часу (28 і 30 діб) у напіврідкому та на твердому поживних середовищах у гетеротрофному режимі свідчить, що під час росту культури на твердому середовищі відбуваються суттєвіші зміни ультраструктури клітин, що, очевидно, пов'язано з порушенням взаємодії клітин з оточуючим середовищем.

#### **6.4. Ультраструктура клітин *Chlorella vulgaris* в умовах космічного польоту у складі полікомпонентних систем.**

**Експеримент тривалістю 13 діб ("Акваріум-1").** Трьохкомпонентна екосистема, окрім клітин *Chlorella*, включала акваріумних риб *Poecilia reticulata* Pet. та мікрофлору. Ультраструктура клітин була типовою для штаму ЛАРГ-1 в умовах вирощування його при інтенсивному освітленні, тобто, відмічалася наявність добре розвинених піреноїдів та пучків тилакоїдів, які на окремих ділянках мали паралельне згрупування, що нагадувало грани. У субмікроскопічній організації дослідних клітин спостерігали зміни, які проявлялися у зменшенні кількості і розміру зерен крохмалю в стромі хлоропластів, посиленні вакуолізації ( $16,6 \pm 1,5\%$ , контроль –  $1,1 \pm 0,2\%$ ), підвищенні загального об'єму конденсованого хроматину в деяких ядрах. Вперше відмічено явище інфікування клітин *Chlorella* (майже 3%) в умовах космічного польоту бактеріальними клітинами, які спостерігалися як у периплазматичному просторі, так і в периферійних зонах цитоплазми, що, очевидно, відображає різні етапи проникнення та розмноження бактерій у клітинах *Chlorella*. Аналіз серійних зрізів клітин та різних стадій контактів бактеріальних клітин і клітин водорості дають підставу висловити припущення, що проникнення клітин бактерій, переважно *Pseudomonas sp.*, у клітини *Chlorella* відбувається завдяки лізису її клітинної оболонки, можливо, внаслідок порушення її механічних та структурних властивостей в умовах мікрогравітації.

**Експеримент тривалістю 7 діб ("Акваріум-2").** Ультраструктура клітин польотного варіанту, яка виросла в умовах мікрогравітації була за основними ознаками подібна до клітин контролю. Проте, в багатьох дослідних клітинах спостерігалися перебудови

клітинних органел, подібно до тих, що мали місце в попередньому експерименті (13 діб), хоча спектр змін був більш вузьким у короткочасному експерименті.

Отже, в клітинах *Chlorella*, які вирости в полікомпонентній системі в умовах космічного польоту, виявлено ряд перебудов органел, подібних до тих, що реєструвалися при дослідженні *Chlorella* як монокультури в автотрофних умовах. У той же час відмічені і специфічні ознаки, зокрема, інфікування клітин *Chlorella* переважно клітинами *Pseudomonas sp.*, що може свідчити про зниження стійкості водоростевих клітин і/або про посилення патогенності бактерій в умовах космічного польоту, що вказує на складну взаємодію між організмами в таких екосистемах.

Таким чином, на основі порівняльного цитологічного аналізу клітин *Chlorella*, які протягом різної тривалості часу вирощували як у вигляді монокультури, так і в складі полікомпонентних систем на різних поживних середовищах в авто- та гетеротрофному режимах в умовах мікрогравітації, стаціонарних лабораторних та транспортних контролів, встановлено певні відмінності між варіантами в ультраструктурі клітинних органел та відносних об'ємах запасних поживних речовин, які, очевидно, відображають зміни метаболізму, перш за все, в енергетичному та вуглеводному обміні дослідних клітин. Вивічені перебудови органел дослідних клітин безумовно свідчать про чутливість клітин до зміни гравітаційної сили.

**Розділ 7. Структурно-функціональні особливості клітин *Chlorella vulgaris* в умовах клінонстатування.** Одержані результати про зміни структурно-функціональної організації клітин, які росли протягом різної тривалості часу на борту космічних літальних апаратів, свідчили про вплив на одноклітинні організми факторів космічного польоту. Для вичленення ефектів мікрогравітації, яка, згідно загальноприйнятій думці гравітаційних біологів, викликає суттєві зміни організмів, були проведені модельні експерименти з використанням повільних горизонтальних клінонстатів, за допомогою яких частково відтворюються ефекти мікрогравітації (Brown, Chapman, 1988).

**7.1. Ростові показники культури *Chlorella* за різної тривалості клінонстатування.** На основі підрахунку кількості клітин штаму ЛАРГ-1 у колоніях однакового діаметра, що вирости в умовах клінонстатування, горизонтального та вертикального контролів встановлено незначне інгібування ростових показників культури на початку дії даного фактора, тобто виявлені зміни в ростових характеристиках лише частково подібні до тих, які реєструються в умовах космічного польоту.

**7.2. Ультраструктура клітин *Chlorella* в умовах кліноостатування.** Проведений ультраструктурний аналіз показав, що під впливом нетривалого кліноостатування (від 1 до 5 діб), коли культура знаходилася в логарифмічній фазі росту, ультраструктура клітин *Chlorella*, в основному, не відрізнялася від такої у контролі. Збільшення терміну кліноостатування (від 10 до 20 діб) приводило до посилення проліферації мітохондрій в клітинах; появи окремих великих органел (до 1,5 мкм в діаметрі), підвищення електронної щільності матриксу та збільшення розміру крист, зменшення кількості та розміру зерен крохмалю в хлоропластах та в амілогенній обкладці, а також зниження електронної щільності строми хлоропластів. Зміни мембранної системи хлоропластів проявлялися у формуванні згинів тилакоїдів та розширенні інтратилакоїдного простору, а також у везикуляції мембранної системи хлоропласта. В умовах тривалого кліноостатування загальний об'єм мітохондріому зростав ( $5.1 \pm 0.4\%$ , контроль –  $2.3 \pm 0.2\%$ ), суттєво знижувалася кількість крохмалю в хлоропластах та електронна щільність їх строми. Затяжне кліноостатування (до 45-50 діб) викликало зміни топографії тилакоїдів, формування згинів, майже повну відсутність зерен крохмалю; зменшення майже в 2.2 рази загального об'єму хлоропласта, збільшення загального об'єму мітохондріому та розміру окремих мітохондрій, впорядкування топографії крист, підвищення частки конденсованого хроматину (у 9-17% дослідних клітин).

Таким чином, характер ультраструктурних перебудов клітинних органел в умовах кліноостатування виявляв значну подібність до таких, що зареєстровані у клітинах під час космічного польоту, проте часові характеристики виникнення певних змін, перш за все, у енергетичних органелах, не співпадали з тими, що відбувалися в умовах мікрогравітації.

**7.3. Електронно-цитохімічне дослідження активності  $Mg^{2+}$ -активованих АТФаз** показало наявність високої інтенсивності реакції у мітохондріях клітин *Chlorella* в умовах кліноостатування, в тому числі, і в органелах великого розміру з упорядкованим розташуванням крист, які утворювалися у клітинах *Chlorella* під дією мікрогравітації і кліноостатування, що може свідчити про високу функціональну активність мітохондріому в умовах кліноостатування.

**7.4. Вміст аденілатів.** Встановлено підвищення в дослідних клітинах *Chlorella* вмісту АТФ впродовж кліноостатування, особливо при тривалішій його дії, що може корелювати з появою більших за розміром, порівняно з ортодоксальними, мітохондрій. Рівень вмісту АДФ до певної міри співпадав з рівнем АТФ. Нижчий коефіцієнт співвідношення рівнів АТФ і АДФ на початковому етапі кліноостатування може свідчити про певне зниження енергетичного статусу клітин у цей період, не дивлячись на суттєве збільшення загального пулу аденілатів. Відмічено зростання коефіцієнту співвідношення АТФ/АДФ з подовженням

тривалості кліностакування, що, імовірно, може свідчити про вищий рівень енергетичних витрат клітин у цих умовах. Вважають (Maresca, Carratu, 1990), що підвищення коефіцієнта співвідношення аденілатів є загальним феноменом неспецифічної фізіолого-біохімічної відповіді клітини на екстремальні впливи і кореляції активності АТФ-синтезуючих систем відповідно до зміни умов функціонування організму.

**7.5. СДГ.** Порівняння ізоферментних спектрів ММФ СДГ культури штаму ЛАРГ-1 протягом різної тривалості кліностакування показало гетерогенність ізоферментного складу в процесі росту культури та наявність відмінностей у складі структурно-зв'язаних ММФ, які мали ширший спектр мінливості в умовах кліностакування. Отримані нами дані про мінливість спектру ММФ СДГ, збільшення кількості структурно-зв'язаних форм та підвищення загальної активності даного ферменту в клітинах *Chlorella* під впливом кліностакування, очевидно, свідчать, що вказані зміни були спричинені підвищенням загального об'єму крист внаслідок зростання загального об'єму мітохондрію під дією вказаного фактора. Зважаючи, що структурно-зв'язані форми СДГ асоційовані з мембранами мітохондріальних крист, можна припустити, що збільшення кількості останніх в умовах кліностакування і зумовило збільшення ММФ даної фракції, що узгоджується з уявленнями про посилення активності ферментів, яке забезпечує підвищення енергозабезпечення клітин при зміні умов оточуючого середовища (Гетман, 1996).

**7.6. Рівень дихання клітин *Chlorella* за різної тривалості кліностакування.** Встановлено, що в умовах кліностакування на всіх фазах росту культури інтенсивність дихання була вищою, ніж у контролі. Відмічені два піки підйому інтенсивності дихання – у перші дні кліностакування та в середині логарифмічної фази росту культури (10 -14 діб з моменту кліностакування), що, можливо, зумовлено перерозподілом клітин у дослідній популяції за стадіями їх розвитку, а саме, переважанням у популяції сформованих вегетативних клітин, які характеризуються майже у 3 рази вищим рівнем вживання кисню (Акоев, Цоглин, 1991) порівняно з автоспорами, кількість яких була більшою у контрольній популяції. Другий пік підвищення інтенсивності дихання в умовах збільшення терміну кліностакування культури пов'язаний, очевидно, з перебудовами мітохондрію в цей період. Розвинутіший мітохондрію дослідних клітин дозволяє підтримувати вищу інтенсивність дихання клітин, причому інтенсифікація дихання у кліностакованих клітинах, можливо, забезпечується вищим, порівняно з контролем, вмістом моно- та дицукрів, які можуть служити субстратом для окислення.

**7.7. Локалізація іонізованого та слабо зв'язаного кальцію в клітинах *Chlorella* в умовах кліностакування.** Наявність продукту електронно-цитохімічної реакції у клітинах



*Chlorella* на різних фазах росту культури в умовах клінонстатування характеризувалася певною гетерогенністю за формою преципітату, розміром та кількістю гранул піроантимонату кальцію в більшості клітинних органел, що, до певної міри, співпадало з контрольним варіантом. Найсуттєвішою відмінністю локалізації преципітату є наявність продукту реакції в гіалоплазмі дослідних клітин в протилежність до контрольних. Одержані дані про певний перерозподіл локалізації іонів вільного та слабо зв'язаного кальцію, виявлені за допомогою електронно-цитохімічної реакції, демонструють наявність змін кальцієвого балансу в цих умовах. Поява численних  $\text{Ca}^{2+}$ -сайтів на мембранах багатьох клітинних органел, переважно в клітинах *Chlorella*, які виростили в умовах космічного польоту, свідчить, що зміни кальцієвого балансу та його перерозподіл у клітині в умовах мікрогравітації є, очевидно, суттєвішими порівняно з умовами клінонстатування.

**7.8. Вміст білка в клітинах *Chlorella* в умовах клінонстатування.** Відомо, що одним із біологічних ефектів мікрогравітації, зареєстрованих як у рослинних, так і в тваринних організмах, є порушення білкового обміну. Визначення вмісту білка в клітинах *Chlorella*, вирощених в умовах різної тривалості клінонстатування та стаціонарного лабораторного контролю, показало наявність достовірної різниці між варіантами, що проявлялося у зниженні вмісту білка в дослідних клітинах на початку дії вказаного фактора та в середині логарифмічної фази росту культури за умов клінонстатування. Отже, відмічені зміни в структурі хлоропластів, значне зниження електронної щільності строми хлоропластів, поява в ній електронно-прозорих зон та зменшення кількості рибосом на одиницю площі порівняно з контролем можуть бути результатом порушення білкового синтезу під впливом мікрогравітації.

**7.9. Питома активність та характеристика множинних молекулярних форм амілаз клітин *Chlorella* в умовах клінонстатування та космічного польоту**

**7.9.1. Питома активність і характеристика множинних молекулярних форм амілаз клітин *Chlorella* в умовах клінонстатування.** На основі аналізу електрофоретичного спектру ММФ амілаз на різних фазах росту культури *Chlorella* в умовах клінонстатування та стаціонарного вирощування в контролі виявлено взаємозв'язок співвідношення розчинних і структурно-зв'язаних форм, який корелює з рівнем питомої активності даного ферменту та кількістю запасних полісахаридів у хлоропластах клітин. Встановлено значне підвищення питомої активності амілаз у клітинах *Chlorella* (майже в 3,6 рази) в умовах клінонстатування, особливо в середині логарифмічної фази росту культури, що чітко корелює з розширенням спектру фракції розчинних форм амілаз і зменшенням кількості запасних полісахаридів у

хлоропластах дослідних клітин, тоді як у контролі у цей період відбувається процес інтенсивного накопичення крохмалю. У стаціонарній фазі росту культури в умовах клінонстатування, коли, очевидно, вже вичерпався резерв запасних поліглюканів, відбувається зворотний процес, перехід ферментів у структурно-зв'язаний стан, про що свідчить збільшення кількості форм даної фракції амілаз у цей період.

**7.9.2. Питома активність амілаз та вміст моно- і дицукрів у клітинах *Chlorella* в умовах космічного польоту.** Ультраструктурна організація клітин 9-добової культури, вирощеної в умовах космічного польоту, відрізнялася від контрольної, перш за все, зменшенням відносного об'єму зерен крохмалю в хлоропластах (47% - контроль; 21% - дослід). Проведені біохімічні дослідження показали, що питома активність амілаз у контрольному варіанті мала 0.9 од/г ліофільно висушеної біомаси, тоді як у досліді вона досягала 2.5 од /г. При цьому вміст моно- і дицукрів у контролі складав 0,48 %, у польотному варіанті – 1,08 %.

Отже, виявлене нами збільшення питомої активності амілаз у клітинах культури *Chlorella* в умовах космічного польоту порівняно з контролем збігається з отриманими нами даними про зростання питомої активності амілаз у клітинах даного штаму культури в умовах клінонстатування.

Таким чином, результати проведених нами досліджень показали наявність змін субмікроскопічної організації ряду органел клітин *Chlorella*, вирощених в умовах повільного горизонтального клінонстатування, багато в чому подібних до тих, що реєструвалися в умовах космічного польоту, проте часові характеристики появи таких перебудов часто не співпадали. Слід відмітити, що зміни в ультраструктурі як хлоропластів, так і мітохондрій, а також інших клітинних компартментів наступали дещо пізніше, ніж в умовах космічного польоту. Структурні перебудови енергетичних органел поряд з підвищенням активності як гідролітичних, так і ферментів енергетичного обміну, в тому числі дихального ланцюга, в дослідних клітинах *Chlorella* свідчать про посилення функціональної активності клітин, що веде до підвищення їх енергізації і, очевидно, компенсує енергетичні витрати клітини в процесі адаптації одноклітинних організмів до умов клінонстатування.

**Розділ 8. Обговорення одержаних результатів.** У даному розділі обговорюються одержані нами експериментальні дані про можливі механізми перебудов пластид, мітохондрій, ядра, зміни спектрів ММФ СДГ і амілаз, а також зміни активності даних

ферментів при тривалому культивуванні *Chlorella*, зміни ростових показників культур одноклітинних організмів в умовах мікрогравітації і клінонстатування.

Аналіз власних результатів, отриманих за допомогою методів електронної мікроскопії, електронної цитохімії та ряду фізіолого-біохімічних методів, а також даних, про які повідомлялося в літературі, дозволив нам запропонувати концепцію гравічутливості одноклітинних організмів (що схематично представлено на рис 1), яка базується не на перерозподілі клітинних компонентів, як це спостерігається в спеціалізованих гравічутливих клітинах вищих рослин, а перш за все, на змінах структури цитоплазматичної мембрани. Остання з усіма притаманними їй особливостями і тонкими механізмами взаємодії білків між собою та з оточуючими їх ліпідами (Merz, Roux, 1996) може відігравати важливу роль у гравічутливості клітин. Виявлені зміни фосфоліпідного та жирнокислотного складу цитоплазматичних мембран в умовах клінонстатування (Poluylakh, 1996) та фотомембран у нижчих (Антонян и др., 1992) і вищих рослин (Румянцева и др., 1990) в умовах мікрогравітації, які проявлялися в зміні індексу ненасиченості, а також активації ПОЛ (Жадько, 1991), можуть призводити до зниження текучості мембрани в умовах мікрогравітації (Michailenko, Zolotareva, 1998). Подібні зміни, впливаючи на її мікровязкість (Кирилов, 1997), в свою чергу, можуть вести до активації механочутливих  $Ca^{2+}$ -каналів (Hedrich et al., 1990). Внаслідок вказаних змін, очевидно, порушується баланс іонів кальцію в клітині і змінюється проникність мембран, що впливає на активність деяких ферментів, у першу чергу, на активність їх мембранозв'язаних форм, зокрема у АТФаз (Morton et al., 1996). Відмічені перебудови мембран можуть модулювати, в свою чергу, вторинні структурні зміни клітинних органел, перш за все, мітохондрій та хлоропластів. Одержані нами результати про перебудови ультраструктури клітинних органел та цитоплазматичної мембрани, активності ряду ферментів, що характеризують окисно-відновні та гідролітичні процеси в клітині в цих умовах, свідчать на користь запропонованої схеми.

Таким чином, отримані нами електронно-мікроскопічні, електронно-цитохімічні та фізіолого-біохімічні дані про стан одноклітинних організмів, їх ростові показники, структурно-функціональні перебудови клітинних органел, зміни спектру молекулярних форм та активності деяких ферментів енергетичного та вуглеводного обміну в умовах мікрогравітації і клінонстатування свідчать, що одноклітинні організми сприймають вплив мікрогравітації. Гравічутливість одноклітинних організмів проявляється в змінах структурно-функціональних особливостей клітинних органел і базується на зміні активності і направленості клітинного метаболізму, перш за все, в енергетичній системі клітин, що веде до підвищення енергизації клітин та посилення їх метаболічної

активності, забезпечуючи функціонування одноклітинних організмів в умовах мікрогравітації.

**Підсумкова частина.** Розпочаті нами дослідження на організмах, які знаходилися в умовах космічного польоту в фізіологічно-активному стані, умовно відносяться до другого, найбільш інформативного етапу розвитку космічної фітобіології, оскільки саме дослідження організмів, що росли в умовах мікрогравітації, в протилежність до досліджень на культурах у стані спокою, показали принципову можливість довготривалого розвитку одноклітинних організмів у цих умовах та післяпольотного збереження їх життєздатності. Незважаючи на те, що вивчення одноклітинних

Рис 1. Схема гравічутливості одноклітинних нерухомих організмів.

стосувалося різних аспектів їх життєдіяльності в умовах мікрогравітації, зокрема закономірностей росту, форми клітин і колоній, генетичних ефектів, модифікації клітинної репродукції, циркадних ритмів, граві- та фототропізму, кальцієвого балансу, морфологічних особливостей та ультраструктурної організації клітин, пізнання глибоких механізмів впливу мікрогравітації та з'ясування особливостей адаптації клітин до зміни гравітації залишаються на сьогодні найважливішими проблемами гравітаційної біології. Існують декілька напрямків у сучасній космічній клітинній фітобіології, актуальність яких зумовлена необхідністю подальших досліджень ефектів мікрогравітації на клітинному та субклітинному рівнях. Це, насамперед, стосується вивчення кальцієвого балансу і його ролі в механізмах сприйняття організмами гравітації, а також регуляції різних ланок їх метаболізму в умовах мікрогравітації. Одержані експериментальні дані про зміни вмісту кальцію в рослинних і тваринних організмах, включаючи людину, в тому числі і у одноклітинних організмах (Антонян и др., 1992), безумовно свідчать про його важливу роль у цих процесах, тому вимагають подальшої перевірки гіпотези про перебудову метаболічних процесів за допомогою змін концентрації і перерозподілу іонів кальцію в клітині в умовах мікрогравітації з урахуванням сучасних уявлень про роль кальцію як вторинного месенджера клітинного метаболізму.

Безперечний інтерес представляють також дослідження структурно-функціональної організації та фізико-хімічних властивостей мембран різних клітинних компонентів, у тому числі і цитоплазматичної мембрани як індуктора перебудов метаболізму клітин в умовах мікрогравітації. Виявлені на сьогодні зміни мікров'язкості, ліпідного та жирнокислотного складу мембран, інтенсифікації перекисного окислення ліпідів, що

проявляється у підвищенні рівня продуктів тіобарбітурової кислоти, а також вмісту мембранозв'язаного кальцію в клітинах в умовах мікрогравітації (що, в першу чергу, може впливати на проникність мембран у цих умовах), свідчать про перспективність і важливість досліджень стану мембрани в умовах мікрогравітації, оскільки згідно сучасним уявленням про мембрану (Merz, Roux, 1996), вона може відігравати ключову роль у гравічутливості клітин.

## ВИСНОВКИ

1. Вперше встановлена гравічутливість одноклітинних організмів, яка проявляється в зміні ростових, структурних та метаболічних показників клітин в умовах мікрогравітації та кліноостатування (16 космічних експериментів на борту біологічних супутників, космічних кораблів та орбітальних станцій "Салют" і "Мир" та 45 експериментів в умовах горизонтального кліноостатування).
2. Прокаріотичні бактеріальні клітини *P. vulgaris* реагують на зміну гравітаційної сили посиленням складчастості цитоплазматичної мембрани, збільшенням гірозності клітинної оболонки, появою зон фібрилярно-гранулярного матеріалу та формуванням компактних нуклеоїдів. Характер зміни локалізації дегідрогеназ як важливого показника рівня біологічного окислення в умовах космічного польоту свідчить про посилення проникності цитоплазматичної мембрани та перебудову метаболізму клітин *P. vulgaris* в цих умовах.
3. Реакції-відповіді на дію мікрогравітації і кліноостатування еукаріотичних клітин *Chlorella*, які протягом різної тривалості часу вирощувалися як монокультура або у складі полікомпонентних систем на різних поживних середовищах в авто- та гетеротрофному режимах, проявляються у збільшенні відносного об'єму клітинних компартментів (мітохондрій, вакуолей, ліпідних крапель, каналів ендоплазматичного ретикулуму), так і в перебудовах ультраструктури певних клітинних органел: хлоропласта (деградація крохмалю, зменшення амілогенної зони піреноїдів, перебудови мембранної системи, зміна щільності строми та поява електронно-прозорих зон), мітохондрій (збільшення популяції, розміру органел, ущільнення матриксу, впорядкування топографії крист), ядра (збільшення об'єму конденсованого хроматину, розширення перинуклеарного простору), вакуолей (збільшення загального об'єму вакуома, поява мієліноподібних структур), ендоплазматичного ретикулуму (проліферація каналів, поява дрібно-гранулярного матеріалу в порожнинах каналів) та цитоплазматичної мембрани (посилення складчастості).

4. Показана чітка залежність розмаху спектру структурно-функціональних перебудов органел від тривалості (від 4.5 діб до 12 міс) культивування *Chlorella* в умовах космічного польоту.
5. Встановлене збільшення приросту біомаси культури *Chlorella* в умовах мікрогравітації, що супроводжувалося появою ознак прискореного старіння клітин.
6. Загальною особливістю клітин *Chlorella*, вирощених в умовах мікрогравітації та кліноостатування, є зміни в ультраструктурі енергетичних органел та їх функціональній активності. В умовах симульованої мікрогравітації виявлено збільшення популяції мітохондрій та перебудови їх ультраструктурної організації, підвищення коефіцієнту співвідношення аденілатів, активності  $Mg^{2+}$ -активованих АТФаз і СДГ та рівня дихання клітин, а також розширення спектру ММФ СДГ, що свідчить про підвищення енергетичного статусу клітин *Chlorella* в цих умовах.
7. Встановлена інтенсифікація гідролізу запасних полісахаридів у хлоропластах клітин *Chlorella* в умовах мікрогравітації і кліноостатування, яка проявлялася в посиленні активності та розширенні спектру переважно розчинної фракції множинних молекулярних форм амілаз, що приводить до збільшення рівня моно- і дисукрів і свідчить про перебудову вуглеводного обміну клітин.
8. Зареєстровано явище посилення в умовах космічного польоту інфікування клітин *Chlorella* бактеріями *Pseudomonas sp.*, що може свідчити про підвищення рівня патогенності бактерій і/або зниження стійкості водоростевих клітин в умовах мікрогравітації.
9. Одержано пріоритетні дані про можливість довготривалого (до 1 року) збереження життєздатності культури *Chlorella* в умовах мікрогравітації.
10. Незважаючи на досить широкий спектр перебудов субмікроскопічної організації органел клітин культури *Chlorella* в процесі тривалого її вирощуванні в умовах космічного польоту, який відображає зміни рівня та направленості метаболізму в цих умовах, одноклітинна водорість *Chlorella* показала високі адаптаційні можливості до зміни гравітації в межах, що охоплюють весь цикл її розвитку.
11. На основі вивчення ультраструктурних та метаболічних особливостей клітин *Proteus i Chlorella* в умовах мікрогравітації запропонована концепція про роль мембрани в гравічутливості одноклітинних організмів, які не мають спеціалізованих гравірецепторних органел.
12. Встановлена висока життєздатність культури *Chlorella* протягом тривалого періоду її культивування в умовах мікрогравітації зумовлює придатність використання її як

компонента автотрофної ланки контрольованих екологічних систем життєзабезпечення людини на космічних літальних апаратах.

13. Розроблені та випробувані нами методи фіксації для електронно-мікроскопічних досліджень клітин *Proteus* та *Chlorella* на борту космічних літальних апаратів та обробки матеріалу, зокрема в умовах обмеженої його кількості, рекомендовано для використання в майбутніх космічних експериментах з одноклітинними організмами.

#### ПЕРЕЛІК ОСНОВНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л. Водоросли. // Шляпочные грибы и водоросли – объекты космической биологии. М.: Наука, 1991. – 158 - 228с.
2. Сытник К.М., Кордюм В.А., Кордюм Е.Л., Бабский В.Г., Манько В.Г., Недуха Е.М., Попова А.Ф. Микроорганизмы в космическом полете. К.: Наук. думка, 1983. – 154 с.
3. Ваулина Э.Н., Винников Я.А., Дубинин Н.П, Изупак Э.А.,Иорданишвили Е.К.,Коньшин Н.И., Кордюм В.А., Кордюм Е.Л., Машинский А.Л., Пальмбах Л.Р., Паливода Л.В., Попова А.Ф. Влияние космического полета на развивающиеся организмы. К.: Наук. думка, 1978.– 150 с.
4. Сытник К.М., Гречко Г.М., Коньшин Н.И., Кордюм Е.Л., Машинский А.Л., Мелешко Г.Й., Нечитайло Г.С., Поливода Л.В., Попова А.Ф., Шепелев Е.Я., Шетлик Н., Кордюм В.А. Биологические показатели хлореллы, выросшей в условиях космического полета // Биологические исследования на орбитальных станциях "Салют" . М.: Наука, 1984. – С. 38-43.
5. Ропова А.Ф. Chloroplast ultrastructure in *Chlorella* cells in microgravity and altered gravity // Альгология.– 1999.– Т. 9, N 9.– С. 13-18.
6. Попова А.Ф. Уровень дыхания и ультраструктура клеток *Chlorella* при длительном клиностаировании // *Доп. НАНУ. Сер. Б.* – 1999. – N 5. – С. 183-187.
7. Ропова А.Ф. Effects of altered gravity on the mitochondria ultrastructure, activity and fractional composition of succinate dehydrogenase // *J. Gravit. Physiol.* – 1999. – V. 6, N 1. – P. 145-146.
8. Попова А.Ф. Ультраструктура митохондрий и уровень дыхания клеток *Chlorella* в условиях клиностаирования // *Цитология и генетика.* – 1999. – Т.33, № 6. – С. 8-14.
9. Попова А.Ф., Мушак П.О. Ультраструктура хлоропластів та вміст білку в клітинах *Chlorella* при кліностауванні // *Доп. НАН України. Сер. Б.* – 1998. – № 5. – С. 179-182.

10. Sytnik K.M., Popova A.F. Changes of plant mitochondria ultrastructure and respiration intensity in altered gravity // *J. Gravit. Physiol.* – 1998.– V. 5, N 1. – P. 169-170.
11. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л. Особенности структурной организации клеток *Chlorella*, культивируемых в течение года в условиях космического полета // *Цитология и генетика.*– 1997.– Т. 31, № 3. – С. 3-9.
12. Popova A.F., Sytnik K.M. Peculiarities of ultrastructure of *Chlorella* cells growing aboard the BION-10 during 12 days // *Adv. Space Res.* – 1996. – V. 17, N 6/7. – P. 99-102.
13. Vasilenko A.I., Popova A.F. Energetic metabolism response in algae and higher plants species from similarity experiments with clinostat // *Adv. Space Res.*– 1996. – V.17, N 6/7. – P. 103-106.
14. Popova A.F., Kordyum E.L., Shnyukova E.I., Sytnik K.M. Plastid ultrastructure, fractional composition and activity of amylases in *Chlorella* cells in microgravity // *J. Gravit. Physiol.*– 1995.– V.2, N 1.– P. 159-160.
15. Попова А.Ф., Василенко А.В. Ультраструктура митохондрий и содержание аденилатов в клетках *Chlorella* при различных сроках клиностатирования // *Цитология и генетика.*– 1995.– Т.29, № 1.– С. 3-8.
16. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л., Сытник К.М. Ультраструктурные показатели клеток *Chlorella* в поликомпонентной системе при кратковременном их выращивании в условиях космического полета // *Доп. НАН України. Сер. Б.* – 1995. – № 5. –С. 106-108.
17. Попова А.Ф., Шнюкова Е.И. Ультраструктура хлоропластов и активность амилаз клеток *Chlorella* в условиях космического полета // *Цитология и генетика.* - 1995. – Т. 29, № 2. – С. 41-45.
18. Попова А.Ф. Особенности локализации Mg<sup>2+</sup>-активируемых АТФаз в клетках хлореллы в условиях клиностатирования // *Цитология и генетика.* – 1994. – Т 28, № 2. – С. 3-7.
19. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л., Шнюкова Е.І. Ультраструктура хлоропластів і питома активність амілаз клітин хлорели в умовах космічного польоту // *Доп. АН УРСР.* – 1993. – № 11. – С. 153-156.
20. Sidorenko P.G., Popova A.F., Klimchuk D.A., Martin G.M., Ivanenko G.F. Single cells algae and higher plant cell cultures using in space biology // Preprint Congress IAF, Budapesht, 1993. – P. 1-4.
21. Popova A.F., Sytnik K.M., Nechitailo G.S., Mashinsky A.L. The submicroscopic organization of *Chlorella* cells cultivated in solid medium under microgravity // *Adv. Space Res.*– 1992. – V.12, N 1. – P. 141-146.



22. Sytnik K.M., Popova A.F., Nechitailo G.M., Mashinsky A.L. Peculiarities of the submicroscopic organization of *Chlorella* cells cultivated on a solid medium in microgravity // *Adv. Space Res.* – 1992.– V. 12, N 1. – P. 41-46.
23. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л., Сытник К.М. Ультраструктура клеток хлореллы, растущей в трехкомпонентной водной системе в условиях космического полета // *Результаты исследований на биоспутниках.*, М.: Наука. – 1992. – С. 306-309.
24. Попова А.Ф., Сытник К.М., Кордюм Е.Л., Нечитайло Г.С., Машинский А.Л. Ультраструктурная организация клеток хлореллы, культивируемых на твердой среде в условиях микрогравитации // *Док. АН УССР.* Сер. Б. – 1991. – № 8. – С. 161-164.
25. Попова А.Ф., Иваненко Г.Ф. Ріст культури хлорели в умовах кліностагування // *Укр. бот. журн.* – 1990.– Т 47, № 4. – С. 35-37.
26. Popova A.F., Kordyum E.L., Sytnik K.M., Nechitailo G.S. The structural-functional organization of *Chlorella vulgaris* cells grown on different media in microgravity // Preprint 41th Congress IAF, Dresden, 1989. – P. 1-7.
27. Попова А.Ф., Шнюкова Е.И. Ультраструктура пластид, фракционный состав и удельная активность амилаз клеток хлореллы в условиях клиностагирования // *Цитология и генетика.*– 1989. – Т. 24, № 3. – С. 11-16.
28. Попова А.Ф., Кордюм Е.Д., Сытник К.М. Субмикроскопическая организация клеток хлореллы в поликомпонентной системе в условиях космического полета // *Докл. АН УССР.* Сер. Б. – 1989. – № 8. – С. 74-77.
29. Popova A.F., Sytnik K.M., Kordyum E.L., Meleshko G.I., Sychov V.V., Levinskykh M.A. Ultrastructural and growth indices of *Chlorella* culture in multicomponents aquatic system in space flight conditions // *Adv. Space Res.*– 1989.– V. 9, N 11.– P. 79-82.
30. Попова А.Ф., Шнюкова Е.И., Кордюм Е.Л. Ультраструктура хлоропластов, фракционный состав амилаз и удельная их активность в клетках хлореллы при клиностагировании // *Докл. АН УССР.* Сер.Б. – 1988. – № 7. – С. 78-82.
31. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Мелешко Г.Й., Сычев В.Н., Левинских М.А. Ультраструктурные и ростовые показатели хлореллы в многокомпонентной системе в условиях космического полета // *Результаты работ на биоспутнике "Космос-1887"*, М.: Наука.– 1988. – С. 58-59.
32. Попова А.Ф., Тупік Н.Д., Иваненко Г.Ф. Ультраструктура мітохондрій і фракційний склад сукцинатдегідрогенази *Chlorella vulgaris* Beijer. при кліностагуванні // *Укр. бот. журн.* – 1987. – Т. 43, № 3. – С. 11-15.
33. Сидоренко П.Г., Жадько С.И., Попова А.Ф., Карнаух И.М., Ильин В.П. Об адаптации одноклеточных водорослей и культур тканей высших растений к условиям

гипогравитации // Микрорганізму в іскусствених екосистемах, Новосибірск: Наука. – 1985. – С. 61-66.

34. Попова А.Ф., Кордюм Е.Л., Нечитайло Г.С. Субмикроскопическая организация клеток хлореллы, растущих в течение 9 суток на борту НОС "Салют-6" // Микрорганізму в іскусствених екосистемах, Новосибірск: Наука. – 1985. – С. 66-71.
35. Попова А.Ф., Иваненко Г.Ф. Ультраструктурная организация клеток хлореллы при воздействии клиноостативирования // *Цитология и генетика*. – 1983. – Т. 17, № 3. – С. 72-73.
36. Кордюм Е.Л., Попова А.Ф., Машинський О.Л. Ультраструктурна організація клітин *Chlorella vulgaris* Beijer., штам ЛАРГ-1, що вирости в автотрофних умовах на борту наукової орбітальної станції "Салют-6" // *Укр. ботан. журн.* – 1984. – Т.41, № 1. – С. 30-32..
37. Kordyum E. L., Nedukha E.M., Popova A.F., Sidorenko P.G., Fomichova V.M., Sytnik K.M. Prospects of autotrophic link functioning in biological life-support systems based on cell biology studies // *Acta Astronomica*. – 1983. – V. 10, N 4. – P. 225-228.
38. Kordyum V.A., Man'ko V.G., Popova A.F., Mashinsky A.L., Scherbak O.N., Nguen-Hgue Thyok. Changes in symbiotic and associative interrelations in a higher plant-bacterial system during space flight // *Adv. Space Res.* – 1983. – V. 3, N 9. – P. 265-268.
39. Kordyum V.A., Shepelev E.E., Kordyum E.L., Popova A.F., Meleshko G.I., Sychov V.N. Biological studies of the *Chlorella pyrenoidosa* (strain g-11-1) culture grown under space flight conditions // *Life Sci. and Space Res.* – 1980. – V. 18. – P. 281-284.
40. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Машинский А.Л., Попова А.Ф. Ультраструктура клеток *Chlorella pyrenoidosa* (штамм g-11-1), растущих длительное время в условиях космического полета // *ДАН УРСР*. Сер. Б. – 1979. – N 4. – С. 311-315
41. Кордюм Е.Л., Машинський О.Л., Попова А.Ф., Ситник К.М. Ультраструктура клітин *Chlorella vulgaris* (штамм ЛАРГ-1, які росли протягом п'яти діб в умовах космічного польоту // *Дон. АН УРСР*. Сер. Б. – 1979. – № 6. – С. 476-479.
42. Кордюм Е.Л., Попова А.Ф., Уварова С.А., Коньшин М.І. Ультраструктура клітин *Proteus vulgaris*, що вирости в анаеробних умовах в орбітальному польоті // *Дон. АН УССР*. Сер. Б. – 1979. – № 9. – С. 839-841.
43. Кордюм Е.Л., Попова А.Ф., Уварова С.А., Нечитайло Г.С. Ультраструктура клітин *Proteus vulgaris*, які вирости в аеробних умовах орбітального польоту // *Дон. АН УССР*. Сер. Б. – 1976. – № 12. – С. 1124-1126.

44. Кордюм В.А., Поливода Л.В., Кордюм Є.Л., Попова А.Ф., Манько В.Г., Машинський О.Л. Ріст і розвиток *Proteus vulgaris* в умовах космічного польоту // *Доп. АН УССР. Сер. Б.* – 1976. – № 11. – С. 1036-1039.
45. Кордюм Е.Л., Ваулина Э.Н., Гречко Г.М., Жадько С.И., Кордюм В.А., Машинский А.Л., Нечитайло Г.М., Попова А.Ф., Сытник К.М. Изменение скорости биологических процессов в условиях микрогравитации и клиностатирования. Препринт. Киев, Ин-т ботаники им. Н.Г.Холодного, 1989. – С. 1-38.
46. Кордюм Е.Л., Попова А.Ф. Водоросли – объекты космической ботаники: теоретические и прикладные аспекты // Тез. докл. 2-ой Междун. конф. "Актуальные пробл. совр. альгологии", Киев, май, 1999 // *Альгология.* – Т. 9, № 2. – С. 63-64.

Резюме. Дисертацію присв'ячено вивченню гравічутливості одноклітинних прокариотичних (бактерії *Proteus vulgaris*) і еукариотичних (два види одноклітинної зеленої водорості *Chlorella*) організмів. Досліджено ефекти факторів космічного польоту на ростові та структурно-функціональні особливості клітин у процесі вирощування їх в аеробних і анаеробних умовах (*Proteus*), а також за автотрофного та гетеротрофного режимів як монокультури або в складі полікомпонентних систем (*Chlorella*) протягом різної тривалості часу на борту штучних супутників Землі, космічних кораблів, орбітальних станцій "Салют" та "Мир". Встановлена наявність гравічутливості у цих клітин, яка проявлялася в змінах ростових, ультраструктурних та метаболічних показників клітин в умовах мікрогравітації та в модельних експериментах при кліностатуванні. На основі вивчення структурно-функціональних особливостей клітин *Proteus* і *Chlorella* в умовах мікрогравітації запропонована концепція про роль мембрани в гравічутливості одноклітинних організмів, які не мають спеціалізованих гравірецепторних органел. Виявлені високі адаптаційні можливості цієї культури до зміни гравітації в межах усього циклу її розвитку обумовлюють придатність використання культури як суттєвого компонента автотрофної ланки контрольованих екологічних систем життєзабезпечення людини на космічних літальних апаратах.

Ключові слова: Гравічутливість, бактерії, водорості, кліностатування, мікрогравітація, ультраструктура.

Диссертация посвящена изучению гравичувствительности одноклеточных прокариотических (*Proteus vulgaris*) и эукариотических (два вида одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella*) организмов. Изучены эффекты факторов космического полета на ростовые и структурно-функциональные показатели клеток при выращивании их в

аэробных и анаэробных условиях (*Proteus*), а также при автотрофном и гетеротрофном режимах как монокультуры или в составе поликомпонентных систем (*Chlorella*) на протяжении разного по длительности времени на борту искусственных спутников Земли, космических кораблей, орбитальных станций "Салют" и "Мир". Установлено наличие гравичувствительности у этих клеток, которая проявлялась в изменениях их ростовых, структурных и метаболических показателей в условиях микрогравитации. Выявлены четкие отличия ультраструктурных особенностей опытных клеток по сравнению с контрольными при оптимальных условиях роста культуры *P. vulgaris* в условиях космического полета на фоне более ускоренного деления клеток. При изменении условий культивирования бактерий (анаэробноз, добавление индикаторов роста) отмечалось ингибирование роста при микрогравитации и появление ультраструктурных перестроек клеток, которые не регистрировались в оптимальных условиях выращивания культуры. Впервые описаны перестройки субмикроскопической организации клеток зеленой водоросли при различных режимах ее культивирования в условиях микрогравитации. Установлено увеличение прироста биомассы культуры, которое сопровождалось более ускоренным ее старением в этих условиях. На основе изменений ультраструктуры и метаболизма клеток выявлена зависимость глубины перестроек клеточных органелл и широты их спектра от биологических особенностей объекта, предварительно заданных условий эксперимента и длительности выращивания организмов в условиях космического полета. Установлено, что общей особенностью клеток *Chlorella* при их культивировании в условиях космического полета и в модельных экспериментах при клиностатировании являются изменения в ультраструктуре энергетических органелл и их функциональной активности. Гравичувствительность одноклеточных организмов, базирующаяся на перестройках уровня и направленности клеточного метаболизма, прежде всего энергетической системы клетки в условиях микрогравитации, по-видимому, ведет к повышению энергизации и усилению ее метаболической активности, обеспечивая функционирование одноклеточных организмов в этих условиях. На основе изучения ультраструктурных та метаболических особенностей клеток *Proteus* и *Chlorella* в условиях микрогравитации предложена концепция о роли мембраны в гравичувствительности одноклеточных организмов, которые не имеют специализированных гравирецепторных органелл. Обнаруженные высокие адаптационные возможности культуры в пределах всего цикла ее развития к изменениям гравитации обуславливают пригодность использования культуры в качестве важного компонента автотрофного звена замкнутых экологических систем жизнеобеспечения человека на космических летательных аппаратах.

Ключевые слова: Гравичувствительность, бактерии, водоросли, клиностатирование, микрогравитация, ультраструктура.

The dissertation is devoted to the study of gravisensitivity of unicellular procaryotic (bacteria *Proteus vulgaris*) and eucaryotic (two species of unicellular green alga *Chlorella*) organisms. The effects of the spaceflight factors on the growth and structural-functional indices of the cells growing under the aerobic and anaerobic conditions (*Proteus*) and also under the auto- and geterotrophic regims as monoculture and in polycomponent system (*Chlorella*) during differnt times on board of the artificial satellite of the Earth, the space ships and orbital station "Saluyt-6" and "Mir" were investigated. The presence of gravisensitivity of these cells, which was appeared in the changes of the growth, structural and metabolic indices of the cells in microgravity and model experiments under clinorotation, was established. On the base of the study of the structural-functional peculiarities of *Proteus* and *Chlorella* cells in microgravity the conception for a role of a membrane in gravisensitivity of unicellular organisms, which do not have specialised gravireceptive organells, is proposed. Revealed high adaptative possibilities of this culture alteration in the limits of a whole cycle of its development under microgravity promote the availabilities to use this culture as a significant component of the autotrophic link of the control ecological life support system on board of space vehicles.

Key words: Microgravitation, bacteria, algae, gravisensitivity, clinorotation, ultrastructure.