

**ОЦЕНКА
ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ
ДЕЙСТВИЯ ПЕСТИЦИДОВ
НА РАСТЕНИЯ
(электрофизиологический
метод)**

**Методические указания
для студентов биологического факультета**

**МИНСК
БГУ
2011**

УДК 632.95.024(0758)
ББК 44.152.6я73
О-93

А в т о р ы:

В. М. Юрин, Т. И. Дитченко, О. Г. Яковец,
Е. Н. Крытынская, А. И. Быховец, В. А. Тимофеева

Рекомендовано ученым советом
биологического факультета
29 апреля 2010 г., протокол № 8

Р е ц е н з е н т

кандидат биологических наук *В. П. Шуканов*

Оценка избирательности действия пестицидов на растения
О-93 (электрофизиологический метод) [Электронный ресурс]: ме-
тод. указания для студентов биол. фак. / В. М. Юрин [и др.]. –
Минск : БГУ, 2011. – Режим доступа : <http://www.elib.bsu.by>,
ограниченный.

ISBN 978-985-518-383-0.

В методических указаниях дается описание механизмов избира-
тельного действия пестицидов на растения. Рассматриваются вопросы
скрининга пестицидов с разными типами биологической активности и
приводятся оригинальные приемы по ее оценке.

Предназначены для студентов биологического факультета. Будут
полезны специалистам, работающим в области химической защиты
растений.

УДК 632.95.024(0758)
ББК 44.152.6я73

ISBN 978-985-518-383-0

© БГУ, 2011

ВВЕДЕНИЕ

В борьбе за жизненное пространство и благосостояние человек создает ядовитые препараты для уничтожения вредителей. Сравнительно недавно, в середине XX в., химические средства для борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений называли ядами, затем – ядохимикатами, а в наши дни их называют пестицидами (от лат. *pestis* – зараза и *caedo* – убиваю). Они занимают особое место среди чужеродных для живых организмов соединений, которые известны как ксенобиотики.

Пестициды предназначены для воздействия на самые разные организмы: сорную растительность, насекомых, патогенные грибы и т. д. В качестве пестицидов используется более 700 химических веществ, из которых изготавливается несколько тысяч препаративных форм. В народном хозяйстве применяется более 1200 различных пестицидов.

Пестициды неизбежно вызывают глубокие изменения экосистем, так как они имеют широкий спектр токсичного воздействия на все живые организмы. Названия «фунгицид», «акарицид», «гербицид» и другие в некоторой степени условны (например, инсектицид децис имеет выраженные гербицидные свойства). Химические обработки любыми пестицидами могут вызывать нежелательный эффект, в том числе и для растений, которые пытаются защитить. Зачастую растения ослабевают и становятся подвержены вредителям.

В числе очень серьезных отрицательных последствий чрезмерного увлечения химическими методами борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками следует назвать также резкое уменьшение внимания исследователей и практиков к биологическим и агротехническим методам борьбы и к выращиванию устойчивых сортов.

Для уменьшения возможной опасности к современным пестицидам предъявляются следующие требования:

- низкая острая токсичность для человека, полезных животных и других объектов окружающей среды;
- отсутствие отрицательных эффектов при длительном воздействии малых доз, в том числе мутагенного, канцерогенного и тератогенного действия;
- низкая персистентность (низкая устойчивость в окружающей среде со временем разложения не более одного вегетационного периода).

Кроме того, рекомендуемые препараты должны характеризоваться высокой эффективностью в борьбе с вредными организмами, экономической целесообразностью использования, доступностью сырья и производства.

Тем не менее ряд пестицидов не обладают высокой избирательностью, в связи с этим могут воздействовать на любой организм.

Существует значительное количество методических указаний по оценке токсичности и эффективности пестицидов. Но в зависимости от целевого назначения они требуют подбора соответствующих тест-организмов, достаточно трудоемки и занимают много времени.

В этой связи представляется целесообразным разработать приемы и подходы, позволяющие в кратковременных опытах проводить экспрессную оценку избирательности и токсичности препаратов, используемых в качестве пестицидов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	–	аденозинтрифосфат
БТО	–	биологический тест-объект
2,4-Д	–	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
Д. в.	–	действующее вещество
Д _{сут}	–	допустимая суточная доза
2,4-ДМ	–	2,4-дихлорфеноксимасляная кислота
ДДТ	–	дихлордифенилтрихлорэтан
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИПВ	–	искусственная прудовая вода
КНВ	–	концентрация нулевого воздействия
ОБУВ	–	ориентировочный безопасный уровень воздействия вещества
ПД	–	потенциал действия
ПАВ	–	поверхностно-активные вещества
ПДК	–	предельно допустимая концентрация
ПП	–	потенциал покоя
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
РЭП	–	разность электрических потенциалов
СДП	–	скорость движения протоплазмы
2,4,5-Т	–	2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота
ТМДТ	–	тетраметилдипропилен триамин
ТХДД	–	тетрахлордиоксидибензодиоксин
ФОП	–	фосфорорганические пестициды
ХОП	–	хлорорганические пестициды
ХЭ	–	холинэстераза
ЭР	–	эндоплазматический ретикулум

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1. Общая характеристика пестицидов

Ежегодно в мире теряется огромное количество урожая: около 14 % – из-за повреждения насекомыми, 12 % – из-за болезней растений, вызываемых грибами и червями, 9 % – из-за сорняков и 10 % уничтожают грызуны. Общие потери урожая в мире оцениваются примерно в 1,8 млрд т.

В этой связи человек вынужден использовать множество химических средств защиты. Применение пестицидов, в свою очередь, приводит к их попаданию в биосферу, где живые организмы начинают испытывать на себе огромный «пестицидный пресс». Сформировался своеобразный «пестицидный парадокс», смысл которого состоит в том, что человечество, применяя пестициды, само становится мишенью их воздействия.

Важное экономическое значение пестицидов обуславливает рост объемов их производства и использования в мировом земледелии. В рамках основных групп пестицидов их применение в отдельных регионах мира в процентах от общего количества характеризуется данными, приведенными в табл. 1.1.

Создание и широкое использование синтетических органических пестицидов сыграли большую роль в интенсификации защиты растений и в повышении продуктивности сельскохозяйственного производства. Применение пестицидов дало огромный экономический эффект, привело к значительному росту производительности труда, увеличению объема производства сырья для промышленности. Высокая эффективность и универсальность, простота и практическая доступность метода уничтожения вредных организмов с помощью пестицидов, очевидность и быстрота достижения результатов привели к тому, что в 1950–60-х гг. пестициды стали основным средством защиты растений.

Однако очень быстро начали проявляться факты отрицательного воздействия массированного, а часто и неконтролируемого

использования этих продуктов. Многие пестициды накапливаются в почве, водоемах и живых организмах, возникают устойчивые популяции вредителей (это явление приобрело угрожающие темпы и масштабы), нарушаются естественные биоценозы, резко снижается их способность к саморегуляции и т. д.

Таблица 1.1

Использование пестицидов в различных регионах мира

Регион	Гербициды, %	Инсектициды, %	Фунгициды, %
Северная Америка	42,2	21,6	11,3
Западная Европа	25,5	16,0	41,4
Восточная Европа	3,8	6,1	4,3
Латинская Америка	10,0	9,6	9,4
Дальний Восток	16,6	33,1	31,2
Остальные страны	1,9	13,6	2,4

По мере того как накапливаются факты отрицательного воздействия пестицидов на биосферу, все острее встает вопрос о необходимости поиска альтернативных путей защиты растений, а также совершенствования существующих химических средств.

Во всех развитых странах усиливается внимание к поиску эффективных пестицидов, обладающих высокой специфичностью в отношении вредных организмов и максимальной безопасностью для биосферы. Начиная с 1950 г. разработано и введено в мировую практику защиты растений 512 новых действующих веществ. Если в 1950-х гг. пестициды применялись в высоких нормах расхода и были сравнительно малоэффективны, то в последнее время за счет синтеза более активно действующих молекул разработанные средства отличаются высокой эффективностью и малыми нормами расхода.

Широкое применение пестицидов, безусловно, связано с их высокой экономической эффективностью. Проведение защитных мероприятий обеспечивает в среднем прибавку урожая от 5,7 до 6,5 ц/га зерна, 40–60 ц/га картофеля, корнеплодов, плодов и овощей, 1,5–2 ц/га льноволокна при окупаемости затрат в 1,7–2 и более раза. Уровень рентабельности защитных мероприятий колеблется от 118,2 % на зерновых культурах до 205,5 % на картофеле. В мире на внесение химических средств защиты растений затрачивается в среднем 16,5 долл. на гектар. Наиболее защищаемые культуры – сахарная свекла (59 долл.), фрукты и овощи (26 долл.), картофель (24 долл.), пшеница (16 долл.).

Отмечается корреляция между показателями урожайности основных сельскохозяйственных культур и интенсивностью использования пестицидов (табл. 1.2).

Таблица 1.2

**Урожайность основных сельскохозяйственных культур
и расход пестицидов в 1990 г.**

Регион	Урожайность, ц/га	Расход пестицидов, кг/га
Япония	54,8	10,70
США	26,0	1,49
Европа	34,3	1,87
Латинская Америка	19,7	0,22
Океания	15,7	0,20
Африка	12,1	0,13
Россия	15,9	0,15
Казахстан	10,6	0,10

Такая тенденция к повышению урожайности сельскохозяйственных культур с ростом применения пестицидов в свою очередь порождает постоянное увеличение производства пестицидов. В бывшем СССР ежегодная продукция пестицидов достигла в пересчете на действующее вещество 450 тыс. т в год.

Статистика использования пестицидов в Беларуси за последние 30 лет свидетельствует, что за каждые пять лет объем защитных мероприятий (в пересчете на однократную обработку) удваивался. Аналогичная картина наблюдается и в последние годы, когда потребность в пестицидах за пять лет – с 2003 по 2007 г. – выросла практически в два раза.

В связи с ростом объема производства и применения пестицидов возникают, как уже отмечалось, проблемы, прежде всего экологические и медицинские. Это связано с высокой токсичностью, мутагенностью и канцерогенностью многих пестицидов. При изучении путей их трансформации в организмах выяснилось, что некоторые пестициды превращаются в более токсичные продукты.

Следует отметить, что глобальное значение пестицидного загрязнения связано не только с повсеместным характером применения ядохимикатов, но и с их способностью мигрировать в экосистеме и в биосфере в целом.

Как известно, в цепях питания происходит накопление пестицидов, даже если их первоначальное количество было незначительным. Человек, как конечное звено в этой цепи, получает концентрированные дозы пестицидов, особенно с мясо-молочными продуктами. Растительная продукция, проходившая обработку

пестицидами, также содержит их остатки даже при соблюдении всех санитарно-гигиенических норм. При ежедневном употреблении обычной продукции происходит накопление стойких пестицидов во внутренних органах человека, особенно в жировой ткани. Последняя является метаболически мало активной, т. е. процессы биотрансформации пестицидов в ней заторможены, что и обуславливает их высокую биоаккумуляцию.

Применение нестойких, быстроразлагающихся пестицидов не решает проблемы. Такие пестициды должны быть значительно более токсичными, чем стойкие, так как они воздействуют на вредные организмы менее продолжительное время. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире происходит около 500 тыс. случаев прямого отравления пестицидами.

Интенсивное использование пестицидов и других химических агентов привело к появлению целой системы неконтролируемых биопроцессов. Поэтому требуется совершенствование их синтеза, разработка менее опасных, но более эффективных средств защиты. Использованию промышленных и поиску новых достаточно безопасных пестицидов должна способствовать разработка эффективных методов определения их биологической активности.

Вообще, количество используемых пестицидов настолько велико, а характер их биологического действия настолько разнообразен, что приходится применять различные виды классификаций.

Пестициды разделяются по химическому составу, объектам применения, а также по способам проникновения и характеру действия.

По химическому составу выделяют три основные группы пестицидов:

1. **Неорганические соединения** – соединения меди, серы, фтора и др.
2. **Биологические препараты** – растительного, бактериального, грибного и вирусного происхождения – пиретрины, бактериальные и грибные препараты, антибиотики и фитонциды.

3. **Органические соединения** – наиболее обширная группа, к которой относятся пестициды высокой физиологической активности:

- **хлорорганические соединения** – бифентрин, дифлубензурон, клофентизин и др., – попадая в организм насекомого, действуют на его нервную систему, вызывая паралич;

- **фосфорорганические соединения** – диазинон, малатион, фозалон, формотион и др. – обладают системным воздействием: проникают в ткани растения и попадают с пищей в организм насекомого, что вызывает гибель последних;

- **синтетические пиретроиды** – перметрин, циперметрин, фенвалерат и др. – имеют сходный с хлорорганическими соединениями механизм действия, т. е. приводят к гипервозбуждению с последующим параличом;

- **карбаматы и тиокарбаматы** – пиримикарб, тетраметилдипропилентриамин (ТМДТ) и др., – как и фосфорорганические соединения, нарушают у насекомых функции нервной системы, что приводит к параличу и гибели;

- **фенилпиразолы** – фипронил и др. – блокируют рецепторы в центральной нервной системе насекомых; к этим препаратам чувствительны насекомые, имеющие резистентность (приобретенную устойчивость) к фосфорорганическим соединениям;

- **авермектины** – фитоверм и др. – замедляют передачу нервных импульсов у насекомых и клещей, которые теряют подвижность и погибают;

- **неоникотиноиды** – конфидор, актара и др. – вызывают никотиноподобные эффекты, блокируют никотиночувствительные рецепторы;

- **ингибиторы синтеза хитина** – дифлубензурон, люфенурон и др. – ингибируют синтез хитина у насекомых, что приводит к нарушению процессов линьки;

- **аналоги ювенильного гормона** – феноксикарб и др. – регулируют рост и переход насекомых из одной стадии в другую (из личинки в куколку и т. п.), препятствуют или задерживают их метаморфоз.

По объектам применения все химические вещества подразделяются на следующие группы:

- **инсектициды** – для борьбы с насекомыми;
- **акарициды** – для борьбы с клещами;
- **инсектоакарициды** – для защиты растений одновременно от вредных насекомых и клещей;

- **овициды** – для уничтожения яиц вредных насекомых и клещей;
- **ларвициды** – для уничтожения личинок насекомых и клещей;
- **фунгициды** – для борьбы с грибными заболеваниями;
- **бактерициды** – для борьбы с бактериями;
- **гербициды** – препараты для уничтожения нежелательной растительности;

- **феромоны** – препараты для привлечения насекомых;
- **репелленты** – препараты для отпугивания насекомых;
- **дефолианты** – препараты для удаления листьев и др.

Классификация по объектам применения в какой-то степени условна, так как многие пестициды обладают универсальностью действия и поражают как насекомых, так и личинок, и клещей.

Все пестициды подразделяются также на две группы: контактного и системного действия.

К **контактным** относятся химические вещества, вызывающие гибель или подавление вредных организмов при контакте с ними.

Системные пестициды способны проникать в живые системы, перемещаться в их тканях и вызывать гибель вредного организма (нежелательного растения, возбудителя болезни, вредителя). К ним относятся фосфамид, беномил, фенаримол, биопрепараты и др.

Пестициды классифицируются также по характеру взаимодействия с организмом.

Так, инсектициды подразделяют на кишечные, контактные и фумиганты:

- **кишечные** инсектициды вызывают отравление вредных насекомых при поступлении в организм вместе с пищей;

- **контактные** инсектициды вызывают гибель насекомых при непосредственном контакте с ними, проникая через кожные покровы (нитрофенолы, фозалон, хлорофос, карбофос и др.);

- **фумиганты** – химические вещества, проникающие в организм насекомых и животных через дыхательные пути в виде газа или пара (бромистый метил и др.). К ним относятся и инсектоакарициды фумигантного действия, которые также вызывают отравление вредных насекомых и клещей при поступлении через органы дыхания.

Данная классификация тоже до некоторой степени условна, так как многие пестициды обладают кишечным, контактным и фумигантным действием.

Фунгициды по характеру воздействия на возбудителей подразделяются на **защитные** (профилактические) и **лечащие** (искореняющие, терапевтические).

Защитные контактные фунгициды не проникают в растение, а остаются на его поверхности и действуют на возбудителя при непосредственном контакте с ним. Защитные системные фунгициды проникают в растение и предотвращают поражение частей, удаленных от места нанесения фунгицида. Лечащие фунгициды способны уничтожать фитопатогенные организмы, уже внедрившиеся в растительные ткани. Как и защитные, они подразделяются на контактные и системные. Лечащие контактные фунгициды можно

подразделить на препараты **избирательного** и **неизбирательного** (сплошного) действия.

Гербициды разделяют на препараты **селективного** и **сплошного** действия. Первые оказывают действие на сорные растения, вторые уничтожают всю растительность.

Наиболее широкое распространение получили два класса пестицидов – фосфорорганические (ФОП) и хлорорганические (ХОП).

Потенциальными источниками достаточно тяжелых отравлений людей как в условиях сельскохозяйственного производства, так и в быту выступают ФОП. Бытовые отравления хлорофосом характеризуются высокой степенью летальности (20–30 %). В основе токсического действия ФОП лежит их взаимодействие с холинэстеразой (ХЭ), ведущее к торможению ее активности. Ингибирование ХЭ с последующим быстроразвивающимся нарушением метаболизма ацетилхолина дает основание рассматривать ФОП как синаптические яды, подавляющие передачу нервного импульса в холинреактивных системах.

В свою очередь, наличие холинэстеразной активности у растений может снижать их продуктивность при использовании ФОП.

Повреждающее действие ФОП оказывают на транспортно-барьерные свойства биологических мембран, стимулируют в них перекисное окисление липидов, приводящее к нарушению их функционального состояния и т. д. В идеальном случае ФОП, как и другие пестициды, должны характеризоваться безопасностью для человека, животных, культурных растений и значительной токсичностью по отношению к вредным организмам.

Особенности биотрансформации этих соединений во многом определяют характер их воздействия на биологические объекты. Разнообразие метаболических превращений ФОП, участие в этих процессах разнородных ферментативных систем и их выраженные видовые особенности во многом определяют избирательность токсического действия.

К положительным моментам следует отнести быструю деградацию ФОП в почве; не отмечено сколько-нибудь существенного их накопления в среде (в почве). Хотя даже непродолжительное сохранение ФОП в почве ведет к последующему проникновению их в культивируемые на обработанных площадях растения, в грунтовые воды и атмосферу. Доказана возможность появления ФОП в моркови, рапсе, луке при их использовании в качестве инсектицидов.

Перемещение в растения является не единственным путем миграции ФОП. Достаточно быстро ФОП мигрирует по профилю почвы, где происходит интенсивная деградация (в отличие от хлорированных пестицидов). При попадании ФОП в водоемы их деградация идет преимущественно по гидролитическому пути.

Тем не менее ФОП могут представлять серьезный источник экологической опасности для человека. Главным образом эта опасность становится реальной в результате нарушения норм и правил применения пестицидов, а также условий их хранения, что влечет за собой их нерегламентированное попадание в окружающую среду.

В качестве пестицидов ХОП стали применяться достаточно давно; классическим представителем этой группы является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). ДДТ относится к числу чрезвычайно активных препаратов с инсектицидным действием. Это соединение было синтезировано О. Цейдлером в 1874 г., а в 1930 г. П. Мюллер установил его инсектицидные свойства. В 1939 г. ДДТ был признан перспективным препаратом, а на следующий год началось его практическое применение.

По некоторым данным, в настоящее время их распылено в атмосфере около 3 млн т. Высокая устойчивость, низкая растворимость в воде, выраженная липофильность – все это привело к тому, что и в настоящее время этот ксенобиотик является одним из основных загрязнителей окружающей среды. Во многих странах, в том числе и в СССР, применение ДДТ было запрещено уже в 1960-х гг.

ДДТ представляет собой типичный контактный яд, который сравнительно быстро проникает через кожу, нарушает нормальный цикл в мембранах нервных клеток, влияя, вероятно, на Na^+ -насос, поэтому после возбуждения не происходит восстановления первоначальной величины потенциала покоя. Токсическое действие ДДТ на нервную систему у разных организмов проявляется неодинаково. До сих пор окончательно не установлено, влияют ли ХОП в концентрации 0,01–10,0 мг/кг в молоке матери на состояние ребенка или, попав в половые железы (гонады), вызывают ли нарушение деторождаемости. Но в экосистемах эти вещества оказывают значительное влияние на животные организмы. Специалисты считают, что ХОП, особенно в высоких концентрациях, приводят к повреждению репродуктивной системы.

Для ХОП характерна высокая кумулятивная способность, что и определяет возможность хронических отравлений. Токсичность ХОП для человека довольно высока. Так, эндрин вызывает у лю-

дей судороги при попадании внутрь в дозе около 2 мг/кг, ДДТ провоцирует аналогичный эффект в дозе 16 мг/кг, минимальная летальная доза токсифена – 2–7 г.

Сохранность ХОП в почве определяется рядом факторов (кислотностью, структурой, степенью минерализации, температурой, количеством осадков, составом микрофлоры и т. д.). Длительное пребывание ХОП в почве приводит к накоплению их в культурных растениях.

У человека ХОП поражают нервную, пищеварительную, кроветворную и сердечно-сосудистую системы. Являясь высоколипофильными соединениями, ХОП вызывают повреждения биологических мембран. Большинство этих соединений стимулируют пролиферацию эндоплазматического ретикулума (ЭР) и индуцируют микросомальные оксидазы, в частности цитохром Р-450.

Следует отметить, что ХОП влияют и на активность ряда ферментов. Некоторые исследователи рассматривают изменения активности ферментных систем углеводно-фосфорного обмена в качестве раннего показателя интоксикации некоторыми ХОП.

Также наблюдались и массовые отравления, вызываемые ХОП. Так, в Турции в 1960-х гг. после употребления в пищу семян, обработанных гексахлорбензолом, заболело более 50 тыс. детей. Симптомы болезни проявлялись в усилении пигментации кожи лица, изъязвлении, нарушении функционирования печени, возникновении неврологической симптоматики.

Таким образом, пестициды, созданные для защиты сельскохозяйственных растений, сами вызывают негативные эффекты.

Высокие требования к экологической безопасности пестицидов диктуют необходимость постоянного совершенствования химических средств защиты растений, их форм и технологий применения. Для уменьшения норм расхода пестицидов и снижения токсикологической нагрузки фирмы, производящие химические средства защиты растений, идут по пути поиска не только селективных соединений из разных химических групп, но и по пути совершенствования и создания более прогрессивных препаративных форм, замены традиционных средств (смачивающие порошки, концентраты эмульсий) новыми.

Создается новое поколение препаративных форм средств защиты растений на основе **нанодисперсных полимерных систем**, обладающих повышенным биоцидным действием, например против фитопатогенов. Всероссийский НИИ защиты растений совместно с

Институтом высокомолекулярных соединений РАН разрабатывают нанодисперсные композиции в качестве новых препаративных форм химических средств защиты растений, обладающих повышенной биологической активностью, пролонгированным защитным действием, полифункциональными свойствами.

Предлагается новый подход к созданию эффективных средств защиты растений путем наноструктурирования биологически активных веществ в ходе комплексообразования с водорастворимыми функциональными полимерами. Предлагаемый подход направлен на модификацию биологически активных веществ водорастворимым синтетическим полимером в целях усиления их биологической активности и создания новой препаративной формы.

Существует несколько подходов наноструктурирования биологически активных веществ с использованием функциональных биосовместимых полимеров. Один из подходов создания наноразмерных структур основывается на формировании полиэлектролитных комплексов полимеров с дифильными химическими структурами биологически активных веществ; другой – на синтезе наночастиц биогенных элементов и получении их нанодисперсных композитов, стабилизированных водорастворимыми нанополимерами.

Классическими биологически активными соединениями являются ионогенные поверхностно активные вещества (ПАВ), несущие положительный или отрицательный заряд и гидрофобный радикал. Макромолекулы водорастворимых полимеров также могут иметь ионогенные группы и соответственно положительные или отрицательные заряды. При взаимодействии молекул ионогенных ПАВ с макромолекулами, несущими противоположный заряд, формируются обратимо диссоциирующие комплексы полимер-ПАВ, образующие надмолекулярные наноразмерные структуры мицеллярного типа с размерами частиц 10–100 нм. Определенный вклад в образование таких систем вносят электростатические, а также гидрофобные взаимодействия заряженных макромолекул с дифильными структурными элементами ПАВ. Надмолекулярная организация, стабильность системы, ее физико-химические свойства зависят от химического строения ПАВ и полимера, а также от величины и характера распределения зарядов по цепи макромолекулы, наличия поливалентных низкомолекулярных неорганических ионов и ряда других параметров.

Этот подход был реализован в создании полимерных препаратов «Катазар» и «Катазар Ф». В полимерном защитно-стимулирующем

препарате «Катазар» в наночастицы катапола включена янтарная кислота, придающая ему регулирующие рост свойства. «Катазар» предназначен для предпосевной обработки зерновых, овощных культур и картофеля и защиты их от комплекса грибных и бактериальных болезней. Выявлена высокая биологическая эффективность действия препарата. Изучение биологической эффективности препарата «Катазар Ф» по отношению к бактериальной гнили томата свидетельствует о его высоком защитном эффекте.

Благодаря переводу действующих веществ композиций в наноструктурное состояние полученные препаративные формы обладают повышенной проникающей способностью и пролонгированным защитным действием.

Таким образом, на основе нанодисперсных полимерных систем с включенными в их структуру биологически активными веществами можно создавать новые, экологически безопасные, препаративные формы химических средств защиты растений с повышенной биологической эффективностью.

1.2. Механизмы избирательного действия химических соединений

За миллионы лет эволюции органического мира в результате естественного отбора появилось множество высокоизбирательных молекул, обеспечивающих функционирование живой клетки. Избирательным действием должны обладать все гербициды, фунгициды и инсектициды, используемые в сельском хозяйстве.

Избирательность вещества – это его способность воздействовать на клетки, ткани, организмы только одного определенного типа и не влиять на другие, даже находящиеся в контакте с первыми. Избирательно действующих веществ известно уже немало.

Существуют три основных фактора (механизма), определяющих возможность проявления избирательного действия вещества. Соединение может, во-первых, избирательно накапливаться и распределяться в различных клетках, органах и т. д., во-вторых, вмешиваться в биохимические процессы, происходящие в живых организмах, и, в-третьих, взаимодействовать с цитологическими структурами, существующими только в определенных видах клеток и в организмах.

Избирательность действия, обусловленная накоплением и распределением вещества. Может быть вызвана морфологическими особенностями. Например, сильная опушенность сорняков по

сравнению с культурными злаками или относительно большая (в расчете на единицу веса или объема) уязвимая поверхность тела насекомых по сравнению с млекопитающими приводит к большой площади контакта распыляемого агента с вредным видом.

Этот тип избирательности основывается на различии в распределении и накоплении. Агент, токсический как для полезных, так и для вредных клеток, накапливается только в последних. Иногда полезные и вредные клетки находятся в организмах разных видов.

Много лет тому назад во Франции было обнаружено, что водный раствор серной кислоты можно применять для борьбы с сорняками на полях. При опрыскивании поля пшеницы 10% -ным раствором серной кислоты из расчета 13 000 л/га на обработанном участке поля сорняков не было, а необработанная часть зарастала цветущей дикой редькой.

Безусловно, серная кислота повреждает цитоплазму и пшеницы, и сорняка. Однако листья пшеницы имеют гладкую и скользкую поверхность, а у двудольных сорняков она грубая и морщинистая; поэтому серная кислота скатывается с побегов пшеницы и задерживается на сорняках. Кроме того, нежные молодые ростки хлебных злаков защищены листочками и находятся ближе к земле, у основания растения, тогда как точка роста двудольных – на верхушках побегов, где они оказываются более уязвимыми. Таким образом, сорные травы гибнут, а полезные растения выживают в результате избирательного действия, которое целиком определяется различиями в распределении токсического вещества.

На примере избирательного действия серной кислоты видно, что даже самый маленький по размеру ион водорода может проявить избирательность.

Различные процессы распределения как эндогенного, так и экзогенного характера протекают в растениях. Примером последнего может служить распыление пестицидов и других токсических веществ. В этом случае значительная часть поверхности растений, защищенная другими частями этих же растений, остается необработанной. И все же влага и ветер способствуют перераспределению распыленного вещества. Так как поверхность растений заряжена отрицательно, то эффективное распределение достигается преимущественно для веществ, молекулы которых заряжены положительно (например, бордоская жидкость).

Избирательность, обусловленная биохимическими процессами. На первый взгляд многие биохимические процессы у всех живых существ, будь то животные, растения или микробы, протекают

одинаково, поэтому биохимия не представляет возможности для проявления избирательного действия. Действительно, первичной единицей жизни во всех ее проявлениях служит клетка (даже вирусы паразитируют в клетках, обеспечивая себе питание и размножение). Все виды живого содержат нуклеиновую кислоту, в которой закодирована вся информация о функциях данного организма. Известно, что такие вещества, как колхицин, нарушают митоз у всех организмов на одной и той же стадии. Точно так же одинаково протекают во всех клетках катаболические процессы, а также процессы гликолиза. Аденозинтрифосфат служит универсальной «валютой» в энергетическом обмене.

Однако каким бы поразительным не казалось это сходство, тот факт, что все виды живого отличаются друг от друга по внешнему виду и функционируют по-разному, свидетельствует о наличии отдельных биохимических различий между ними; даже в разных тканях одного организма биохимические процессы протекают неодинаково.

Избирательность действия ксенобиотиков определяется различиями в процессах их биотрансформации, а также зависит от их влияния на какой-либо важный биохимический процесс, который у чувствительного организма имеется, а у устойчивого или отсутствует, или не столь чувствителен к данному веществу.

На сегодняшний день из трех рассматриваемых нами факторов (накопление и распределение, биохимический, цитологический) избирательного действия химических соединений наиболее изученным оказался биохимический. Это связано с успехами биохимической науки, в результате чего в настоящее время установлен целый ряд соединений, действие которых определяется протеканием метаболических процессов в клетке и организме в целом.

Так, известны вещества, влияющие на синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), ингибирующие начальные стадии синтеза, останавливающие как ее репликацию, так и транскрипцию, разрушающие ДНК (повышается температура плавления, вязкость, уменьшается плотность). Также известны вещества-ингибиторы синтеза рибонуклеиновой кислоты (РНК), ингибиторы синтеза белков, ферментов, различных путей катаболизма (метаболизм азота и фосфора), метаболизма углеводов, липидов, цикла трикарбоновых кислот, транспорта электронов и т. д.

В этой связи рассмотрим некоторые примеры избирательности, основанные на биохимическом действии пестицидов. Механизм

инсектицидного действия ДДТ связан с его способностью блокировать ионные каналы у холонокровных. Избирательность действия ДДТ обусловлена тем, что при более высокой температуре, которую имеют тела теплокровных, не образуется донорно-акцепторной связи между бензольными кольцами препарата и противоположно заряженной поверхностью мембраны около устья канала.

Одним из избирательных эффектов ДДТ, проявляющихся у птиц, является наблюдаемое под его действием нарушение кальциевого обмена, вследствие чего яичная скорлупа оказывается более тонкой. Такие яйца при насиживании раздавливаются, и птицы не выводят птенцов.

Нарушает ДДТ и некоторые важные процессы в растениях. Так, например, он подавляет фотосинтез у водорослей.

Наглядным примером биохимической избирательности, связанным с процессом биотрансформации, является случай, когда устойчивый организм способен разрушать ксенобиотик до нетоксичных соединений, а чувствительный – не способен. Хорошо известно, что растения кукурузы обезвреживают гербицид симазин, гидролизуя в его молекуле хлор в положении 2 до гидроксигруппы. Прямо противоположным образом обстоит дело, когда ксенобиотик не обладает токсичностью и превращается в токсическое соединение в самих организмах, после чего убивает их; в таких ситуациях любой организм, не способный осуществлять это превращение, будет устойчив к данному веществу.

Известно, что некоторые растения способны осуществлять β -окисление хлорфеноксиалкилкарбоновых кислот, при котором от боковой цепи отщепляется в каждом цикле окисления двууглеродный фрагмент. Если исходная цепь содержит за вычетом карбоксильной группы нечетное число атомов углерода, то конечным продуктом β -окисления оказывается всегда токсичное производное уксусной кислоты; если же она содержит четное число атомов, то образуется слаботоксичное производное.

Но не все растения способны осуществлять β -окисление хлорфеноксиалкилкарбоновых кислот. Поэтому если обработать бобовую культуру и присутствующие сорняки дихлорфеноксимасляной кислотой (2,4-ДМ), имеющей в боковой цепи три промежуточных атома углерода, то в сорняках это соединение превратится в дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), которая их убьет; в бобовых она остается неизменной и соответственно не причинит вреда.

Другой пример биохимической избирательности, связанный с процессами биотрансформации, можно продемонстрировать на характере действия инсектицидов. Механизм избирательного действия большинства самых эффективных фосфорорганических инсектицидов основан на метаболических превращениях. Биотрансформация, которая происходит у насекомых, делает для них эти соединения более токсичными, тогда как в организме млекопитающих эти инсектициды превращаются в менее токсические производные.

У бактерий и растений ароматические аминокислоты – фенилаланин и триптофан – образуются из гликолиевой кислоты. Млекопитающие не способны синтезировать бензольное кольцо и поэтому вынуждены получать эти две аминокислоты с пищей. Так как шикимовая кислота не участвует в метаболизме млекопитающих, ее биосинтез и метаболизм являются прекрасными мишенями для избирательно токсических агентов.

Рассматриваемые фрагментарные примеры биохимических различий, характерные для живых организмов, носили в основном качественный характер. Однако даже в тех случаях, когда у двух видов используются одинаковые метаболические пути, между ними могут существовать количественные различия, например, в способности к накоплению или в метаболизме.

Цитологические различия как основа избирательного действия. Известно, что строение клеток у животных и растений различно. Клетки состоят из отдельных компонентов (клеточных органелл, компартментов и др.), у которых видовые особенности выражены очень четко. Различаются между собой даже клетки одного организма, но разных тканей.

У растений нет нервной системы и мышечных клеток. Поэтому фосфорорганические соединения, блокируя проведение нервного импульса, поражают насекомых и не приносят заметного вреда растениям. На этом явлении основана весьма эффективная система химической защиты растений от насекомых.

Однако у растений, в отличие от насекомых и животных, имеются клеточная стенка, хлоропласты и механизмы, осуществляющие фотосинтез.

Уникальность такой структуры, как хлоропласт, представляет возможность, например, для уничтожения растений (сорняков), не причиняя вреда пчелам. В последние годы разработаны многочисленные гербициды, избирательно нарушающие процесс на стадии

реакции Хилла и, следовательно, совершенно безвредные для млекопитающих. К широко распространенным гербицидам, в основе действия которых лежит ингибирование реакции Хилла, относятся фенилмочевины, триазины, урацилы и др. В этом случае гербициды обратимо связываются с мембраной хлоропластов вблизи вторичного акцептора электронов (хинона В) и блокируют перенос электронов. Такие гербициды нетоксичны для млекопитающих.

У многоклеточных клетки организуются в ткани и органы, что обеспечивает очень важную возможность разделения функций. Их дальнейшая дифференцировка происходит на клеточном уровне между различными типами клеток – нервными, мышечными, эпителиальными и др.

Кроме того, клетки различаются, как уже отмечалось, по своей структуре. Так, наличие клеточной стенки – это особое свойство растений, отличающее их от других организмов. Клеточная стенка обеспечивает клеткам большую прочность. Но даже при наличии клеточной стенки она, в зависимости от принадлежности к тем или иным жизненным формам (растения, грибы, бактерии), значительно отличается по химическому составу. Клеточные стенки многоклеточных растений состоят из микрофибрилл целлюлозы различной длины, включенных в амфотерный матрикс из целлюлозы и пектинов. Клеточная стенка грибов представляет собой мозаику из различных углеводов с отдельными включениями липидов и белков. У дрожжей клеточные стенки состоят из двух тесно прикрепленных структур. Одна из структур состоит целиком из глюкана (полиангидрид глюкозы), вторая представляет собой маннанпротеиновый комплекс, компоненты которого соединены между собой дисульфидными связями.

Различие функций организма существует не только на уровне определенных типов клеток или органов, но и внутри клеток. Благодаря наличию внутри клетки специализированных отделов (компарментов), отделенных друг от друга избирательно проницаемыми мембранами, в ней могут одновременно протекать различные взаимоконкурирующие реакции.

Метаболические реакции, протекающие в определенном порядке при участии ферментов в отдельных компартментах на поверхности раздела фаз и на мембранах органелл, могут подавляться различными ксенобиотиками.

Таким образом, цитологические различия могут во многом обеспечивать избирательность действия веществ. По сравнению с

клетками эукариот размеры бактерий настолько малы, что в них просто нет места ни для ядра, ни для митохондрий, и ДНК находится в единственной хромосоме, прикрепленной к плазматической мембране. Эта мембрана выполняет и функции митохондрий по разложению метаболитических веществ и накоплению энергии. В отличие от бактерий у клеток высших организмов органеллы защищены мембранами.

Даже у млекопитающих избирательность веществ по отношению к разным тканям связана со значительными различиями в форме и строении клеток.

Большое влияние на избирательность действия оказывают свойства самого ксенобиотика, в частности, степень его ионизации. Ионы не образуют с местами связывания ковалентных связей и, следовательно, могут легко отрываться. Поэтому для поддержания активного центра в насыщенном состоянии необходимо, чтобы в растворе, окружающем место связывания, постоянно находился избыток данных ионов.

Ионизация может способствовать проявлению избирательности действия и в тех случаях, когда место действия ксенобиотика (лекарственного препарата) имеет необычное значение pH, как, например, в желудочном соке или моче. Клетки с повышенной кислотностью (патогенные) могут поглощать катион 4-додецилпиридина, который обладает выраженными поверхностно-активными свойствами и может воздействовать на эти клетки.

Из свойств, отличающих ионы от неионизированных молекул, которые определяют избирательность действия, можно отметить:

- ковалентную реакционную способность (образование и разрыв ковалентных связей);
- адсорбцию на поверхности;
- проникновение (транспорт) через мембраны.

Разрыв ковалентных связей ферментами сильно влияет на избирательность действия агентов, так как при этом они могут превращаться в более активные или, наоборот, инертные вещества. Однако поскольку реакции с ионами и молекулами различаются очень сильно, изменения pK_a внутри серии ксенобиотиков могут привести к существенным различиям в их действии.

Многие чужеродные вещества действуют непосредственно на поверхность клетки, адсорбируясь на плазматических мембранах. Существуют два вида адсорбции: специфическая и неспецифическая. При неспецифической адсорбции нейтральные молекулы

адсорбируются сильнее, чем ионы. Это происходит потому, что ион гидролизуется сильнее, чем соответствующие неионизированные молекулы, которые в этом случае легче выделяются из воды.

Специфическая адсорбция свойственна гидрофильным веществам. Простейший пример – притяжения ионов к противоположно заряженным участкам поверхности. В таком случае ион будет адсорбироваться сильнее, чем неионизированная молекула.

Проникновение ксенобиотиков в клетку зависит от типа мембраны, определяемого функционированием соответствующих транспортных механизмов. Трудность прохождения иона через липопротеидную мембрану обусловлена несколькими причинами: ионы имеют относительно большую величину вследствие гидратации; заряд ионов аналогичен по знаку той части белковой поверхности, к которой он приближается (что приводит к отталкиванию), либо противоположен (что приводит к его фиксации). Поэтому незаряженные молекулы с малой молекулярной массой обычно легко проникают через мембраны.

Нитрофенолы проявляют свое биологическое действие за счет ионизации с образованием аниона и сильно ингибируют реакцию Хилла при фотосинтезе. Однако было обнаружено, что при слишком высокой степени ионизации их активность теряется полностью. Это явление объясняется тем, что эти соединения легче проникают через мембрану в виде неионизированных молекул, а далее действуют как анионы. Такой механизм действия характерен для некоторых гербицидов: бензимидазолов, пуринов, пиразолов, имидазолов, триазолов, бензотриазолов.

Подобные результаты были получены и для оснований. Так, пириметамин, имеющий величину pK_a 7,2, лучше поглощается клетками из достаточно щелочных растворов, где он находится преимущественно в виде неионизированных молекул. Однако ключевой фермент (дегидрофолатредуктаза), находящийся внутри клетки, ингибируется только катионами.

Таким образом, ионы могут хорошо проходить при наличии в мембранах ионных каналов, систем активного транспорта (АТФаз) и другие, т. е. избирательность действия в этом случае будет зависеть не только от степени ионизации молекулы ксенобиотика, но и от типа мембраны, через которую вещество поступает внутрь клетки.

Многократное применение препаратов сходного механизма действия приводит, например, к отбору инсектицидоустойчивых популяций фитофагов. Это свойство вредителя принято на-

зывать приобретенной устойчивостью или резистентностью. Ее следствие – потеря биологической эффективности препарата. Если вредитель устойчив к препаратам других химических групп, характеризующихся подобным механизмом действия, то это явление называют перекрестной приобретенной устойчивостью или кросс-резистентностью.

1.3. Тестирование биологической активности химических соединений

Желаемое соотношение объема внедрения новых чужеродных соединений в практику человеческой деятельности, а следовательно в биосферу, и объема внедрения новых знаний характеризуется принципом «песочных часов», где песчинки символизируют новые химические соединения. Верхняя сфера этих часов – область, где создаются эти новые химические соединения, нижняя – область, где они применяются. Узкий перешеек – область, где определяется биологическая активность веществ. Перетекают только те песчинки-соединения, которые перешли перешеек, другого пути нет. Время накопления действующего химического потенциала страны должно определяться пропускной способностью «перешейка», т. е. мощностью системы биологических испытаний. В практику должны вводиться только те соединения, которые подверглись биологическим испытаниям, и только в соответствии с результатами этих испытаний. Таким образом, биологическим испытаниям должны подвергаться все синтезируемые ксенобиотики, т. е. необходимо создать производительную систему их испытаний на разные виды биологической активности. Назначение системы испытаний – формирование информационного массива фундаментальных научных знаний о биологической активности и паспортизация каждого из ксенобиотиков по видам биологической активности.

Для осуществления указанных целей необходимо эффективное массовое испытание химических соединений на биологическую активность.

Проверка большого массива ксенобиотиков на один или несколько видов биологической активности получила название скрининга.

Идея скрининга возникла достаточно давно, в период становления химической индустрии она уже прочно завоевала себе место в умах фармакологов.

Таким образом, проверка большого массива химических соединений получила в XX в. свое развитие как один из основных методов поиска новых химических соединений с заданным типом биологической активности.

Экономическая эффективность скрининга увеличивается, если растет число тестируемых активностей, и скрининг становится многоцелевым с учетом потребности различных областей народного хозяйства: фармакологии, сельского хозяйства, микробиологической промышленности, охраны окружающей среды и т. д.

Системное определение биологической активности большого массива соединений может быть осуществлено путем создания высокопроизводительной системы их классификации по характеру биологической активности. Каждый ксенобиотик обладает определенными видами и степенью биологической активности. Мы должны выявить эти свойства и предсказать возможность практического использования данного соединения или дать прогноз его возможной роли в окружающей среде.

Система тестирования ксенобиотиков по видам биологической активности может включать два взаимосвязанных подхода. Первый – уровень целевого объекта испытаний (человек, животное, растение, биогеоценоз), на который должно быть направлено действие искомого ксенобиотика, исходя из целей поиска (лекарства, ветеринарное средство, гербицид и т. д.), и второй подход – совокупность тест-объектов, базирующихся на использовании более примитивной организации живой материи, чем целевой. Использование второго подхода оправдано в тех случаях, когда первый не обеспечивает достаточной производительности и т. д.

Однако эти реальные подходы ограничиваются одним или несколькими видами биологической активности и сравнительно малой выборкой ксенобиотиков из массива.

Очевидно, что ксенобиотики обладают весьма разнообразной биологической активностью. Отсюда вытекает необходимость создания производительной системы, способной определить и с достаточной степенью точности прогнозировать наличие или отсутствие у каждого соединения набора видов биологической активности.

Существует ряд особенностей, затрудняющих индустриализацию процесса биологического испытания соединений на целых организмах, в частности на животных. К ним относятся следующие:

- необходимость большого количества животных в качестве тест-объектов;

- затрата большого количества исследуемого химического соединения. Как правило, на первых порах синтезируются десятки – сотни миллиграмм вещества;

- ограниченность автоматизации процесса;

- необходимость достаточно длительного срока воздействия, так как единичный акт испытания химического соединения на животных мало управляем во времени.

Таким образом, работая с небольшими массивами химических соединений и определяя сравнительно немного видов активности, для достижения любой из названных выше целей можно использовать животных как основной тест-объект.

Однако индустриальные масштабы испытаний и их промышленная организация требуют введения нового принципа, который позволил бы на порядки увеличить производительность системы и обеспечить возможность работы с малым количеством испытуемого вещества.

Поэтому возникает необходимость обратиться к исследованиям на тканевом, клеточном, молекулярном уровнях строения живого, что, в свою очередь, необходимо для выяснения механизма действия конкретного ксенобиотика.

Вот здесь вступает в силу использование принципа качественного подобия – эпиморфизма тест-объекта и целевого объекта в отношении определенного биологического свойства ксенобиотика.

Принцип эпиморфизма – принцип конструктора: из небольшого числа деталей построить как можно большее количество фигур. Возможности принципа эпиморфизма довольно велики, поскольку основные молекулярные структуры и субклеточные образования в большей степени единообразны у самых разных живых объектов.

Главные методологические трудности при использовании эпиморфных моделей заключаются в том, чтобы определить оптимальный уровень детализации модели по отношению к моделирующему процессу, т. е. целостному организму. Этого можно достичь, исходя из того, что в системе тест-объектов на клеточном уровне организации представляются все царства живого и основные типы тканей организма человека, а также из того, что у тест-объектов в совокупности определяются все основные реакции (гибель, повреждение, адаптация, изменение проницаемости мембран, метаболизм ксенобиотиков, синтез белка и ДНК, возбудимость и т. д.).

Когда мы говорим о биологической активности ксенобиотиков, то для ее определения, естественно, необходимы тест-объекты,

на которых регистрируются определенные виды биологической реакции (гибель, изменение роста, изменение различных метаболических реакций и т. д.) при их действии; эти реакции часто называются тест-реакциями. В этой связи следует рассмотреть принципы отбора и стандартизации тест-объектов при классификации ксенобиотиков по видам биологической активности.

Совокупность набора тест-объектов клеточно-тканевого уровня должна удовлетворять главному принципу системы – представительности выбранных биологических тест-объектов (БТО) по отношению к моделям биосферы и организму человека с соответствующим набором характеристик (тест-реакций), т. е. максимально удовлетворять поставленным задачам. К настоящему времени разработан достаточно широкий набор тест-объектов и соответствующих тест-реакций, позволяющих классифицировать химические соединения по характеру их действия.

Классификация ксенобиотиков по видам биологической активности по-новому ставит вопрос о подборе и стандартизации тест-объектов. Система должна обеспечить возможность сопоставления результатов испытаний на биологическую активность разных соединений, проведенных в разные годы. Очевидно, этого можно достигнуть только в том случае, когда уровень стандартности тест-объектов очень высок в течение многих лет. Именно степень воспроизводимости и стандартность тест-объектов определяют надежность принимаемых решений и степень автоматизации системы (возможно, в большей степени, чем ЭВМ).

И если с молекулярными тест-объектами это сделать проще, то объекты клеточно-тканевого уровня организации – «живые». Как все живое, они непрерывно развиваются, подвергаются сильному влиянию эндогенных и экзогенных факторов, физиологическое состояние тест-объектов подвержено сезонным колебаниям и т. д.

Каждый тест-объект индивидуален, что приводит к целому ряду затруднений при регистрации его характеристик, интерпретации данных, выявлении их соответствия поставленным целям и т. д.

Существует ряд методических подходов для стандартизации, подбора, приготовления тест-объектов, например: выбор наиболее щадящих условий выделения и инкубации; использование дополнительных воздействий, переводящих тест-объект в заданное состояние; нормирование регистрируемых параметров (приведение к норме); выбор тест-реакций, минимальным образом зависящих от индивидуальности тест-объектов и т. д.

В конечном итоге для каждого тест-объекта клеточно-тканевой природы необходимо создать формализованный стандарт в виде набора количественных параметров, характеризующих показатели тест-объектов.

В заключение отметим, что система испытаний биологической активности химических соединений, в частности ксенобиотиков, может служить и своеобразным полигоном для отбора новых биодатчиков, выбора их наиболее чувствительных характеристик и т. д. Более того, информация о биологической активности ксенобиотиков позволяет дать прогностическую оценку их безопасности и разработать мероприятия по снижению воздействия химического пресса на всю биосферу и человека в частности.

1.4. Мембранотропные эффекты

Говоря о мембранотропном действии какого-либо вещества, имеют в виду прямую или косвенную (опосредованную) модификацию мембранных структур, вызываемую соответствующими соединениями, и наступающие в результате этого изменения свойств биологической мембраны, прежде всего транспортных характеристик.

Очевидно, круг относящихся сюда явлений очень широк, и одна из первоначальных задач – построение некоторой рациональной системы описания вызываемых мембранотропных эффектов.

Часто при обсуждении биологической активности химических соединений используется термин «специфическое» или «неспецифическое» действие. Смысл, вкладываемый в это определение различными исследователями, неодинаков. Ясно, что все мыслимые химические соединения можно подразделить на присущие данному организму эндогенные продукты (а также имитирующие их в функциональном смысле соединения) и на «посторонние» по своей химической природе вещества. Такая классификация не предполагает, очевидно, существования вполне четкой границы между двумя группами веществ, однако она прочно укоренилась в сознании большинства физиологов, токсикологов, фармакологов. Надо подчеркнуть, что корректное определение специфического действия базируется на наличии четко выраженных мишеней, реагирующих только на определенные химические соединения.

Влияние агента на мембрану редко ограничивается изменением какого-то одного структурного элемента, функции или одной

регистрируемой характеристики. В общем случае реакция мембраны должна рассматриваться как некий многомерный показатель. Таким образом, рациональный способ параметризации этой реакции не может быть определен однозначно. Например, степень деструкции мембраны под действием детергента может быть охарактеризована количеством его молекул, связанных единицей поверхности мембраны, сдвигом осмотических отношений в системе «клетка – наружная среда», изменениями электрических параметров мембраны и т. д.

Использование каждой из этих характеристик для той или иной цели диктуется зачастую некими субъективными обстоятельствами, например: экспериментальными возможностями, целями исследования и т. д.

Плазматическая мембрана выступает первичной мишенью воздействия различных экзогенных соединений, и к наиболее ранним эффектам пестицидов и любых экзогенных химических соединений следует отнести изменение барьерно-транспортных свойств и функционирования отдельных систем переноса веществ. Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные о мембранотропной активности пестицидов говорят о том, что они способны различным образом модифицировать ионную проницаемость мембран растительной клетки, вызывая либо ее рост, либо, наоборот, снижение.

Следовательно, происходящие изменения структуры и функций плазматической мембраны могут характеризовать избирательность действия химических агентов, а их нарушения способствовать развитию многих токсических реакций. Информацию о подобных сдвигах можно получить при регистрации электрических параметров мембраны.

1.5. Дозы и показатели токсичности

Попавшие в организм молекулы пестицидов, как правило, становятся физиологически активными в случае их взаимодействия с мишенями-белками мембран, ферментами и другими молекулами. При выявлении избирательности действия и токсичности пестицидов определяющее значение имеют действующие дозы (концентрации).

Токсичность – свойство пестицида в малых количествах нарушать нормальную жизнедеятельность организма. Наиболее чет-

кое определение приведено в англо-русском словаре терминов, изданном Центром международных проектов ГКНТ (1982): токсичность – мера несовместимости вещества с жизнью, величина, обратная абсолютному значению среднесмертельной дозы ($1/LD_{50}$) или концентрации ($1/LC_{50}$).

При попадании пестицидов в организм различают острое и хроническое отравление. Организмы, используемые для определения токсичности, называют биотестами, а отдельные показатели изменения биохимических и физиологических процессов, применяемые в целях определения степени отравления, – тест-параметрами.

Эффект действия пестицидов на исследуемые организмы определяется по их гибели или по наиболее характерным негативным признакам (изменение активности отдельных систем организма, его реакция, снижение репродуктивной способности и т. д.) и выражается в процентах по отношению к контрольным.

Токсическое действие препарата по борьбе с вредителями или любого другого ксенобиотика проявляется лишь при определенных условиях.

Прежде всего препарат должен проникнуть в клетку организма и достигнуть в ней определенной концентрации, которая превышает предел его токсического воздействия. При распределении препарата по всему организму этот предел может быть выражен отношением массы препарата к массе всего организма в мг/кг. Концентрация препарата в клетке определяется такими факторами, как его содержание в окружающей среде, скорость сорбции, метаболизм и скорость выведения. Наряду с этими факторами необходимо учитывать также возможность накопления в организме посторонних веществ и без процессов метаболизма, например, при отложении в жировых тканях. Такие биологически неактивные депо при распаде жиров вновь могут увеличить активную концентрацию посторонних веществ в организме.

Попавшее в организм постороннее вещество, как правило, становится физиологически активным только в том случае, если оно предварительно соединится с мишенью (за исключением веществ, обладающих осмотической активностью). В качестве мишеней могут служить белки мембран, ферменты и другие белки, способные встраиваться в биологические процессы, например тубулин, актин и миозин.

Применяя эти критерии к средствам защиты растений, в первую очередь рассматривают усвояемость препаратов растениями. При этом основное значение имеет количество этих препаратов, попадающих непосредственно в продукты питания. Количества пестицидов, попадающих в организм человека косвенным путем (через воздух, воду и другие источники), установить трудно.

Механизм расщепления пестицидов в организме во многих случаях остается не установленным. Основные данные относятся к накоплению препаратов в жировых клетках и материнском молоке.

Оценить достоверность данных о восприимчивости клеток к действию отдельных препаратов затруднительно. Например, действие гербицидов на те или иные объекты совершенно отличается от их действия на человека, а действие многих инсектицидов на человеческий организм и на насекомых принципиально одинаково.

Инсектициды на основе хлорорганических соединений проникают в организм человека через пищеварительный тракт или кожу, если они применялись в растворенном виде. При этом мембраны нервных клеток располагаются так, что сохраняется проницаемость для осмотического переноса потока ионов Na^+ . Нарушенная действием пестицидов разность электрических потенциалов мембраны в покое после возбуждения либо совсем не возвращается к исходному значению, либо снижается частично. Таким образом, хлорорганические соединения изменяют возбудимость нервных клеток. Сначала при этом повреждаются моторные нервные пути, а затем при более высоких концентрациях и сенсорные нейроны. У человека воздействие пестицидов наблюдается только при попадании в организм значительного количества пестицидов, следовые количества не оказывают заметного действия. Однако надо относиться с осторожностью к попаданию в организм даже следовых количеств хлорорганических соединений, так как они могут накапливаться и вступать во взаимодействие с другими чужеродными веществами.

Алкилфосфаты являются сильными ингибиторами ацетилхолинэстеразы. Это влияет на передачу раздражающего сигнала к нервным окончаниям. Снижение активности фермента приводит к накоплению ацетилхолина, что, в свою очередь, вызывает появление таких болезненных признаков, как слюнотечение, отек легких, колики, понос, тошнота, ухудшение зрения, увеличение кровяного давления, мышечные спазмы и судороги, нарушение речи, паралич дыхательных путей и др. Подобную клиническую

картину могут дать фосфаты и карбаматы при случайном или намеренном превышении доз.

Гербициды оказывают на человека совершенно другое физиологическое действие, чем на растения. Так, 2,4-Д и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т) обладают гербицидными свойствами в меньшей степени, чем сопутствующий в качестве примесей тетрахлордидоксибензодиксин (ТХДД), обладающий высокой токсичностью. Токсичность этого вещества в 500 000 раз выше, чем токсичность самого гербицида, и если даже его содержание в гербициде будет составлять 0,005 мг/кг, то все равно эту концентрацию нельзя будет считать полностью безвредной, так как ТХДД в природной среде отличается исключительной устойчивостью.

Дипиридины, например паракват, уже при внешнем контакте с кожей вызывают пузыри и язвы. При попадании внутрь организма дипиридил повреждает почки и печень, а затем вызывает фиброзные изменения легких, приводящие к смертельному исходу. Из-за высокой токсичности дипиридины требуют крайне осторожного обращения.

При применении пестицидов важным показателем является норма расхода – это количество действующего вещества или препарата, расходуемое на единицу площади обрабатываемой поверхности, единицу массы, объема или на отдельный объект. Действующее вещество (д. в.) – основной компонент препарата, входящий в состав разных торговых марок.

Основными параметрами токсикометрии являются:

- Lim_{ac} – порог однократного (острого) действия токсического соединения, характеризующийся минимальной пороговой дозой, вызывающей изменения показателей жизнедеятельности организма, выходящие за пределы приспособительных физиологических реакций;

- LD_{50} (LD_{100}) – среднесмертельная (смертельная) доза, вызывающая гибель 50 % (100 %) подопытных животных при определенном способе введения после двухнедельного срока наблюдения. Выражается в миллиграммах вещества на 1 кг массы (мг/кг);

- LC_{50} (LC_{100}) – аналогично дозе, но только концентрация вещества, вызывающая гибель 50 % (100 %) подопытных животных при определенном способе введения после двухнедельного срока наблюдения. Выражается в миллиграммах вещества на 1 кг массы (мг/кг);

- ПДК – предельно допустимая концентрация вещества, выражается в миллиграммах;

- ОБУВ – ориентировочный безопасный уровень воздействия вещества, выражается также в миллиграммах вещества;

- зона острого токсического действия – LD_{50}/Lim_{ac} ; чем больше эта величина, тем безопаснее данное вещество.

Мерой токсичности пестицидов для различных организмов является токсическая доза – количество пестицида, вызывающее определенный эффект, – выражаемая в единицах массы пестицидов по отношению к единице площади, объема или массы обрабатываемого объекта.

Для установления степени токсичности и опасности химических соединений необходимо знать величины доз. Различают пороговую, подпороговую, токсическую несмертельную и токсическую смертельную дозы.

Пороговая доза – наименьшее количество вещества, вызывающее изменения в организме, определяемые наиболее чувствительными физиолого-биохимическими тестами, без проявления клинических признаков отравления организма. Другое определение пороговой дозы – это такое наименьшее количество вещества, которое вызывает явные, но обратимые изменения жизнедеятельности.

Подпороговая доза – максимальное количество вещества, при поступлении которого в организм не наступают изменения наиболее чувствительных физиолого-биохимических тестов, выходящие за пределы физиологических колебаний.

Токсическая несмертельная доза – количество вещества, вызывающее отравление живых организмов без смертельного исхода.

Токсическая смертельная доза – количество вещества, которое вызывает отравления человека (животных) со смертельным исходом.

Величина токсической летальной дозы даже одного вида зависит от индивидуальной чувствительности организма. В токсикологии чаще всего пользуются средней летальной дозой (LD_{50}) или концентрацией (LC_{50}), которые вызывают гибель 50 % подопытных животных. Если же наблюдается 100% -ная гибель, то такая доза (LD_{100}) или концентрация (LC_{100}) обозначаются как абсолютно летальные.

Однако для характеристики токсичности можно использовать величины LC_{50} или LD_{50} , вызывающие не только смертельный исход, а вообще половинное подавление любой регистрируемой реакции.

По степени токсичности для теплокровных животных пестициды классифицируются по четырем группам:

- сильнодействующие вещества – LD_{50} менее 50 мг/кг;

- высокотоксичные вещества – LD_{50} от 50 до 200 мг/кг;
- среднетоксичные вещества – LD_{50} от 200 до 1000 мг/кг;
- малотоксичные вещества – LD_{50} выше 1000 мг/кг.

В некоторых справочных пособиях приводится подразделение пестицидов в зависимости от их концентрационных эффектов на три класса опасности: высокоопасные, среднеопасные и малоопасные.

Определение предельных концентраций. При рассмотрении веществ, оказывающих вредное воздействие на организм человека, встает вопрос о количественной оценке этого эффекта, т. е. об определении степени токсичности. Простейшей оценкой в данном случае являются величины LC_{50} или LD_{50} , указывающие концентрацию в моль/л или дозу в миллиграммах препарата на 1 кг массы подопытного организма, когда смертность среди подопытных объектов достигает 50 %. Эта величина позволяет делать выводы о сравнительной токсичности отдельных препаратов.

Для оценки токсичности пестицидов в продуктах питания используют так называемую суточную допустимую дозу ($D_{\text{сут}}$), которая выражается в мг/кг и обозначает то количество препарата, которое можно принимать ежедневно внутрь в течение всей жизни. Нормы устанавливаются после опытов над двумя видами животных в течение всей их жизни, а также над двумя поколениями их потомства. Высшая доза, которая в этих экспериментах не вызывала никаких заболеваний, получила название концентрация нулевого воздействия (КНВ; *no effect level* – англ.). Эти нормы нельзя безоговорочно распространять на человека, так как у подопытных животных, даже если это млекопитающие, физиологические особенности обмена веществ иные, чем у людей. Для того чтобы полученные опытные данные можно было использовать вполне надежно, значение КНВ делят на 100, получая таким образом суточную допустимую дозу для человека:

$$D_{\text{сут}} = 0,01 \text{ КНВ.} \quad (1.1)$$

Для установления максимально допустимых концентраций пестицидов в различных продуктах питания необходимо выяснить, какие количества продуктов питания употребляются в пищу ежедневно. Далее нужно знать для расчета дозы массу тела потребителя.

Для пестицидов $D_{\text{сут}}$ может быть определена в мг/кг следующим образом:

$$D = \frac{D_{\text{сут}} (\text{масса тела})}{\text{Суточное потребление пищи (кг)}} \cdot \quad (1.2)$$

При этих расчетах необходимо учитывать специфику потребления пищи в различных частях нашей планеты, и их следует применять строго дифференцированно. Для эскимоса, питающегося в основном рыбой, $D_{\text{сут}}$ пестицидов будет иметь совсем другое значение, чем для китайца, питающегося в основном растительной пищей. Некоторые примеры максимально допустимого количества пестицидов в продуктах питания приведены в табл. 1.3.

В тех случаях, когда указанные значения не превышены, можно считать, что человеческий организм достаточно защищен от действия пестицидов. Но тем не менее остаются некоторые проблемы, заслуживающие особого внимания, в частности связанные с выведением пестицидов из организма. Так, например остаются невыясненными физиологические процессы выведения пестицидов через половые железы.

Таблица 1.3

Максимально допустимое содержание пестицидов в продуктах питания

Пестицид	Растительная пища		Пища животного происхождения	
	Норма, мг/кг	Продукт	Норма, мг/кг	Продукт
Альдрин и диэльдрин	0,1 0,01	Чай Другие растительные продукты	0,2*	Мясо, жиры
			1,0*	Лосось, осетр
			0,5*	Угорь, другие виды рыб, моллюски
			0,1*	Молоко
			0,1*	Яйца
Токсафен	0,4 0,1	Овощи, фрукты Другие растительные продукты	0,4*	Рыба, жиры, молоко
Хлордан	0,05 0,01	Чай Другие растительные продукты	0,05*	Мясо, жиры, молоко
			0,02	Яйца
			0,01	Другие продукты животного происхождения
Линдан	2,0	Зеленые овощи Овощи и фрукты, кроме моркови Чай Зерно, картофель, стручковые и др.	2,0*	Мясо, жиры, рыба
	1,5		0,7*	Дичь
	0,5		0,2*	Молоко
	0,1		0,1*	Яйца

Пестицид	Растительная пища		Пища животного происхождения	
	Норма, мг/кг	Продукт	Норма, мг/кг	Продукт
Метоксихлор	10,0 2,0	Овощи, фрукты Зерно, рапс	3,0	Мясо, жиры
Паратион и параоксон	0,5 0,1	Овощи, фрукты Другие растительные продукты	—	—

*Приведенные данные относятся к содержанию в жирах.

Выведение пестицидов через молочные железы также может внушать беспокойство, так как анализ проб показал более чем в 50 % тестируемых завышенное содержание пестицидов в материнском молоке. Нельзя с уверенностью утверждать, в какой степени это превышение нормы представляет опасность для ребенка, поскольку нормы для взрослых в данном случае не могут быть применимы из-за различия возрастных физиологических особенностей. Особая важность этой проблемы связана с тем, что для новорожденных материнское молоко является совершенно необходимым продуктом, без которого взрослые вполне в состоянии обойтись.

Пестициды представляют несомненную опасность для тех экосистем, в которых они находят применение. С уверенностью можно говорить о том, что пестициды оказывают действие на самые разнообразные виды животных, растений и микроорганизмов. Кроме того, в результате применения пестицидов появляются новые формы вредителей, устойчивые к действию средств борьбы с ними. Это заставляет, с одной стороны, создавать новые, более эффективные пестициды, с другой – применять их в более широком масштабе.

1.6. Электрические явления у растений

Способность генерировать электрические потенциалы – одно из универсальных свойств живых систем, которое играет важную роль в их жизнедеятельности. Наличие разности электрических потенциалов (РЭП) в живых клетках можно было бы предсказать с помощью теоретических рассуждений. На самом же деле электричество в них было открыто экспериментально.

Известно, что биоэлектрические потенциалы в настоящее время подразделяются на два основных типа – это потенциалы покоя (ПП) и потенциалы возбуждения. ПП – это РЭП в покоем состоянии, а потенциалы возбуждения – изменение ПП при раздражении. Нарушение нормального физиологического состояния клетки неизбежно ведет к изменению величины РЭП.

Первые доказательства существования электрических явлений в растительных тканях были получены в середине XIX в. Э. Дюбуа-Реймоном.

Для выявления природы возникновения РЭП исследования были перенесены на клеточный уровень. Для измерения РЭП клеток начали использовать микроэлектроды, которые представляют собой тонкие стеклянные капилляры с открытым кончиком диаметром 1 мкм. При введении микроэлектрода в вакуоль растительной клетки были зарегистрированы, по крайней мере, три скачка потенциала: на клеточной стенке, на плазматической мембране (плазмалемме) и на вакуолярной мембране (тонопласте).

Основной вклад в величину РЭП между вакуолью растительной клетки вносит плазматическая мембрана.

По сравнению с величинами потенциала покоя клеток животного происхождения, обычно не превышающими $-60 \div -90$ мВ, РЭП растительных клеток значительно выше и составляет от -100 до -300 мВ.

Некоторые примеры величин РЭП растительных клеток приведены в табл. 1.4.

Таблица 1.4

Разность электрических потенциалов растительных клеток

Вид	Ткань	Величина РЭП, мВ
<i>Pisum sativum</i>	Кора корня	-110
	Эпикотиль	-119
<i>Avena sativa</i>	Колеоптиль	$-102 \div -109$
	Корни	$-71 \div -84$
<i>Zea mays</i>	Корни	$-76 \div -104$
	Кора корня	$-118 \div -148$
	Протопласты	$-36 \div -82$
<i>Vicia sativa</i>	Корни	-130
<i>Sesuvium portulacastrum</i>	Кора корня	-138
<i>Nitella</i>	Интернодальная клетка	$-120 \div -150$
<i>Nitellopsis obtusa</i>	Интернодальная клетка	$-200 \div -250$

Вид	Ткань	Величина РЭП, мВ
<i>Halicystis</i>	Клетка	–80
<i>Lolium multiflorum</i>	Эндосперм	–60
	Протопласты	–46
<i>Dauca carota</i>	Корни	–54 ÷ –65
<i>Corchorus capsularis</i>	Побег	–18 ÷ +50
<i>Valonia</i>	Клетка	+17

Возникает естественный вопрос, откуда взялась РЭП между клеткой и наружной средой?

Электричество существует в форме положительных и отрицательных зарядов. Водные растворы солей представляют собой смесь положительно и отрицательно заряженных ионов. Катионы и анионы в растворе равномерно перемешаны, так что действующие на каждую частицу силы притяжения и отталкивания со стороны прочих частиц примерно компенсируют друг друга. Силы эти весьма велики, поэтому в сколько-нибудь значительном объеме раствора количество анионов и катионов всегда строго сбалансировано, т. е. соблюдается электронейтральность.

Пусть каким-то образом удалось добиться некоторого нарушения равенства концентрации в различных частях раствора: скажем в левой части сосуда анионов больше, чем катионов, в правой – меньше. Рассмотрим, что в этом случае происходит с анионом в пограничной области. Ясно, что слева на него будут действовать силы отталкивания (слева анионов больше), которые будут стремиться переместить анион слева направо. С противоположной стороны (справа) на него действуют силы притяжения, т. е. силы, подталкивающие анион в том же направлении (слева направо). При перемещении аниона из левой части раствора в правую под действием электростатических взаимодействий производится некоторая работа. Величина этой работы будет тем больше, чем более нарушена электронейтральность в обеих частях или чем больше существующая между ними разность электрических потенциалов. Работа, соответствующая перемещению аниона между двумя отсеками, пропорциональна разности электрических потенциалов. Иначе можно сказать, что эта работа является мерой разности потенциалов.

Измеряемые величины РЭП между клеткой и наружной средой имеют отрицательные значения, т. е. у внутренней поверхности анионов несколько больше, чем катионов, у наружной – меньше. Опять возникает вопрос, почему это происходит? Известно, что растворенные вещества в жидкости, газы в любом простран-

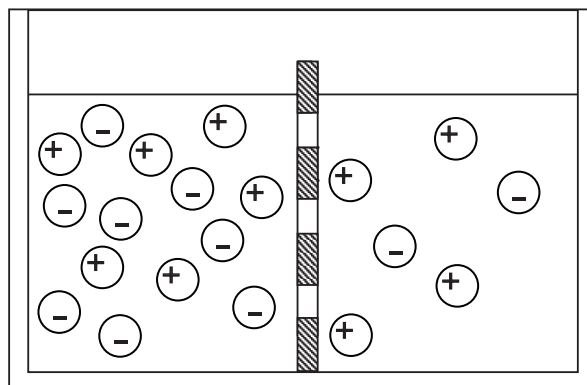


Рис. 1.1. Возникновение РЭП на избирательнопроницаемой мембране

стве распространяются из областей первоначально более высоких концентраций в области низких концентраций. Это в конечном итоге приведет к их равномерному распределению в некотором объеме. Действительно, пусть в некотором изолированном объеме в одной части больше молекул газа, чем в другой. Молекулы газа движутся беспорядочно и в любом направлении. Разделим мысленно плоскостью обе части сосуда (рис. 1.1).

Очевидно, что с левой стороны плоскости в единицу времени будет ударяться большее количество молекул, чем с правой. Значит, слева направо будет перемещаться большее число молекул, чем справа налево; это будет происходить до тех пор, пока оба потока не уравниваются, что наступит при равенстве концентраций во всех частях сосуда.

Далее разделим сосуд реальной мембраной, и в обе части нальем раствор электролита, например KCl разной концентрации, – слева больше, справа – меньше. Мембрана пропускает ионы калия, т. е. она проницаема только для K^+ . Допустим, что это регулируется диаметром отверстий в мембране, через которые ионы K^+ проходят, а анионы Cl^- – нет.

В этой системе, по аналогии с рассмотренной ранее, ионы будут стремиться покинуть левое отделение – их поток слева направо будет большим, чем в обратном направлении. Концентрация ионов Cl^- никаким перераспределениям подвергаться не будет. Но именно поэтому по мере выхода ионов K^+ из левого отделения между обеими сторонами мембраны будет возрастать РЭП – слева окажется больше анионов, справа – катионов. А это значит, что возникшая сила начнет препятствовать поступлению K^+ в правое отделение (сила будет действовать справа налево со стороны раствора меньшей концентрации). Чем больше нарушается электронейтральность, тем больше эта сила, и, в конце концов, наступает некоторое равновесие – количество ионов K^+ , покидающих в

единицу времени левое отделение из-за существующей разности концентраций, уравнивается с числом ионов, пересекающих мембрану в обратном направлении под действием возникшей РЭП.

Для мембраны полностью непроницаемой для одного из ионов при 20 °С десятикратное увеличение концентрации электролита с любой стороны мембраны в соответствии с уравнением Нернста:

$$\varphi_j^N = 58,21 \lg \frac{a_j^H}{a_j^B} \quad (1.3)$$

приводит к изменению РЭП на 58 мВ. Следовательно, для получения величины РЭП на мембране порядка –170 мВ необходимо, чтобы концентрация электролита внутри клетки в 1000 раз превышала таковую в среде. Значит, величина мембранного потенциала определяется асимметрией в распределении ионов по обе стороны биологической мембраны.

Таким образом, в любой живой системе существует РЭП, и было бы удивительно, если бы ее не было. Это означало бы абсолютное равенство концентраций электролита во всех клетках, органах, наружных растворах либо полное совпадение величин проницаемости мембран ко всем катионам и анионам.

Однако существует биологическая неравнозначность ионов в определении РЭП, что связано с различной избирательностью (селективностью) мембраны к ним. Характеристикой селективности мембраны к ионам служит коэффициент проницаемости P_i , который можно определить из измерений потенциала и сопротивления (обратная величина – проводимость) мембраны.

Ионом, определяющим потенциал плазматической мембраны в покое, для растительных клеток является K^+ , но значительный вклад может вносить электрогенная H^+ -помпа.

Плазматическая мембрана весьма чувствительна к малейшей модификации ее структуры, состава и т. д., вызываемой экзогенными факторами биотической и абиотической природы. Поэтому данные о сдвигах ее электрофизиологической реакции, в основе которой лежат изменения ионной проницаемости, являются источником информации о биологической активности чужеродных организму соединений (ксенобиотиков), в частности пестицидов.

1.7. Циклоз

Движение цитоплазмы в животных и растительных клетках довольно распространенное явление, которое играет важную роль в осуществлении обмена и распределения веществ внутри клетки, а

также характеризует уровень жизнедеятельности клетки. Движение цитоплазмы в растительных клетках получило название циклоза.

Для используемого нами тест-объекта (интернодальных клеток водоросли *Nitella flexilis*) характерно ротационное движение цитоплазмы. Этот тип движения характерен для клеток, у которых цитоплазма находится только на периферии клетки и движется подобно приводному ремню. Ротационное движение представляет собой наиболее упорядоченный тип движения цитоплазмы, который встречается в клетках листьев водных растений (*Elodea*, *Valisneria* и др.), в клетках корневых волосков и в клетках пыльцевых трубок многих растений, в камбиальных клетках; наиболее выражен этот тип движения в клетках харовых водорослей.

Движение цитоплазмы в них отличается от циклоза во многих других клетках тем, что большинство хлоропластов не передвигается по всей клетке, а находится в неподвижном слое цитоплазмы, прилегающем к плазмалемме. Направление движения в клетках *Chara* и *Nitella* остается постоянным: восходящий ток цитоплазмы проходит по внешней стороне клетки, а нисходящий – по ее внутренней стороне. В месте соприкосновения восходящего и нисходящего токов видна индифферентная (прозрачная) зона, в которой отсутствуют хлоропласты. Цитоплазма движется по спирали, наклон которой совпадает с наклоном индифферентной зоны и с направлением расположения хлоропластов в неподвижном слое.

Скорость движения цитоплазмы значительно изменяется под влиянием эндо- и экзогенных факторов. О величинах скорости циклоза можно судить из данных, приведенных в табл. 1.5.

Таблица 1.5

Скорость циклоза в различных растительных объектах

Объект	Орган, ткань	Скорость, мкм/с
<i>Caulerpa prolifera</i>	«Лист»	2–3
<i>Acetabularia</i>	«Стебель»	2–5
<i>Nitella flexilis</i>	Междоузлие, ризоид	52–78 21
<i>Chara braunii</i>	Междоузлие	75
<i>Elodea</i>	Лист	6–10
<i>Valisneria spiralis</i>	Лист	10–15
<i>Cucurbita maxima</i>	Волосок черешка	4
<i>Allium cepa</i>	Эпидермис	4,3
<i>Avena sativa</i>	Корневой волосок	5,4

Объект	Орган, ткань	Скорость, мкм/с
<i>Trianea bogotensis</i>	Корневой волосок	9,5
<i>Zea mays</i>	Корневой волосок	5,7
<i>Lilium longiflorum</i>	Пыльцевая трубка	5,5
<i>Vicia faba</i>	Пыльцевая трубка	2,9
<i>Pisum sativum</i>	Пыльцевая трубка	2,3

Наиболее вероятным процессом, обеспечивающим генерацию движущей силы, является взаимодействие ориентированных в направлении движения поляризованных актиновых филаментов с цитоплазматическими олигомерами миозина. Источником энергии движения цитоплазмы является преобразование химической энергии гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ) актомиозиновым комплексом в конформационные изменения в олигомерах миозина.

Химические агенты в значительной мере определяют интенсивность циклоза. Заметное влияние на скорость движения цитоплазмы оказывают соединения, подавляющие обмен веществ у растений (цианид, динитрофенол, CO_2 и др.).

Электрические поля также вызывают изменения в скорости циклоза. В конце XVIII в. было отмечено, что при пропускании слабого электрического тока происходит остановка движения цитоплазмы в клетках харовых водорослей. Действие тока сильно зависит от его интенсивности, продолжительности и т. д.

При действии значительного по величине внешнего электрического тока и возникновении ПД также наступает остановка циклоза; впервые это явление было обнаружено на клетках *Nitella*. Взаимосвязь между ПД и остановкой движения цитоплазмы было установлено для разных видов харовых водорослей.

В последнее время появились обстоятельные материалы, касающиеся связи скорости циклоза с РЭП клетки в покое. Изменения величины РЭП, как установлено, влекут за собой сдвиги скорости движения цитоплазмы.

Таким образом, перечисленные закономерности, определяющие скорость циклоза, позволяют их использовать при интерпретации характера действия ксенобиотиков на растительную клетку.

1.8. Интерпретация результатов испытаний

Анализ биологической активности веществ основан на регистрации реакции тест-объекта, возникающей в ответ на действие испытуемых соединений. Избирательный и токсический эффекты

химических соединений проявляются через нарушение нормального течения различных жизненных отправления живых организмов, используемых в качестве тест-объектов.

Клеточные мембраны весьма чувствительны ко многим химическим соединениям; другие вещества, не влияя непосредственно на мембранные структуры, вызывают их разрушение косвенным путем – через нарушение биохимических процессов клетки, ответственных за поддержание нормального функционирования мембран.

Таким образом, присутствие в окружающей среде подавляющего большинства чужеродных соединений вызывает нарушение структуры мембран, с чем связано резкое изменение их проницаемости для ионов, в результате чего происходит изменение электрических параметров клетки.

1.8.1. Теория «постоянного поля» Гольдмана

С точки зрения возможностей детализации механизмов мембранотропных эффектов, вызываемых различными химическими соединениями, очень важным оказывается тот факт, что зависимости электродиффузионных параметров мембраны от распределения ионов в системе «вакуоль – наружная среда» удовлетворительно описываются уравнениями феноменологической или микроскопической теории диффузии.

Разность электрических потенциалов в этом случае хорошо описывать уравнением:

$$\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{K^H} + \alpha C_{Na^H} + \gamma C_{Cl^B}}{C_{K^B} + \alpha C_{Na^B} + \gamma C_{Cl^H}}, \quad (1.4)$$

а электрическое сопротивление:

$$\Re = \frac{RT}{F^2 P_K} \frac{1/C^H - 1/C^B}{\ln C^B / C^H}, \quad (1.5)$$

где Ψ – РЭП; $\Re$ – сопротивление мембраны; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура; F – постоянная Фарадея; C_{K^H} , C_{Na^H} и C_{Cl^H} – концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- в среде; C_{K^B} , C_{Na^B} и C_{Cl^B} – концентрации ионов K^+ , Na^+ , Cl^- в цитоплазме; α и γ – коэффициенты селективности мембраны; $C^H = C_{K^H} + \alpha C_{Na^H} + \gamma C_{Cl^B}$; $C^B = C_{K^B} + \alpha C_{Na^B} + \gamma C_{Cl^H}$.

Приведенные соотношения использовались нами при трактовке результатов экспериментов.

1.8.2. Визуализация полученных результатов в электрофизиологическом эксперименте

Применявшаяся схема измерений позволяет охарактеризовать действие всякого эффектора неким сдвигом стационарных параметров. В простейшем случае – это пара величин $\Delta\Psi$, $\Delta\mathfrak{K}$.

Чисто качественное рассмотрение стационарных сдвигов Ψ , $\mathfrak{K}$, вызываемых химическими соединениями, позволяет представить тенденции изменения отдельных ионных проницаемостей P_i . Полагая обе непосредственно регистрируемые величины функциями P_i , определяемыми уравнениями (1.4, 1.5), можно простейшим способом классифицировать результаты, относящиеся к различным соединениям, так как это сделано на диаграмме (рис. 1.2).

При этом дифференцируются эффекты, обусловленные изменением проницаемости мембраны к K^+ (P_K) и прочим ионам – P_r .

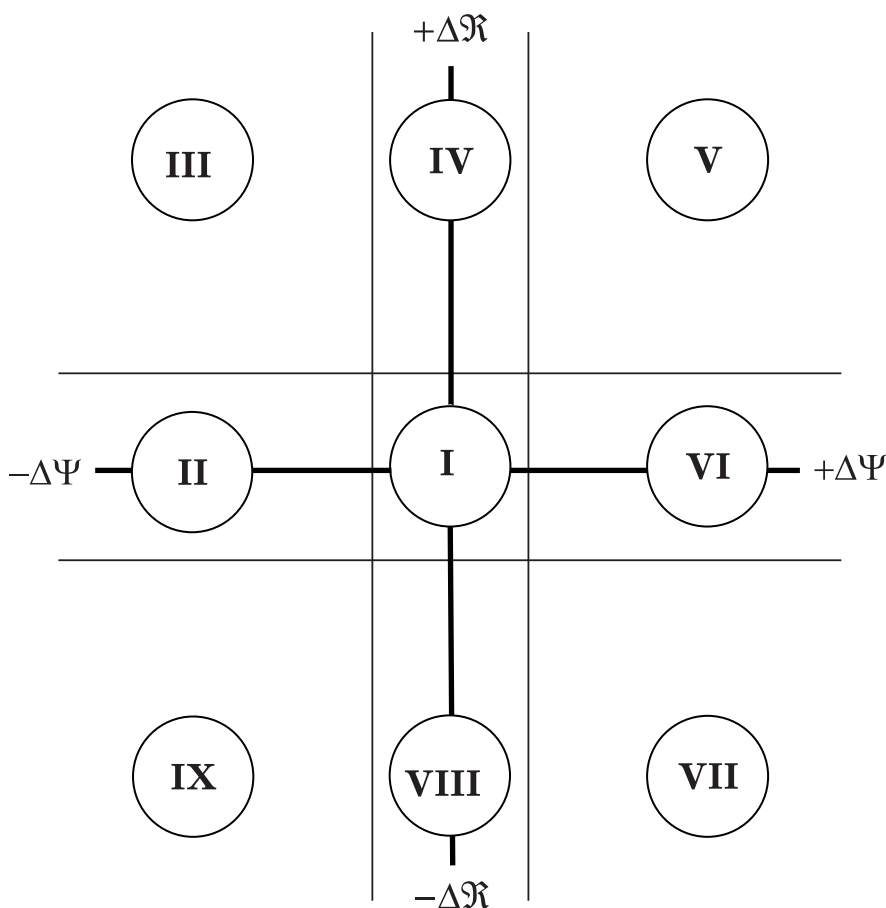


Рис. 1.2. Диаграмма ($\Delta\Psi$, $\Delta\mathfrak{K}$):

I – $\Delta P_i = 0$; II – $\Delta P_K > 0$, $\Delta P_r < 0$; III – $\Delta P_r < 0$; IV – $\Delta P_K > 0$, $\Delta P_r > 0$; V – $\Delta P_K < 0$;
VI – $\Delta P_K < 0$, $\Delta P_r > 0$; VII – $\Delta P_r > 0$; VIII – $\Delta P_K < 0$, $\Delta P_r < 0$; IX – $\Delta P_K > 0$

1.8.3. Потенциалзависимость скорости циклоза

Установлено, что изменения величины РЭП влекут за собой сдвиги скорости движения цитоплазмы.

Рассматривая наступивший сдвиг РЭП ($\Delta\Psi$) как единственный фактор, вызывающий изменения скорости циклоза (ΔV), в первом приближении можно предполагать, что скорость индуцируемого $\Delta\Psi$ изменения V будет ему пропорциональна.

Однако следует считаться с наличием противоположной, адаптационной тенденции, пропорциональной текущему сдвигу ΔV :

$$dV/dt = k_1 \Delta\Psi(t) - k_2 \Delta V(t), \quad (1.6)$$

где k_1 и k_2 – константы скоростей прямой и обратной реакций.

После интегрирования получаем следующее выражение:

$$\Delta V(t) = (k_1/k_2)\exp(k_2 t) \int \Delta\Psi(\tau)\exp(k_2 \tau) d\tau. \quad (1.7)$$

Кинетика изменений регистрируемых величин РЭП и скорости движения цитоплазмы хорошо аппроксимируется уравнением (1.7).

На основании данных закономерностей представляется возможным проводить оценку степени потенциалзависимости сдвигов скорости циклоза, наступающих под действием того или иного фактора.

В рамках этой модели в случае, когда экспериментальные точки на диаграмме (см. рис. 1.2) ложатся на прямую, проходящую через начало координат, реакция является строго потенциалзависимой (рис. 1.3).

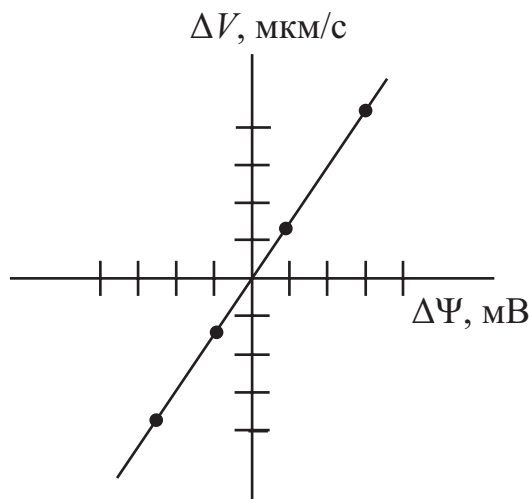


Рис. 1.3. Связь между значениями сдвигов ΔV в экстремумах и соответствующими им величинами сдвигов $\Delta\Psi$ в случае строго потенциалзависимой реакции СДП, подчиняющейся уравнению 1.7

При сохранении этой тенденции в присутствии ксенобиотика можно говорить о том, что наблюдаемые эффекты осуществляются через изменения ионных проницаемостей мембраны. Следовательно, ксенобиотик проявляет прямое мембранотропное действие.

Если положение анализируемой совокупности точек существенным образом уклоняется от описанной зависимости – это означает, что в рассматриваемом случае имеют место эффекты, обусловленные взаимодействием эффектора с внутриклеточными структурами, непосредственно регулирующими скорость цикла.

1.8.4. Статистическая обработка результатов

Система интерпретации экспериментально полученных результатов включает процедуру обработки стационарных зависимостей наблюдаемых эффектов. В рамках заданной модели решалась задача получения оценок параметров совокупности стационарных зависимостей потенциала, электрического сопротивления мембраны, вычисления некоторых статистических характеристик этих показателей и их дискриминацию по вычисленным статистическим величинам.

Основными статистическими характеристиками служат: средняя арифметическая величина ($\bar{x}$), среднее квадратичное отклонение (σ), ошибка средней величины (S_x) и достоверность отличий между средними величинами (t).

Средняя арифметическая величина определялась по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_j}{n}, \quad (1.8)$$

где $\sum x_j$ – сумма всех повторностей измерения; n – число повторностей.

Для определения среднего квадратичного отклонения использовалось выражение:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_j - \bar{x})^2}{n - 1}}, \quad (1.9)$$

где $\sum (x_j - \bar{x})^2$ – сумма квадратов отклонений от среднеарифметической величины.

Ошибка средней величины определялась по формуле:

$$S_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}. \quad (1.10)$$

Достоверность различий между средними арифметическими величинами устанавливали путем применения нулевой гипотезы и проверки ее с помощью критерия t , который определяли по формуле:

$$t_{\text{факт}} = \frac{d}{S_d}, \quad (1.11)$$

где $d = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ – модуль разницы между средними арифметическими двух вариантов; S_d – статистическая ошибка разницы, которая определялась по формуле:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_1 (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum_2 (x_2 - \bar{x}_2)^2}{(n_1 - 1)(n_2 - 1)} \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}, \quad (1.12)$$

где $\sum_1 (x_1 - \bar{x}_1)^2$ – сумма квадратов отклонения от средней арифметической величины контроля; $\sum_2 (x_2 - \bar{x}_2)^2$ – сумма квадратов отклонения от средней арифметической величины эксперимента; n_1 – число повторностей контроля; n_2 – число повторностей эксперимента.

Различия между вариантами являются достоверными, если $t_{\text{факт}}$ превышает $t_{\text{табл}}$, найденное по таблице распределения Стьюдента при уровне значимости $P = 0,05$; $P = 0,01$; $P = 0,001$ и соответствующем числе степеней свободы (прил.).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Описание тест-объекта и способа его выращивания

В развиваемом нами методе тестирования в качестве тест-объекта используются клетки междоузлий харовой водоросли *Nitella flexilis*, которая образует систему побегов с мутовками коротких веточек, условно называемых «листьями» (рис. 2.1). Каждое междоузлие представляет собой одну интернодальную клетку диаметром до 0,5 мм и длиной 3–5 см. Объем вакуоли и цитоплазмы интернодальной клетки составляют $\approx 90\%$ и около 10% , соответственно.

Вакуоль заполнена водным раствором неорганических и органических веществ. В ней могут находиться как вещества, непосредственно участвующие в процессах обмена веществ в клетке (метаболиты), так и соединения, выведенные на определенное время из обмена – анаболиты. Кроме того, вакуоль служит местом локализации некоторых продуктов, ядовитых для цитоплазмы (танины, алкалоиды, фенолы и т. д.). Вакуолярный сок содержит также кристаллики различных размеров, которые могут перемещаться под действием слоя движущейся цитоплазмы, примыкающей к вакуоли. Данный компартмент отделен от цитоплазмы вакуолярной мембраной – тонопластом.

В цитоплазме выделяют два слоя: примыкающий к плазматической мембране неподвижный гелеподобный слой эктоплазмы с хлоропластами и золеподобный подвижный слой – эндоплазму. Общая толщина цитоплазмы около 15 мкм. Хлоропласты неподвижны и располагаются правильными рядами по спирали вдоль поверхности клетки. Для цитоплазмы характерно ротационное движение – по спирали вдоль поверхности клетки.

Цитоплазма интернодальных клеток обладает сложной внутренней структурой, основу которой составляет матрикс (гиалоплазма) и эндоплазматическая сеть (ретикулум). Основу цитоскелета формируют микротрубочки и микрофиламенты. Со стороны клеточной стенки цитоплазма окружена плазматической мембраной (плазмалеммой).

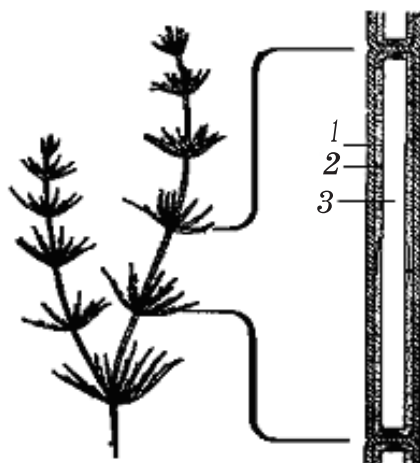


Рис. 2.1. Строение клетки харовой водоросли:
1 – клеточная стенка;
2 – цитоплазма; 3 – вакуоль

Клеточная стенка или оболочка представлена тонкой микрофибриллярной структурой, состоящей из молекул целлюлозы. Микрофибриллы погружены в аморфный матрикс – гемицеллюлозу. В клеточной стенке, толщина которой составляет 10–15 мкм, имеются поры диаметром 10 нм.

Благодаря значительным размерам, четкой дифференцировке основных клеточных компартментов интернодальные клетки харовой водоросли *Nitella flexilis* являются удобными объектами для электрофизиологических измерений.

Водоросли легко выращиваются вегетативным способом в лабораторных условиях, в стеклянных аквариумах на довольно простых питательных средах, содержащих 10^{-4} моль/л KNO_3 , $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л $\text{Mg(NO}_3)_2$, 10^{-3} моль/л NaHCO_3 и $4 \cdot 10^{-4}$ моль/л CaCl_2 .

Для выращивания водорослей на дно вегетационного сосуда заливается предварительно заваренный, а затем охлажденный до 60°C 2–3%-ный раствор агар-агара слоем 2–3 см. После затвердевания агар-агарового геля в сосуд заливается питательный раствор. Для посадки используются части таллома, имеющие 3–5 интернодальных клеток, включая верхушечную. Подготовленные фрагменты растений с помощью изогнутого стоматологического зонда вводятся базальными концами в агаровый гель. На 1 дм^2 поверхности высаживается 10–14 побегов. Высаженные водоросли освещаются люминесцентными лампами, создающими освещенность 500–700 лк на уровне дна сосуда; режим освещения – 16 ч свет и 8 ч темнота. Температура питательного раствора поддерживается в пределах $18\text{--}25^\circ\text{C}$. Сбор (срезка) водорослей производится приблизительно один раз в месяц. Собранные водоросли хранятся

в стеклянных сосудах, заполненных питательным раствором, слоем 10–20 см, при комнатной температуре и обычном чередовании режима дня и ночи (освещенность днем – 200–300 лк).

2.2. Приготовление сред и подготовка тест-объекта для лабораторных испытаний

Химические средства защиты растений выпускают в виде специальных препаративных форм. Для их изготовления используют различные вспомогательные компоненты: минеральные наполнители, поверхностно-активные вещества (ПАВ), прилипатели, вещества, называемые улучшателями или модификаторами. Эти компоненты предотвращают расслоение препарата, выпадение осадка в рабочей жидкости, кристаллизацию, пыление и слеживаемость порошкообразных препаратов, способствуют лучшей смачиваемости самого препарата, препятствуют вспениваемости рабочих суспензий или эмульсий, химическому разложению действующих веществ. Реже применяют вещества для маскировки неприятных запахов и красители. Подбор улучшателей, или модификаторов, очень сложен и проводится строго индивидуально для каждого действующего вещества.

Препаративная форма пестицида высокого качества представляет собой сложную, хорошо сбалансированную по многим показателям многокомпонентную систему, обеспечивающую максимальный эффект и минимальную опасность для окружающей среды.

Широко применяются следующие препаративные формы: смачивающиеся порошки, концентраты эмульсий, пасты, гранулы, дусты (порошки для опудривания и опыливания), растворимые порошки, технические продукты в виде жидких препаратов и порошков, водные растворы. Концентрированные суспензии – коллоидные растворы, шашки и таблетки для сжигания.

Аэрозоли – взвеси в воздухе частиц пестицидов размером 0,001–10 мкм, образуемые при сжигании шашек, крупных таблеток, брикетов или порошков, содержащие действующее вещество препарата, горючее вещество, окислитель и вспомогательные вещества. Наряду с этим используют растворы действующих веществ в минеральных маслах, из которых получают аэрозоль с помощью специальных аэрозольных генераторов. Взвеси из твердых частиц называют дымами, из жидких – туманами.

Водные растворы (в. р.) – жидкие, очень текучие препараты, изготавливаемые из растворимых в воде действующих веществ. В отличие от пылевидных препаратов более удобны в обращении.

Гранулированные препараты (г. п.) известны двух видов: для внесения в почву или рассева в поливную воду; грануляты или таблетки, образующие в воде суспензии или растворы. Первые имеют размер гранул от 0,2 до 1 мм, включают от 0,5 до 20 % активного начала, до 10 % клеящих веществ, другие вспомогательные добавки и инертный или активный наполнитель (до 100 %). Отличаются зернистой структурой, хорошей сыпучестью, не пылят и не загрязняют воздух рабочей зоны.

Дусты (д.) – пылевидные препараты, не впитывающие влагу. Содержат не более 15 % д. в., добавки, которые способствуют прилипанию, снижению пыления и слеживаемости, а также другие продукты, нередко краситель и наполнитель (до 100 %). Дусты непригодны для полусухого и мокрого протравливания, так как плохо смешиваются с водой вследствие своей гидрофобности.

Концентраты эмульсий (к. э.) – жидкие или пастообразные препараты, образующие эмульсии при смешивании с водой. В качестве вспомогательных веществ в одном случае содержат масла (или другие не смешивающиеся с водой растворители) и стабилизаторы, в другом – эмульгаторы, которые хорошо смешиваются с водой. Обычно содержат от 20 до 65 % действующего вещества.

Концентрированные суспензии (к. с.) – коллоидные растворы в виде жидкой сметанообразной массы. По составу близки к смачивающимся порошкам, содержат растворимые в воде высокомолекулярные защитные коллоиды, которые препятствуют высыханию препарата. В сочетании с водой дают стойкую суспензию, используемую для опрыскивания и других способов обработки.

Пасты (пас.) – мазеобразные препараты, содержащие примерно те же компоненты, что и смачивающиеся порошки, а также воду, иногда красители. Используются для обмазки ран плодовых культур, а также для приготовления суспензий.

Растворимые порошки (р. п.) – порошкообразные, растворимые в воде препараты многоцелевого назначения.

Смачивающиеся порошки (с. п.) – порошкообразные пылевидные препараты, образующие с водой стойкую суспензию. Обычно содержат от 15 до 80 % д. в., различные вспомогательные добавки (до 10 %) и неактивный (инертный) наполнитель, иногда смесь наполнителей (до 100 %). В высококонцентрированные смачивающиеся порошки наполнители не вводятся. В Республике Беларусь данная препаративная форма пестицидов не подлежит государственной регистрации.

Проведение электроальгологического тестирования биологической активности пестицидов предполагает использование их в

виде водных растворов соответствующих концентраций. Однако поскольку при растворении в воде многих препаративных форм пестицидов образуются либо устойчивые суспензии, либо эмульсии, то для проведения анализов в настоящей работе рекомендуется приготовление спиртовых (этанольных) маточных растворов пестицидных препаратов. Это способствует значительному повышению растворимости отдельных ингредиентов и при дальнейшем разведении водой позволяет практически полностью избежать получения неоднородных растворов. При приготовлении рабочих растворов исследуемого пестицида с известной молярной концентрацией (10^{-n} моль/л) готовят его спиртовой маточный раствор, содержащий 10^{-1} либо 10^{-2} моль/л действующего вещества.

В целях стандартизации материала накануне проведения испытаний вторую и третью интернодальные клетки (считая от верхушки) вырезают из таллома и освобождают от боковых «листочков». Препарирование клеток производят с помощью ножниц и пинцета в чашках Петри, заполненных искусственной прудовой водой (ИПВ) следующего состава: 10^{-4} моль/л KCl, 10^{-3} моль/л NaCl, 10^{-4} моль/л CaCl_2 , 10^{-3} моль/л трис(оксиметил)аминометан и соляная кислота, содержание которой определяется величиной pH раствора ИПВ, равного $7,2 \pm 0,2$. При вырезании клеток оставляют небольшие (1–2 мм) фрагменты соседних клеток (в торце клетки, таким образом, остается открытым участок мембраны междоузлия, служащий в целом талломе для контакта внутриклеточного содержимого соседних клеток).

Препарированные клетки содержатся при температуре 20–25 °C и освещенности 300 лк в течение суток. Количественным показателем для стандартизации состояния тест-объекта выбрана величина РЭП, равная $-140 \div -150$ мВ.

2.3. Регистрация тест-параметров

Под воздействием условий внешней среды растительная клетка способна изменять проницаемость плазматической мембраны, характеристиками которой являются РЭП и проводимость (сопротивление).

Клеточные мембраны весьма чувствительны ко многим химическим соединениям. Присутствие в окружающей среде подавляющего большинства чужеродных соединений вызывает нарушение структуры мембран, с чем связано резкое изменение их

проницаемости для ионов, в результате чего происходит изменение электрических параметров клетки. На этом эффекте основан метод электроальгологического тестирования биологической активности веществ, использующий в качестве тест-объекта клетки харовых водорослей. Измерения электрических параметров можно представить в виде схемы (рис. 2.2).

В процедурах проведения биологического тестирования по электрофизиологическим показателям тест-объекта производится определение величины РЭП и сопротивления плазматической мембраны клеток с помощью внеклеточных электродов. Такого рода операции возможны благодаря конструктивным особенностям камеры.

Экспериментальная процедура регистрации электрофизиологических параметров тест-объекта сводится к следующему. Под микроскопом измеряют диаметр клетки с помощью окуляр-микрометра и масштабной линейки. Для этого, используя объект-микрометр (цена деления 0,01 мм), определяют цену деления окуляр-микрометра. Затем клетка слегка подсушивается фильтровальной бумагой и помещается в прорези между отсеками экспериментальной камеры.

Прорези замазываются вазелином для изоляции каждого отсека камеры. Отсеки 1 и 4 непроточны. Отсек 1 заполняется ИПВ, отсек 4 – раствором КСИ концентрации 10^{-1} моль/л. Контакт тест-объекта в отсеке 4 с раствором КСИ осуществляется через открытый фрагмент соседней клетки.

Выбор концентрации КСИ 10^{-1} моль/л, имитирующей вакуолярное содержимое калия, обусловлен следующими обстоятельствами. Во-первых, вклад других ионов вакуолярного сока в величину РЭП в покое при указанных концентрациях калия незначителен. Во-вторых, кривая концентрационной зависимости РЭП при концентрациях K^{+} в вакуоли 10^{-1} моль/л и выше близка к насыщению, т. е. более высокие концентрации калия в вакуолярном соке не оказывают заметного влияния на РЭП клетки в покое. Кроме того, концентрация ионов в вакуоли также достаточно высока, поэтому для предотвращения хлорного тока необходимо соответственно высокое содержание данных ионов в имитирующем растворе.

Через отсек 3 постоянно пропускается ИПВ. Проток ИПВ через отсек 3 предотвращает перенос K^{+} по клеточной стенке из отсека 3 в экспериментальный отсек 2. К клеточному фрагменту, находящемуся в отсеке 2, попеременно подается ИПВ или экспериментальный раствор.

Электроды 13 для отведения РЭП от тест-объекта расположены в отсеках 2 и 4.

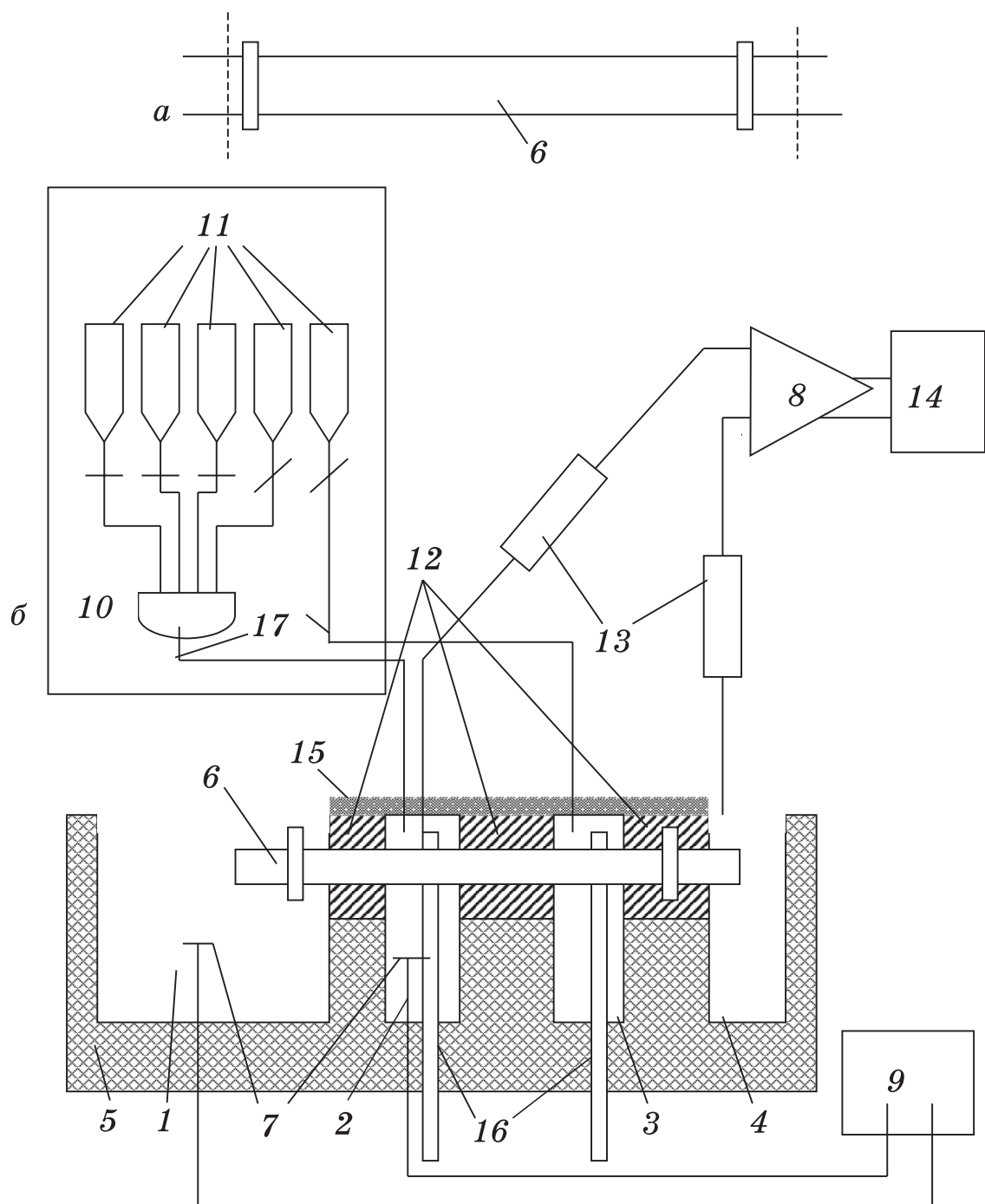


Рис. 2.2. Схема подготовки (а), укладки тест-объекта и измерения электрических параметров (б):

1, 2, 3, 4 – отсеки камеры; 5 – камера; 6 – клетка; 7 – токовые электроды;
 8 – электрометрический усилитель; 9 – стимулятор; 10 – смеситель; 11 – емкости для проб;
 12 – вазелин; 13 – регистрирующие электроды (каломельные полуэлементы);
 14 – самопишущий прибор; 15 – герметичная крышка; 16 – шланги для отвода жидкости;
 17 – шланги для подачи раствора.
 ----- линии разреза; ————— блок подачи и смены растворов

При таких условиях измерения отводимая РЭП достаточно хорошо соответствует истинным значения РЭП плазматической мембраны клеток, полученных с помощью прецизионной микроэлектродной техники. К тому же при указанных условиях не отмечается заметных повреждений тест-объекта, что позволяет использовать его в течение длительного времени.

Для измерения сопротивления мембраны импульс постоянного тока пропускается через токовые электроды 7, находящиеся в отсеках 1 и 2 камеры. Величина тока (I) рассчитывается таким образом, чтобы вызываемый сдвиг электрического потенциала не превышал 5–10 мВ. Длительность импульса находится в пределах 3–5 с.

Электрическое сопротивление ($\mathcal{R}$) вычисляется по формуле:

$$\mathcal{R} = (\Delta\psi/I) \cdot \pi \cdot d \cdot l, \quad (2.1)$$

где $\Delta\psi$ – изменение величины РЭП при поляризации клетки током величиной I ; d – диаметр клетки; l – длина клетки в экспериментальном отсеке.

Сдвиги регистрируемых параметров по сравнению с нормой (контролем) используются для оценки избирательности и токсичности пестицидов.

Регистрация двух независимых параметров равноценна использованию двух тест-объектов, что позволяет углубить детализацию наблюдаемых эффектов.

Для сокращения времени проведения испытаний и получения статистически достоверных результатов измерения проводятся одновременно на нескольких клетках, располагающихся в камерах, которые образуют биоблок (рис. 2.3).

В состав измерительной системы входят блок генератора импульсов (стимулятор), блок электрометрических усилителей, устройство смены растворов.

Измерительная камера предназначена для укладки и надежного закрепления клеток водорослей, подачи и отведения необходимых растворов, установки токовых и измерительных электродов.

Блок усилителей состоит из идентичных независимых каналов (число которых определяется количеством тест-объектов) и обеспечивает регистрацию напряжений (разность электрических потенциалов). Стимулятор предназначен для пропускания через токовые электроды прямоугольных импульсов, по величине которых и вызываемых ими сдвигах напряжений определяется электрическое сопротивление клетки.

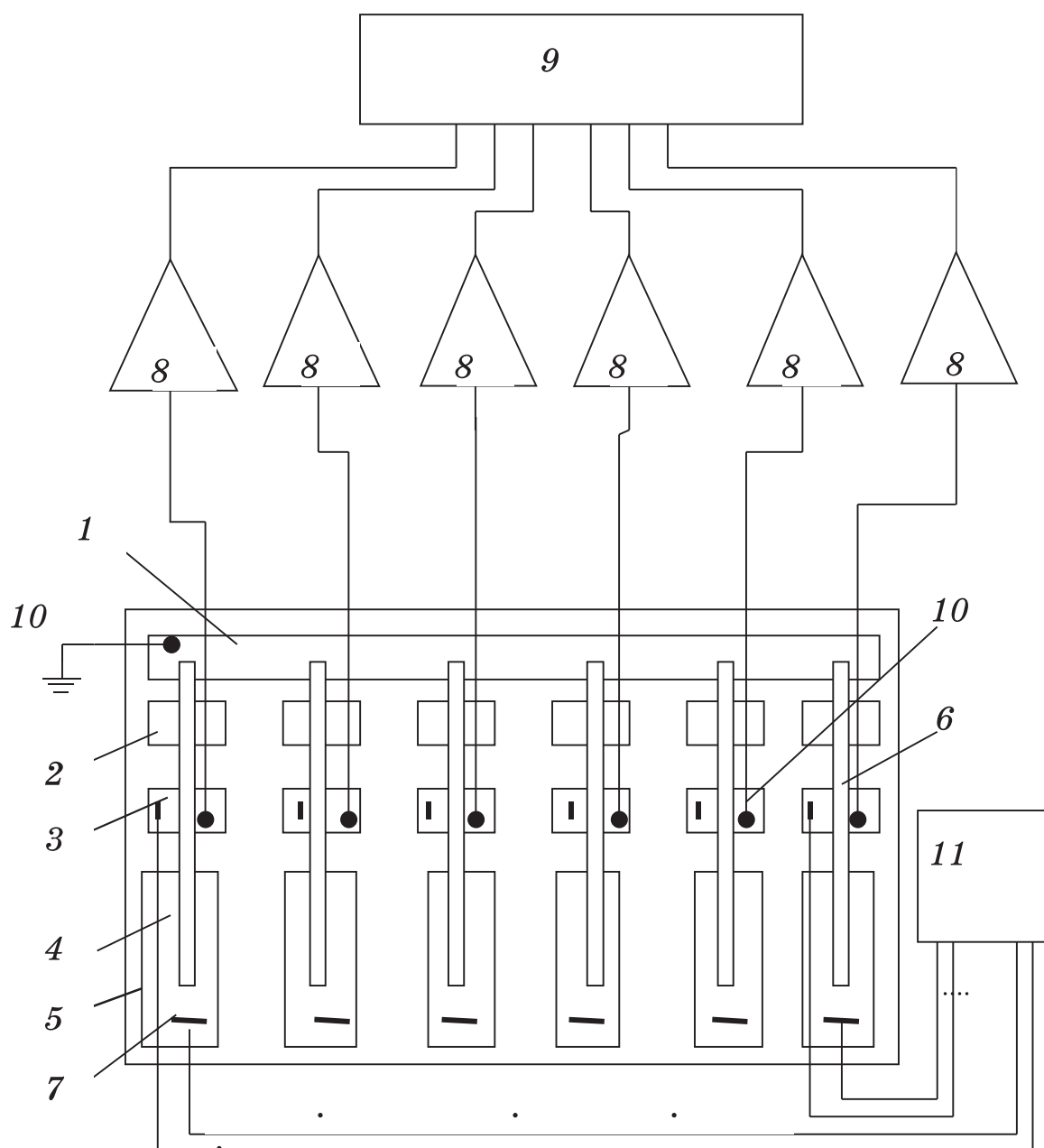


Рис. 2.3. Схема многоканальной установки:

1, 2, 3, 4 – отсеки камеры; 5 – биоблок; 6 – клетка; 7 – токовые электроды;
8 – электрометрические усилители; 9 – самопишущий прибор; 10 – измерительные электроды; 11 – стимулятор

Устройство смены растворов подает их в измерительные отсеки. Растворы заливаются в делительные воронки, соединенные с системой виниловых трубок, обеспечивающей постоянный проток через рабочие отсеки камеры.

Измерение скорости движения цитоплазмы (циклоз) проводят одновременно с регистрацией РЭП визуально под микроскопом. Регистрируется время прохождения частиц между двумя выбран-

ными делениями на окуляр-микрометре с помощью секундомера. Измерения проводят не менее пяти раз. Из полученного ряда чисел определяют среднеарифметическое значение. По нему рассчитывают среднюю скорость движения частиц (мкм/с), которая соответствует скорости движения протоплазмы.

2.4. Режимы и схемы тестирования

Отработка методов подготовки тест-объектов и системы регистрации их биоэлектрических параметров предназначена для обеспечения надежного и достоверного биологического анализа. Установлено, что для проведения биологического тестирования необходимо использовать клетки приблизительно одинакового возраста, находящиеся в одинаковых условиях предобработки.

Показано, что использование для биотестирования предварительно отпрепарированной второй – четвертой клетки междоузлий харовых водорослей и выдержанной не менее 12 ч до проведения анализа дает воспроизводимые результаты и достаточно высокую точность определения электрических параметров тест-объекта. Воспроизводимость и точность биологического анализа с помощью тест-объектов сохраняется в течение 72–84 ч после предобработки. Поэтому период 12–72 ч выбран как время использования подготовленного тест-объекта для проведения процедуры тестирования.

На результаты выявления биологической активности испытуемых препаратов существенное влияние оказывает не только подготовка тест-объекта указанным способом, но и поддержание стандартных условий измерения. Поэтому как предобработка, так и измерения параметров тест-объекта проводятся при температуре 18–24 °С и освещенности 300–400 лк, а клетки выдерживаются при нормальном чередовании режима дня и ночи (16 ч освещение, 8 ч темнота).

Для проведения биологического анализа избирательности и токсичности пестицидов измерение электрических параметров клеток харовых водорослей проводится в непрерывном режиме. Непрерывность регистрации разности электрических потенциалов обеспечивается автоматически выводом показания измерительного усилителя на самопишущий прибор. Для регистрации сопротивления мембраны подаются гиперполяризующие импульсы тока. Длительность и амплитуда импульсов тока ограничиваются таким образом, чтобы не вызвать изменений состава внутрикле-

точного содержимого и поляризацию измерительных электродов, а также не нарушить мембранные структуры тест-объекта. Поэтому длительность тестирующих импульсов тока – 4–10 с, а частота их следования – 0,03–0,01 Гц. Амплитуда импульсов тока выбрана таким образом, чтобы изменения потенциала покоя тест-объектов находились в пределах 5–10 мВ. Такая амплитуда, с одной стороны, позволяет определять сопротивление мембраны с достаточной точностью, с другой – не вызывает поляризации электродов.

В качестве контрольной среды используется раствор ИПВ, который представляет собой наиболее подходящую для тестовых схем среду.

Схема биотестирования выглядит следующим образом:

1) ИПВ → ИПВ + образец, разбавление 10^{-n} → ИПВ → ИПВ +
+ образец, разбавление 10^{-n+1} → и т. д.

или

2) ИПВ → ИПВ + образец, разбавление 10^{-n} → ИПВ + образец,
разбавление 10^{-n+1} → и т. д.

Длительность каждого этапа определяется выходом регистрируемых величин на стационарный уровень и обычно составляет 20–30 мин; полная длительность цикла – 0,5–4 ч в зависимости от количества необходимых разбавлений.

Для анализа используются пробы объемом не менее 50 мл. Скорость подачи проб анализируемой жидкости к биодатчику находится в пределах 1–2 мл/мин.

Предложенные схемы позволяют определять не только пороговые и обратимые действующие концентрации (дозы), но и выявлять интервалы избирательного действия и особенности зависимостей: структура – биологическая активность.

Раздел 3

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ ДЕЙСТВИЯ И ТОКСИЧНОСТИ ПЕСТИЦИДОВ

3.1. Порядок проведения испытаний

1. Приготовить ИПВ, используемую в качестве контрольной среды. Состав ИПВ: 10^{-4} моль/л KCl, 10^{-3} моль/л NaCl, 10^{-4} моль/л CaCl₂ и 10^{-3} моль/л трис(оксиметил)аминометан, соляная кислота, содержание которой определяется величиной pH ИПВ, равной $7,2 \pm 0,2$.

2. Приготовить маточный спиртовой раствор испытуемого препарата в концентрации 10^{-2} моль/л, а затем с помощью автоматического ручного дозатора (пипетки) приготовить экспериментальные растворы соответствующих концентраций (10^{-n} , 10^{-n+1} и т. д.).

3. За сутки до проведения испытаний отделить вторую либо третью от вершины таллома интернодальную клетку водоросли *Nitella flexilis* и поместить в чашку Петри, заполненную ИПВ. Измерить с помощью окуляр-микрометра под микроскопом диаметр клетки.

4. Подготовить камеру для биотестирования:

- очистить прорези камеры от вазелина и высушить фильтровальной бумагой;

- слегка подсушить фильтровальной бумагой клетку (тест-объект) и уложить с помощью пинцета в прорези между отсеками камеры. Прорези тщательно замазать вазелином;

- контрольный раствор (ИПВ) и испытуемый раствор пестицида залить в делительные воронки;

- соединить отсеки камеры шлангами с делительными воронками. Залить в отсеки 1, 2 и 3 ИПВ, 4 – раствор 10^{-1} моль/л KCl (см. рис. 2.2). Наладить непрерывный проток растворов через рабочие отсеки камеры (2 и 3). Проточность растворов через отсеки 2 и 3 обеспечивается за счет давления, создаваемого столбом жидкости в воронках;

- вставить измерительные каломельные полуэлементы в соответствующие гнезда камеры и соединить с электрометрическим усилителем.

5. Регистрация тест-реакции параметров клетки:

- измерить разность электрических потенциалов тест-объекта в ИПВ;
- измерить электрическое сопротивление тест-объекта в ИПВ;
- измерить скорость циклоза в ИПВ;
- закрыть кран делительной воронки, содержащей раствор ИПВ, который поступает в отсек 3, и открыть кран делительной воронки, заполненной экспериментальным раствором тестируемого пестицида;
- зарегистрировать стационарные значения РЭП, сопротивления плазматической мембраны и скорости движения цитоплазмы тест-объекта в результате воздействия исследуемого препарата;
- определить величины сдвигов регистрируемых параметров тест-объекта по отношению к контролю:

$$\Delta\Psi = \Psi_{\text{пест}} - \Psi_{\text{к}}, \quad (3.1)$$

$$\Delta\mathcal{R} = \mathcal{R}_{\text{пест}} - \mathcal{R}_{\text{к}}, \quad (3.2)$$

$$\Delta V = V_{\text{пест}} - V_{\text{к}}, \quad (3.3)$$

где $\Psi_{\text{к}}$, $\mathcal{R}_{\text{к}}$, $V_{\text{к}}$ и $\Psi_{\text{пест}}$, $\mathcal{R}_{\text{пест}}$, $V_{\text{пест}}$ – РЭП, сопротивление, скорость циклоза в контрольном растворе и в присутствии пестицида соответственно.

6. Полученные результаты занести в протокол № 1 (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Протокол испытаний № 1

Препарат, концентрация	Параметр	Тест-объект					Среднее значение
		1	2	3	4	5	
Пестицид, 10^{-n} , моль/л	$\Delta\Psi$						
	ΔR						
	ΔV						
Пестицид, 10^{-n+1} , моль/л	$\Delta\Psi$						
	ΔR						
	ΔV						
и т. д.	$\Delta\Psi$						
	ΔR						
	ΔV						

3.2. Обработка результатов измерений

1. Определить среднеарифметическое изменение величин РЭП, сопротивления плазматической мембраны и скорости движения цитоплазмы тест-объекта. Полученные результаты занести в протокол испытаний № 1.

2. Вычислить среднеквадратичное отклонение (σ) и ошибку среднеарифметического отклонения сдвигов регистрируемых параметров (Sd).

3. Проанализировать концентрационные зависимости сдвигов РЭП ($\Delta\Psi$), мембранного сопротивления ($\Delta\mathcal{R}$) и скорости движения цитоплазмы (ΔV) в результате воздействия пестицида:

- установить минимальные действующие (пороговые) концентрации пестицида;
- выявить концентрации пестицида, индуцирующие обратимые либо необратимые реакции тест-объекта;
- произвести оценку величин LC_{50} или LC_{100} , вызывающих соответственно половинное и полное подавление любой регистрируемой реакции.

4. Провести визуализацию результатов биологического тестирования с помощью диаграммы ($\Delta\Psi$, $\Delta\mathcal{R}$) (см. рис.1.2). При нанесении результатов на диаграмму сдвиги $\Delta\Psi$ и $\Delta\mathcal{R}$ определять как алгебраическую разность между регистрируемыми величинами при действии препарата и в контроле (см. табл. 3.1). Размеры зон 2, 4, 6 и 8 определяются как $1,5\cdot\sigma$.

5. Определить характер сдвигов ионной проницаемости плазматической мембраны. Используя диаграмму ($\Delta\Psi$, $\Delta\mathcal{R}$) и данные, представленные в разделе 1.8.2 (см. рис. 1.2), провести оценку сдвигов коэффициентов ионной проницаемости мембраны (P_i). Для обозначения характера изменения P_i используют следующие обозначения:

- увеличение коэффициента ионной проницаемости (+) ;
- уменьшение коэффициента ионной проницаемости (–);
- отсутствие сдвигов (0);
- неинтерпретируемые сдвиги (*).

Полученные данные занести в табл. 3.2.

Таблица 3.2

Протокол испытаний № 2

Препарат	Концентрация (доза), моль/л	Коэффициент проницаемости	
		P_K	P_r
Пестицид	10^{-n}		
	10^{-n+1}		
	и т. д.		

6. Определить степень потенциалзависимости сдвигов скорости циклоза клеток тест-объекта в результате воздействия пестицида с помощью диаграммы (ΔV , $\Delta \Psi$) (см. рис. 1.3). Полученные данные занести в табл. 3.3.

Таблица 3.3

Протокол испытаний № 3

Препарат	Концентрация (доза), моль/л	Характер зависимости ΔV от $\Delta \Psi$
Пестицид	10^{-n}	Строго потенциалзависимая реакция
	10^{-n+1}	Потенциалзависимость изменений скорости циклоза отсутствует
	и т. д.	

7. Оценить характер действия пестицида:

- установить степень токсического действия пестицида по предлагаемой шкале (табл. 3.4).

Таблица 3.4

Оценка токсичности препарата

Степень токсичности	Сдвиги параметров		
	$\Delta \Psi$, мВ	$\Delta \mathfrak{X}$, кОм·см ²	ΔV , см/с
Сильная токсичность	до $(-30)-(-50)$	до 3–5	до 0
Умеренная токсичность	на 30–40	на 10–20	на 15–20
Слабая токсичность	на 10–20	на 3–5	на 5–20

* Оценка токсичности проводится по результатам изменения трех регистрируемых параметров.

- установить избирательность действия пестицида на основании оценки сдвигов проницаемости мембраны к калию (P_K) и прочим ионам (P_r);

- выявить прямое либо опосредованное действие пестицида на процесс движения цитоплазмы, а также установить характер его мембранотропности.

8. На основании анализа полученных закономерностей сделать заключение о биологической активности пестицида.

3.3. Техника безопасности при проведении испытаний биологической активности пестицидов

Пестициды, применяемые для защиты растений от вредителей и болезней, вследствие прямого контакта или загрязнения ими воздуха могут быть причиной отравления. Поэтому при работе с пестицидами необходимо строго выполнять все указания по технике безопасности

Большинство пестицидов при неумелом и неосторожном обращении может вызвать у людей и у животных как быстро проявляющиеся признаки отравления, так и отдаленные последствия их при постоянном воздействии на организм, даже в небольших дозах.

Сильнодействующие, высокотоксичные пестициды, а также соединения с повышенной летучестью способны вызывать стойкие отравления.

Стойкие препараты с выраженной способностью к кумуляции при постоянном или периодическом поступлении в организм могут быть причиной хронических отравлений.

Меры предосторожности при работе с пестицидами. Из-за токсичности пестицидов все работы с ними должны проводиться под строгим контролем, после обязательного проведения инструктажа по технике безопасности работы с пестицидами. Подготовка образцов и процедура биологического тестирования проводятся при соблюдении правил и требований техники безопасности, утвержденных соответствующими отраслевыми инструкциями или другими нормативными документами, регламентирующими работу в химических лабораториях и с оборудованием под напряжением.

Отвечают за организацию работ и соблюдение при этом правил охраны труда руководители работ. Во время проведения испытаний препаратов запрещается принимать пищу, пить, курить, работать без спецодежды.

Рассыпанный препарат следует убирать сухим способом.

Хранение пестицидов. Пестициды хранят в упакованном виде под замком. Упакованные в тару препараты должны быть снабжены краткими инструкциями по обращению, хранению и применению, а также этикетками с товарным знаком. Выдача пестицидов для проведения исследований производится по распоряжению руководителя работ с обязательной регистрацией в журнале. В конце проведения работ неиспользованные пестициды

и предназначенная для их хранения лабораторная посуда сдаются руководителю работ.

Пестициды, пришедшие в негодность, уничтожают в установленном порядке.

Первая помощь при отравлении. На местах работ с пестицидами должна храниться аптечка первой доврачебной помощи.

При первых признаках отравления (тошнота, рвота, общее недомогание) немедленно вывести пострадавшего на свежий воздух.

При попадании на кожу – осторожно, не втирая, удалить препарат ватой или куском материи, смыть струей воды с мылом, не размазывая по коже и не втирая.

При попадании препарата в глаза – промывать глаза в течение 15 мин под струей воды, стараясь держать глаза открытыми. Если осталось раздражение слизистой оболочки, немедленно обратиться к врачу.

При случайном проглатывании – немедленно вызвать врача, предъявить ему тарную этикетку. Если пострадавший в сознании – дать ему выпить несколько стаканов теплой воды или слабого раствора марганцовокислого калия и вызвать рвоту. После рвоты дают выпить взвесь активированного угля в большом количестве воды из расчета 3–5 столовых ложек на 1 стакан, затем раздражением задней стенки глотки вызвать рвоту; если пострадавший без сознания – нельзя пытаться вызвать рвоту или вводить что-то через рот. Необходимо немедленно вызвать врача!

ЛИТЕРАТУРА

- Альберт, А.* Избирательная токсичность / А. Альберт. – М., 1989.
- Гольшин, М. Н.* Фунгициды / М. Н. Гольшин. – М., 1993.
- Дитченко, Т. И.* Молекулярно-мембранные механизмы действия триазоловых фунгицидов на транспорт ионов в растительную клетку : дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.16 – экология, 03.00.12 – физиология и биохимия растений / Т. И. Дитченко. – Минск, 2002.
- Кларксон, Д.* Транспорт ионов и структура растительной клетки / Д. Кларксон. – М., 1978.
- Лахвич, Ф. А.* Биорациональные химические средства защиты растений новых поколений / Ф. А. Лахвич, А. И. Быховец // Химический метод защиты растений. Состояние и перспективы повышения экологической безопасности. – СПб., 2004. – С. 184–186.
- Медведев, С. С.* Электрофизиология растений / С. С. Медведев. – СПб., 1998.
- Мельников, Н. Н.* Справочник по пестицидам / Н. Н. Мельников. – М., 1995.
- Ониани, Д. А.* Физико-химические механизмы регулирования циклозиса растительной клетки : дисс. ... д-ра биол. наук : 03.00.02 / Д. А. Ониани. – Тбилиси, 1987.
- Оприлов, В. А.* Биоэлектрогенез у высших растений / В. А. Оприлов, С. С. Пятыйгин, В. Г. Ретивин. – М., 1991.
- Создание нового поколения препаративных форм средств защиты растений на основе нанодисперсных полимерных систем, обладающих повышенным биоцидным действием против фитопатогенов / Э. В. Попова [и др.] // Проблемы защиты растений в условиях современного сельскохозяйственного производства. – СПб., 2009. – С. 117–120.
- Федоров, Л. А.* Пестициды – токсический удар по биосфере и человеку / Л. А. Федоров, А. В. Яблоков. – М., 1999.
- Юрин, В. М.* Основы ксенобиологии / В. М. Юрин. – Минск, 2001.
- Юрин, В. М.* Регуляция ионного транспорта через мембрану растительной клетки / В. М. Юрин, А. И. Соколик, А. П. Кудряшов. – Минск, 1991.
- Яковец, О. Г.* Индуцированные симметричными триазидами функциональные перестройки катионных транспортных систем плазмалеммы растительных клеток : дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.12 / О. Г. Яковец. – Минск, 2003.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ЗНАЧЕНИЕ t КРИТЕРИЯ СТЬЮДЕНТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ ЗНАЧИМОСТИ P

Число степеней свободы	Уровень значимости P		
	0,1	0,05	0,01
1	6,31	12,7	63,66
2	2,92	4,30	9,93
3	2,35	3,18	5,84
4	2,13	2,78	4,60
5	2,02	2,57	4,03
6	1,94	2,45	3,71
7	1,90	2,37	3,50
8	1,86	2,31	3,36
9	1,83	2,26	3,25
10	1,81	2,23	3,17
11	1,80	2,20	3,11
12	1,78	2,18	3,06
13	1,77	2,16	3,01
14	1,76	2,15	2,98
15	1,75	2,13	2,95
16	1,75	2,12	2,92
17	1,74	2,11	2,90
18	1,73	2,10	2,88
19	1,73	2,09	2,86
20	1,73	2,09	2,85
21	1,72	2,08	2,83
22	1,72	2,07	2,82
23	1,71	2,07	2,81
24	1,71	2,06	2,80
25	1,71	2,06	2,79
26	1,71	2,06	2,78
27	1,70	2,05	2,77
28	1,70	2,05	2,76
29	1,70	2,05	2,76
30	1,70	2,04	2,75
∞	1,64	1,96	2,58

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
Раздел 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ	6
1.1. Общая характеристика пестицидов	6
1.2. Механизмы избирательного действия химических соединений	16
1.3. Тестирование биологической активности химических соединений	24
1.4. Мембранотропные эффекты	28
1.5. Дозы и показатели токсичности.....	29
1.6. Электрические явления у растений	36
1.7. Циклоз	40
1.8. Интерпретация результатов испытаний	42
1.8.1. Теория «постоянного поля» Гольдмана	43
1.8.2. Визуализация полученных результатов в электрофизиологическом эксперименте.....	44
1.8.3. Потенциалзависимость скорости циклоза	45
1.8.4. Статистическая обработка результатов	46
Раздел 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	48
2.1. Описание тест-объекта и способа его выращивания	48
2.2. Приготовление сред и подготовка тест-объекта для лабораторных испытаний.....	50
2.3. Регистрация тест-параметров.....	52
2.4. Режимы и схемы тестирования.....	57
Раздел 3. ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ ДЕЙСТВИЯ И ТОКСИЧНОСТИ ПЕСТИЦИДОВ.....	59
3.1. Порядок проведения испытаний	59
3.2. Обработка результатов измерений.....	60
3.3. Техника безопасности при проведении испытаний биологической активности пестицидов	63
ЛИТЕРАТУРА.....	65
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	66

Учебное издание

Юрин Владимир Михайлович
Дитченко Татьяна Ивановна
Яковец Оксана Геннадьевна и др.

**ОЦЕНКА ИЗБИРАТЕЛЬНОСТИ
ДЕЙСТВИЯ ПЕСТИЦИДОВ
НА РАСТЕНИЯ**
(электрофизиологический метод)

**Методические указания
для студентов биологического факультета**

Редактор Ю. Н. Гойко
Художник обложки Т. Ю. Таран
Технический редактор Г. М. Романчук
Корректор В. И. Богданович
Компьютерная верстка Л. Л. Мартыновой

Электронный ресурс 1,3 Мб
Режим доступа: www.elib.bsu.by, ограниченный
Дата доступа:

Белорусский государственный университет.
ЛИ № 02330/0494425 от 08.04.2009.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.