

**Классификация химических соединений и проб жидкости
по степени токсичности (в % от контроля)**

Параметр	Концентрация, М	Классы токсичности			
		чрезвычайно токсичные	высоко токсичные	умеренно токсичные	мало токсичные
$\Delta\psi$, мВ	10^{-6}	>90	60–90	30–59	<30
ΔR , кОм·см ²	10^{-6}	>90	60–90	30–59	<30

Полученные нами экспериментальные результаты показали, что экспрессную эффективную оценку токсических эффектов можно осуществить по биоэлектрическому ответу клеток харовых водорослей.

В заключение следует отметить, что без применения методов биологического тестирования невозможно дать оценку токсического действия однокомпонентного и сочетанного действия химических соединений и оценить степень их биобезопасности.

ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ K⁺-КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДЕЛЬТАМЕТРИНА

В.М. Юрин, А.И. Соколик, Е.Н. Крытынская, О.Г. Яковец

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

krylena@inbox.ru

Широко представленные на рынке синтетические пиретроидные препараты обладают высокой инсектицидной активностью с широким спектром действия. Потенциальная ценность фотоустойчивых пиретроидов для защиты растений стимулировала большой объем работы по исследованию их механизма действия, путей деградации, а также токсического эффекта в различных биологических системах на разных уровнях организации (клеточном, тканевом, организменном). Вопросы относительно фитотоксического влияния инсектицидов до сих пор мало изучены: не выявлены механизмы, лежащие в основе наблюдаемой разной цитотоксичности в зависимости от вида растения, до конца не установлены закономерности мембранотропных эффектов у защищаемых растений, тогда как плазматическая мембрана является первым барьером на пути поступления данных ксенобиотиков.

Ранее проведенные нами исследования установили модифицирующее действие препаратов на проницаемость плазматической мембраны растительной клетки к катионам (K⁺, Na⁺) [1] и функциональную активность потенциал-зависимых K⁺-каналов [2]. В настоящей работе поставлена задача установить закономерности модифицирующего действия дельтаметрина на катионную избирательность внутри- (Г) и наружу- (Д) выпрямляющих типов K⁺-каналов плазматической мембраны растительных клеток.

В работе использовали коммерческий препарат пиретроидного инсектицида Децис, 12 % (действующее вещество – дельтаметрин или (1R)-цис-3-(2,2-дибромовинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты (S)-3-фенокси- α -цианобензиловый эфир) фирмы Bayer в концентрациях 10^{-5} и 5×10^{-5} моль/л (по действующему веществу), при которых мембранотропный эффект данного инсектицида наиболее выражен [3]. Исходные маточные растворы 10^{-2} моль/л, использованные для приготовления экспериментальных сред, получены путем разбавления этиловым спиртом (96 %) коммерческого препарата. Экспериментальные среды готовились с добавлением в контрольные растворы соответствующего количества 1 % спиртового раствора инсектицидов.

Объектом исследований служили клетки харовой водоросли *Nitella flexilis* L. Agardz, культивируемой в лабораторных условиях. В экспериментах использовались отпрепарированные от таллома вторая–третья интернодальные клетки, имеющие длину 4–7 см и 0,02–0,03 см в диаметре. Для устранения влияния активной компоненты ионного транспорта (H^+ -АТФазной помпы) клетки были предварительно адаптированы к условиям темноты в течение 2–3 суток. В растворе инсектицида клетки находились в течение 3–4 часов (кратковременные эксперименты).

Селективность катионных каналов плазматической мембраны *Nitella flexilis* изучалась посредством регистрации электрофизиологических характеристик с применением микроэлектродной техники и методики фиксации напряжения [4]. Измерения проводили в условиях темноты.

Были получены мгновенные вольт-амперные характеристики плазматической мембраны (МВАХ) по достижению стационарного уровня проводимости каналов при фиксации потенциала на гиперполяризованном (–160 мВ) и деполяризованном (–20 мВ) уровнях. Снятие МВАХ проводилось в импульсном режиме; после фиксации потенциала мембраны на заданном уровне и установлении стационарного тока фиксации производили смещения РЭП мембраны от заданного уровня в сторону гипер- и деполяризации. Длительность импульсов напряжения составила 20 мс, а амплитуда каждого последующего импульса ступенчато нарастала с шагом в 20 мВ. Одновременно с подачей импульсов напряжения производилась регистрация импульсов тока. МВАХ представляли собой зависимости величин напряжения на мембране (заданный уровень РЭП плюс амплитуда импульса напряжения) и тока фиксации за вычетом емкостной его составляющей.

В работе использовали двухкомпонентные растворы одновалентных катионов: Li^+ , Na^+ , $TЭА^+$, Cs^+ , Rb^+ , NH_4^+ и K^+ . Проводили последовательную замену контрольных и экспериментальных (в присутствии пиретроида) растворов хлорид ионов (3×10^{-3} iCl; 10^{-4} $CaCl_2$) в строгой последовательности от $i = Li^+$, Na^+ , $TЭА^+$, Cs^+ (плохо проникающих) к Rb^+ , NH_4^+ и K^+ (хорошо проникающим) ионам. Последним раствором, необходимым для вычисления вклада утечки, был раствор, содержащий 3×10^{-3} NaCl; 3×10^{-3} CsCl; 10^{-4} $CaCl_2$.

Изменения избирательности K^+ -каналов под действием дельтаметрина оценивалось двумя способами: измерением как потенциала реверсии тока (ПРТ), идущего через K-каналы в растворах, содержащих тестируемый катион; так и величины входящего тока через K-каналы (ток при напряжении более высоком, чем потенциал реверсии). В этом случае ток равен по величине однонаправленному потоку иона и практически пропорционален проницаемости канала к данному иону и его концентрации. Оба способа дают качественно одинаковые ряды селективности, однако наиболее достоверным является второй (по величине токов), за вычетом тока неселективной ионной утечки [4]. Так как утечка представляет собой совокупность выходящего из цитоплазмы потока анионов (хлора) и входящего потока плохо проникающих катионов кальция, триса, то при определении селективности K^+ -каналов вторым способом входящий ток одновалентного иона (при наличии двухкомпонентных растворов Li^+ , Na^+ , $TЭА^+$, Cs^+ , Rb^+ , NH_4^+ и K^+) представляли как разность: $I_i - I_y$

где $I_i = I_{i/k} + I_{i/y}$ – суммарный ток i-иона, включающий $I_{i/k}$ – ток иона непосредственно через K^+ -каналы и $I_{i/y}$ – ток иона через неселективную утечку; I_y – суммарный ток ионной утечки = $I_{Na/y}^+ + I_{Cl^-} + I_{Ca^{2+}}$, триса. Поскольку последняя компонента – $I_{Ca^{2+}}$, триса намного меньше по величине I_i , ей можно пренебречь и тогда $I_y = I_{Na/y}^+ + I_{Cl^-}$.

Величину $I_{Na/y}^+$ можно вычислить, зная, что $I_{Cs^+} = I_{Cs/k}^+ + I_{Cs/y}^+$ и $I_{Na^+ Cs^+} = I_{Na/y}^+ + I_{Cs/k}^+ + I_{Cs/y}^+$. Используя Cs^+ в качестве блокатора $I_{Na/k}^+$, можно определить $I_{Na/y}^+$ на основании разности $I_{Na^+ Cs^+} - I_{Cs^+}$. Таким образом были произведены расчеты и установлена величина тока ионной утечки для каждого раствора в контроле и в присутствии инсектицида.

Ряды селективности в контроле, установленные двумя способами, для Г- и Д-каналов были качественно одинаковыми и практически соответствовали ранее полученным результатам других исследователей: $K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Na^+ \geq Li^+ > Cs^+ > TЭА^+$ [4].

В концентрации 5×10^{-5} дельтаметрин вызывал в присутствии слабо проникающих катионов (Li^+ , Na^+) необратимую деполяризацию, ведущую к гибели клетки (наблюдался плазмолиз), такой же эффект наблюдался под действием данной концентрации инсектицида в ИПВ после выдерживания клеток 2–4 суток в темноте. Под действием препарата в меньшей концентрации (10^{-5} моль/л) наблюдалось увеличение величины входящего тока (ВТ) обоих типов K^+ -каналов для катионов – Na^+ , Li^+ , Cs^+ , $TЭА^+$, Rb^+ , NH_4^+ , и снижение до 30 % в среднем для K^+ (рис.1).

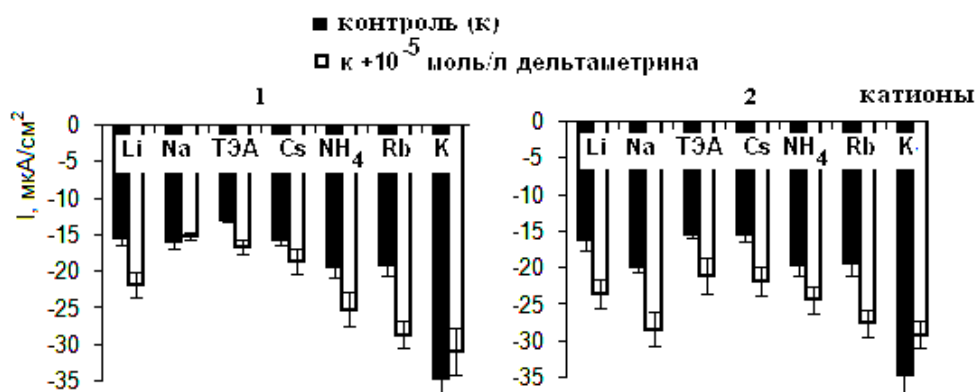


Рис. 1 Изменение величины входящего тока для К-каналов Г-(1) и Д-(2) типа в присутствии катионов Li^+ , Na^+ , $TЭА^+$, Cs^+ , Rb^+ , NH_4^+ и K^+ под действием дельтаметрина

Для отдельных клеток с хорошо активированными K^+ -каналами наблюдалось еще большее снижение (до 50 %) величины ВТ в растворе с катионом K^+ (для Г-каналов). Наибольший рост величины ВТ наблюдался для ионов Li^+ , Na^+ , Rb^+ , NH_4^+ . Установленные изменения величины ВТ в присутствии инсектицида свидетельствуют о снижении селективных свойств обоих типов K^+ -каналов (см. рис.1). У части клеток со слабо активированными K^+ -каналами, дельтаметрин практически не оказывал влияния на селективную избирательность.

В проводимых экспериментах наблюдался сдвиг потенциала реверсии тока в сторону деполяризации относительно контрольных значений (рис.2). Для Г-каналов этот сдвиг наиболее выражен, для Д-каналов в общем наблюдалась та же тенденция. Качественно ряды селективности практически не изменились $K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Na^+ \geq Li^+ > Cs^+ > TЭА^+$, но количественно величина отношения проницаемости иона к проницаемости иона K^+ (P_i / P_K) возросла.



Рис. 2. Смещение потенциала реверсии тока (ПРТ) МВАХ К-каналов Г-(1) и Д-(2) типов в присутствии одновалентных катионов Li^+ , Na^+ , $TЭА^+$, Cs^+ , Rb^+ , NH_4^+ и K^+ под действием дельтаметрина

Было установлено, что величина тока ионной утечки под действием пиретроида практически не изменялась и в среднем составило 11 % для каналов обоих типов. Для некоторых ионов наблюдалась тенденция к снижению величины тока неселективной утечки для ряда ионов, в то же время, для раствора с ионом K^+ эта величина возрастала. Нужно отметить, что в присутствии инсектицида, как и в контроле, Cs^+ выступал блокатором K^+ -каналов, что оправдывает принятый способ определения ионной утечки.

Таким образом, модифицируемое действие пиретроидного инсектицида дельтаметрина на селективность K^+ -каналов плазматической мембраны в конечном итоге может негативно сказаться на обмене веществ между клеткой и окружающей средой.

Литература

1. Юрин В.М., Крытынская Е.Н. Модификация натрий-калиевой проницаемости внешней плазматической мембраны растительной клетки под влиянием пиретроидов // Актуальные проблемы изучения фито- и микобиоты. Сборник статей Междунар. науч.-практ. конф.. Минск, 2004.— С. 272–274
2. Крытынская Е.Н., Яковец О.Г., Юрин В.М. Функциональная активность K^+ -каналов в присутствии пиретроидных инсектицидов // Сборник статей Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и VIII съезда Белорусского общественного объединения фото-биологов и биофизиков. Минск, 2008.
3. Яковец О.Г., Юрин В.М. Воздействие пиретроидных инсектицидов на биоэлектрическую реакцию плазмалеммы растительных клеток // 8-я Международная Пушкинская школа-конф. молодых ученых.— Пушкино, — 2004.— С.237.
4. Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Мн.: Навука і тэхніка. 1991. — 271с.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЦИПЕРМЕТРИНОМ ИЗМЕНЕНИЯ НЕСЕЛЕКТИВНОЙ ИОННОЙ УТЕЧКИ

О.Г. Яковец, Е.Н. Крытынская, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
yakovets@inbox.ru

Неселективная ионная проводимость плазмалеммы является существенным компонентом системы мембранного транспорта ионов у растений. Утечка может представлять реальный и основной путь проникновения в клетки тех элементов минерального питания (например, микроэлементов), которые дискриминируются селективными ионными каналами.

В настоящее время все настоятельнее высказывается мнение, подтверждаемое экспериментальными данными [1], что для растений, особенно высших, характерно наличие неселективных катионных каналов (НKK), которые характеризуются высокой избирательностью для катионов по сравнению с анионами, но проявляют низкую селективность среди катионов в широком диапазоне концентраций. Следует отметить, что неселективный ионный путь, в частности, НKK, имеет особенности по сравнению с селективными ионными каналами: по сравнению с селективными каналами наблюдается слабое взаимодействие с проходящими ионами. Это может оказаться весьма полезным в условиях изменений ионного состава почвенных растворов; например, когда поступление K^+ должно происходить в присутствии Cs^+ , или Ca^{2+} поступает при наличии других двухвалентных катионов. В-третьих, этот путь обеспечивает возможность пассивного поступления катионов, для которых диффузия через высокоселективные каналы затруднена (например, NH_4^+ или Mg^{2+}).

Проведенные исследования неселективной ионной проводимости плазмалеммы клеток харовой водоросли *Nitella flexilis* [2] показали, что избирательность утечки в ряду одновалентных катионов K^+ , Na^+ , Cs^+ отсутствует и наблюдается приблизительно двукратное уменьшение проводимости при переходе к двухвалентным катионам (Mg^{2+} , Ca^{2+}), причем