

Григорий Григорьевич Мартинович – младший научный сотрудник.

Сергей Николаевич Черенкевич – доктор биологических наук, профессор.

Андрей Анатольевич Денисов – младший научный сотрудник.

Павел Геннадьевич Молчанов – младший научный сотрудник.

Павел Михайлович Булай – аспирант кафедры биофизики. Научный руководитель – С.Н. Черенкевич.

УДК 587.17

О.Г. ЯКОВЕЦ, В.М. ЮРИН, А.П. КУДРЯШОВ, Е.М. ЛИС

МОДИФИКАЦИЯ АТРАЗИНОМ И СИМАЗИНОМ ИОН-СЕЛЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК *NITELLA FLEXILIS*

Using electrophysiological approaches to research of ion-selective properties of plasmalemma, change of coefficient Na^+/K^+ -selectivity (α) of plasmalemma of *Nitella flexilis* cells at presence *s*-triazine herbicides atrazine and simazine is established. It was shown that the increase α at presence $2,3 \cdot 10^{-5}$ M and $9,3 \cdot 10^{-5}$ M atrazine is caused in the greater degree by reduction of permeability of plasmalemma to ions K^+ (P_K) and at presence $9,9 \cdot 10^{-5}$ M simazine increase of permeability of plasmalemma to ions of Na^+ (P_{Na}). The decrease of α at presence $4,6 \cdot 10^{-5}$ M atrazine and $2,1 \cdot 10^{-5}$ M simazine is connected with the reduction of P_{Na} . The cause of observable effects may consist in influence of *s*-triazines on K^+ -channels of plasmalemma, and/or on a condition of lipid bilayer and a *s*-triazine-ring of herbicides. Character of the changes of ion-permeability of a membrane is determined by a nature of alkylamine substituents in a *s*-triazine-ring of herbicides.

Приспособление растительного организма к условиям гербицидного стресса, заключающееся в перестройке метаболизма [1], возможно, начинается уже на уровне внешней плазматической мембраны и происходит в результате индуцированных мембранотропных процессов.

Ионная селективность, лежащая в основе барьерно-транспортных свойств плазмалеммы, обеспечивает нормальное функционирование растения, и поэтому уже незначительные ее изменения могут являться, с одной стороны, свидетельством развивающихся адаптационных процессов, а с другой – необратимых для организма последствий [2].

Ранее [3] нами уже было показано, что прометрин вызывает увеличение коэффициента Na^+/K^+ -селективности плазмалеммы, происходящее за счет уменьшения ее проницаемости к ионам K^+ . Атразин и симазин являются химическими аналогами прометрина и отличаются от него присутствием в молекуле атома хлора, а также алкиламинными заместителями. Структурные отличия молекул данных *сим*-триазиновых гербицидов могут быть причиной их качественно различного мембранотропного воздействия, степень которого можно оценить с помощью электрофизиологических методов.

Материал и методика

Эксперименты проводились на интернодальных клетках харовой водоросли *Nitella flexilis*, выращенной в лабораторных условиях на питательной среде состава: $2 \cdot 10^{-4}$ M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $4 \cdot 10^{-4}$ M CaCl_2 , 10^{-4} M KH_2PO_4 , 10^{-3} M NaHCO_3 .

Измерения электрических характеристик плазматической мембраны клеток осуществлялись с помощью микроэлектродной техники [4] в условиях варьирования в наружной среде концентрации ионов K^+ (C_K) за счет изменения концентрации ионов Na^+ (C_{Na}) при постоянстве концентраций хлорид иона и одновалентных катионов $C_K + C_{\text{Na}} = 1,1 \cdot 10^{-3}$ M при температуре 20 ± 2 °C. Для удаления обменных ионов Ca^{2+} из клеточной стенки предварительно отпрепарированные клетки на 1 сут помещались в 5 mM раствор NaCl [4], а затем для подавления функционирующей на плазмалемме *N. flexilis* фотоиндуцируемой H^+ АТФазной помпы выдерживались в течение 3–4 сут в темноте. Поэтому все дальнейшие манипуляции также осуществлялись в темноте.

В качестве контроля использовались 5 вариантов среды состава: I – 1,0 мМ NaCl, 0,1 мМ KCl; II – 0,8 мМ NaCl, 0,3 мМ KCl; III – 0,6 мМ NaCl, 0,5 мМ KCl; IV – 0,3 мМ NaCl, 0,8 мМ KCl; V – 0,1 мМ NaCl, 1,0 мМ KCl. Атразин и симазин добавлялись к указанным средам в виде 1 % спиртового раствора. Кислотность всех растворов на уровне 7,0 поддерживалась с помощью 1,0 мМ *трис*-буфера.

Аппроксимация экспериментально полученных данных осуществлялась с использованием программы Microsoft Excel с помощью метода наименьших квадратов.

Результаты и их обсуждение

Основными электрофизиологическими характеристиками внешней плазматической мембраны являются разность электрических потенциалов (РЭП, Ψ) и сопротивление ($\mathfrak{R}$). Величина данных параметров формируется в результате функционирования пассивных и активных ион-транспортных систем. Условия проводимых нами экспериментов предполагают преимущественное участие в этом процессе пассивных ион-транспортных систем, когда изменения РЭП и сопротивления описываются уравнениями Гольдмана, которые в условиях постоянства концентрации хлорид-ионов в наружной среде принимают следующий вид [5]:

$$\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_K^{\text{в}} + \alpha C_{\text{Na}}^{\text{в}}}{C_K^{\text{с}} + \alpha C_{\text{Na}}^{\text{с}}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_K^{\text{в}} + \alpha C_{\text{Na}}^{\text{в}}}{C^{\text{с}}}, \quad (1)$$

$$\mathfrak{R} = \frac{(RT)^2}{F^3 P_K} \frac{1 - \exp(-\Psi F / RT)}{\Psi (C_K^{\text{в}} + \alpha C_{\text{Na}}^{\text{в}})}, \quad (2)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, F – постоянная Фарадея, $C_K^{\text{в}}$ и $C_{\text{Na}}^{\text{в}}$ – концентрации ионов K^+ и Na^+ в наружной среде соответственно, $C_K^{\text{с}}$ и $C_{\text{Na}}^{\text{с}}$ – концентрации ионов K^+ и Na^+ в клетке соответственно, $C^{\text{с}}$ – суммарная концентрация ионов в клетке, α – коэффициент Na^+/K^+ -селективности ($\alpha = P_{\text{Na}}/P_K$, где P_{Na} – проницаемость плазмалеммы к ионам Na^+ , P_K – проницаемость плазмалеммы к ионам K^+).

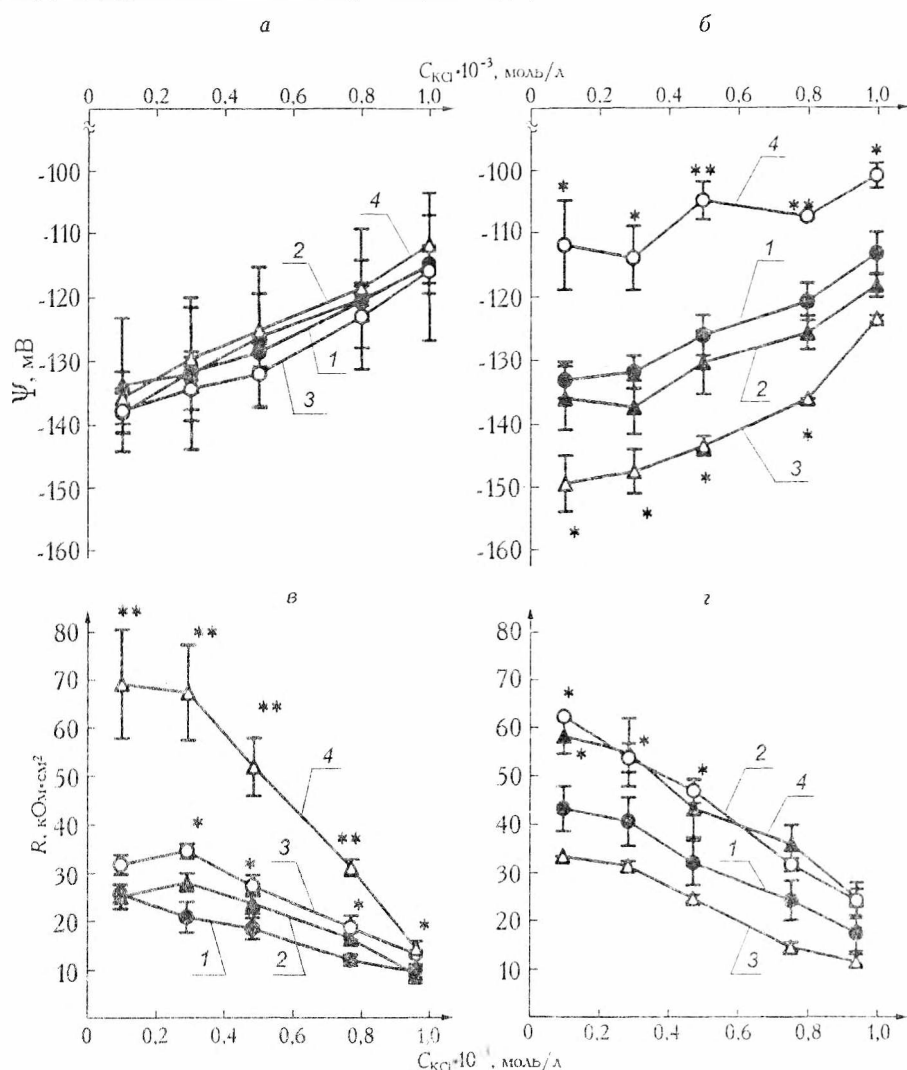
Под воздействием сим-триазинов (сразу после их появления в среде) отмечались сдвиги электрофизиологических характеристик мембраны, причем время их установления составляло 10–20 мин. Последнее свидетельствует, вероятно, о непосредственном воздействии испытываемых веществ на ион-транспортные системы плазмалеммы.

Сделанные нами ранее выводы [6, 7] нуждались в уточнении, что потребовало проведения дополнительных экспериментов, результаты которых и их обсуждение приводятся ниже.

Исследования показали, что на десятикратное увеличение концентрации ионов K^+ в среде мембрана в контроле реагировала плавной деполяризацией и уменьшением сопротивления (рисунок). Добавление гербицидов вызывало ее аналогичную реакцию, за исключением действия на сопротивление при смене среды I на среду II $2,3 \cdot 10^{-5}$ М и $4,6 \cdot 10^{-5}$ М растворов атразина. При этом наблюдалось незначительное увеличение сопротивления, которое не оказывало существенного влияния на общую картину уменьшения данного электрофизиологического параметра мембраны и дальнейшие расчеты.

Экспериментально полученные значения РЭП в контроле в присутствии $2,5 \cdot 10^{-5}$ М и $9,9 \cdot 10^{-5}$ М симазина, а также всех испытанных концентраций атразина при увеличении концентрации ионов K^+ в наружной среде хорошо аппроксимировались уравнением (1).

На основе проведенных расчетов оценены величины коэффициентов Na^+/K^+ -селективности плазмалеммы (α) в контроле и в присутствии сим-триазинов. Полученные значения α представлены в таблице.



Зависимость РЭП (а, б) и сопротивления (в, г) плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* от концентрации калия в наружной среде при варьировании содержания атразина (а, б): 1 - контроль; 2 - $2,3 \cdot 10^{-5}$; 3 - $4,6 \cdot 10^{-5}$; 4 - $9,3 \cdot 10^{-5}$ М и симазина (б, г): 1 - контроль; 2 - $2,5 \cdot 10^{-5}$; 3 - $5,0 \cdot 10^{-5}$; 4 - $9,9 \cdot 10^{-5}$ М. Различия между средними значениями относительно контроля статистически достоверны при уровне значимости $P=0,05$ (*) и $P=0,01$ (**)

Как видно из содержащихся в ней данных, вызываемые атразином изменения величины α происходят на фоне уменьшения P_K и P_{Na} . Однако при $2,3 \cdot 10^{-5}$ М и $9,3 \cdot 10^{-5}$ М атразина рост α обусловлен преимущественным уменьшением P_K по сравнению с P_{Na} относительно контроля, а уменьшение α в присутствии $4,6 \cdot 10^{-5}$ М гербицида - более значительным уменьшением P_{Na} по сравнению с P_K относительно контроля. Присутствие симазина в концентрации $2,3 \cdot 10^{-5}$ М вызывало снижение α (см. таблицу) без существенных изменений величины P_K и связано с уменьшением P_{Na} . Увеличение концентрации симазина до $9,3 \cdot 10^{-5}$ М приводило к росту α более чем в 3 раза. Расчеты показали, что наблюдаемый эффект обусловлен преимущественным увеличением P_{Na} . При этом в растворе P_K уменьшается, а при увеличении содержания ионов K^+ в среде отмечается заметный ее рост, но меньше степени возрастания P_{Na} .

Таким образом, атразин и симазин, воздействуя на электрофизиологические параметры плазмалеммы, оказывают различное влияние на ее прони-

цаемость к ионам K^+ и Na^+ : для атразина характерна в основном одноп-
равленность воздействия, т. е. уменьшение P_K и P_{Na} ; симазин же в зависи-
мости от концентрации либо увеличивает, либо уменьшает проницаемость
мембраны.

Значения α и коэффициентов проницаемости плазмалеммы к ионам K^+ и Na^+
при варьировании содержания симметричных триазинов в среде

Концентрация гербицида, М	α	Ионная проницаемость ($\cdot 10^{-7}$, см/с)	Концентрация калия в наружной среде, мМ				
			0,1	0,3	0,5	0,8	1,0
Атразин							
0	0,337	P_K	4,42	4,36	4,08	5,15	5,90
		P_{Na}	1,49	1,47	1,37	1,74	2,00
$2,3 \cdot 10^{-5}$	0,395	P_K	4,00	2,96	2,98	3,66	6,09
		P_{Na}	1,58	1,17	1,18	1,45	2,40
$4,6 \cdot 10^{-5}$	0,309	P_K	3,84	2,72	2,78	3,32	4,28
		P_{Na}	1,19	0,84	0,86	1,03	1,32
$9,3 \cdot 10^{-5}$	0,400	P_K	1,48	1,29	1,44	2,02	4,05
		P_{Na}	0,59	0,51	0,58	0,81	1,62
Симазин							
0	0,258	P_K	3,21	2,44	2,48	2,57	3,28
		P_{Na}	0,83	0,63	0,64	0,66	0,85
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,211	P_K	2,67	1,86	1,87	1,70	2,21
		P_{Na}	0,57	0,39	0,39	0,36	0,47
$9,9 \cdot 10^{-5}$	0,858	P_K	1,83	1,86	2,49	4,02	5,27
		P_{Na}	1,57	1,59	2,13	3,45	4,29

На основании сопоставления полученных данных с результатами ранее
проведенного исследования [3] можно заключить, что изменение α , во-пер-
вых, зависит, вероятно, от природы алкиламинных заместителей в *сим*-три-
азиновом кольце гербицидов. Так, атразин отличается от симазина и сходен
с прометрином наличием в молекулярной структуре изопропиламинной
группы. Индуцируемые $8,4 \cdot 10^{-5}$ М прометрином [3] и $9,3 \cdot 10^{-5}$ М атразином
увеличения α за счет уменьшения P_K , а в присутствии $9,9 \cdot 10^{-5}$ М симазина –
за счет увеличения P_{Na} , свидетельствуют о решающей роли изопропила-
минной группы в молекулах прометрина и атразина в модификации струк-
тур, ответственных за проницаемость плазмалеммы к ионам K^+ . Во-вторых,
присутствие в молекуле *сим*-триазина этиламинной группы и атома хлора,
вероятно, может являться причиной модификации *сим*-триазиновыми гер-
бицидами проницаемости плазмалеммы к ионам Na^+ (в случае симазина
это очевидно, а в случае атразина данный эффект прослеживается при
концентрации $2,3 \cdot 10^{-5}$ М в средах I и V). В-третьих, направление изменения
 α зависит и от концентрации данных ксенобиотиков. Это особенно отчетли-
во видно на примере симазина, малые и большие концентрации которого
оказывают противоположное влияние на ион-селективные свойства плаз-
малеммы.

Проведенные эксперименты позволяют также заключить, что первичная
реакция растительного организма на присутствие в окружающей среде
сим-триазинов заключается в изменении ион-селективных свойств внешней
плазматической мембраны. Плазмалемма теряет свои селективные свойст-
ва, становясь менее избирательной к ионам K^+ и Na^+ . Однако, как и в рабо-
те [5], в нашем случае отмечается увеличение коэффициентов P_i с ростом
концентрации ионов K^+ в среде и соответственно с падением потенциала
как в контрольных вариантах, так и при обработке клеток испытанными гер-
бицидами. Установленные экспериментальные зависимости P_i (C_K^n) не мо-
гут быть описаны соотношениями, полученными в рамках теорий Гольдма-
на и абсолютных скоростей реакции [8], предусматривающих уменьшение P_i
с ростом C_K^n . Они могут быть объяснены при рассмотрении свойств отдель-
ных ион-транспортных систем плазмалеммы, в частности калиевых кана-

лов. В наших экспериментах ионная сила поддерживается постоянной ($C_{K^+} + C_{Na^+} = \text{const}$). В этом случае, как показано в работе [9], активационная кривая Д-типа K^+ -каналов не сдвигается вдоль оси напряжения в направлении деполяризации и по мере возрастания концентрации ионов K^+ может происходить активация каналов, что в конечном итоге и приводит к экспериментально зафиксированному увеличению P_K .

В ходе проведенных экспериментов установлен рост проницаемости мембраны к ионам K^+ и Na^+ при действии некоторых концентраций гербицидов. Это может быть обусловлено не только влиянием *сим*-триазинов на функционирование калиевых каналов, но и на состояние липидного бислоя плазмалеммы, выражающегося в модификации проводимости каналов не-селективной ионной утечки.

1. El-Sheekh M. M., Kotkat H. M., Hammouda O. H. E. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1994. Vol. 29. P. 349.

2. Найдун С. Н. Механизмы термоиндуцированной модификации систем пассивного транспорта плазматической мембраны растительной клетки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.00.12. Мн., 2002.

3. Яковец О. Г., Кудряшов А. П., Юрин В. М. // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук*. 2000. № 1. С. 25.

4. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника. Киев, 1960.

5. Юрин В. М., Гончарик М. Н., Галактионов С. Г. Перенос ионов через мембраны растительных клеток. Мн., 1977.

6. Лис Е. М., Яковец О. Г., Кудряшов А. П. // *Экологической науке – творчество молодых: Материалы II Регион. науч.-практ. конф. ведущих специалистов, аспирантов и студентов*. Гомель, 2002. С. 55.

7. Яковец О. Г., Юрин В. М., Кудряшов А. П., Лис Е. М. // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Материалы V съезда Бел. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков*. Мн., 2002. С. 105.

8. Юрин В. М., Соколик А. И., Гончарик М. Н. // *ДАН БССР*. 1973. Т. 17. С. 956.

9. Юрин В. М., Соколик А. И., Кудряшов А. П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Мн., 1991.

Поступила в редакцию 25.03.2003.

Оксана Геннадьевна Яковец – младший научный сотрудник кафедры физиологии и биохимии растений НИЛ физиологии растительной клетки.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений.

Анатолий Петрович Кудряшов – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биохимии растений.

Елена Марьяновна Лис – студентка 5-го курса биологического факультета.

УДК 581.133.1

А.Э. КОРЕНЬКОВ, В.М. ЮРИН

АЦИДОФИЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ РИЗОДЕРМЫ ЯЧМЕНИ В УСЛОВИЯХ ХЛОРИДНО-НАТРИЕВОГО ЗАСОЛЕНИЯ¹

The influence of sodium salting to acidification activity of root's system of seven-days etiolated sprouts barley was investigated. Stress reaction of rhizodermic cells at sodium salting was described. Threshold values of salt concentrations, which cause activation and also partial or full suppression of a proton pump in root cells of barley, were revealed. It is established, that inhibitory influence of NaCl on H^+ -ATPase pump in rhizodermic cells of barley is mainly determined by ions of chlorine.

Процесс засоления почв с каждым годом становится все более значимой и актуальной экологической проблемой. Опустынивание, складирование отходов химических производств, использование солесодержащих смесей в зимнее время, нерациональное внесение удобрений – все это неизбежно приводит к повышению уровня солей натрия в почвенном растворе, нега-

¹ Авторы статьи – сотрудники кафедры физиологии и биохимии растений.