

УДК 581.1

*В.М. ЮРИН, Ж.В. ВЫСОЦКАЯ, А.М. СОКОЛИК, АЛ. КУДРЯШОВ, С.Н. НАЙДУН,
Т.Н. ДИТЧЕНКО, О.Г. ЯКОВЕЦ, Е.Н. КРЫТЫНСКАЯ*

РЕЦЕПЦИЯ ЭКЗОГЕННЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СТИМУЛОВ ТРАНСПОРТНЫМИ СИСТЕМАМИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

It was shown, that receptor interactions with plasma membrane ion-transport systems gives rise their functional rearrangements, depended on factor influenced and electric potential difference of transport system, by which membrane permeability at that time of the factor application is determined.

Развитие научных исследований на кафедре физиологии и биохимии растений в последние годы связано с расшифровкой механизмов перестройки функциональных свойств транспортных систем плазмалеммы под влиянием экзогенных физико-химических стрессоров, воздействие которых способствует переключению обмена веществ клетки и растения в целом на новый режим. Для поддержания процессов жизнедеятельности клетки в нормальных и новых условиях среды необходимы взаимосвязанные системы регуляции, в том числе генетическая, метаболическая и мембранная. Одной из компонент осуществления мембранной регуляции является изменение свойств транспортных систем плазматической мембраны, обеспечивающих неравновесное распределение электролитов и органических веществ по обе стороны мембраны, их поступление, поддержание оптимального внутриклеточного гомеостаза, рецепцию и трансдукцию экзогенных сигналов.

В основе указанных явлений лежит единый первичный рецепторно-конформационный принцип, который в самом общем виде состоит в следующем: взаимодействие белковой молекулы (рецептор) со специфическим эффектором приводит к изменению конфигурации рецептора и последующей передаче сигнала к внутриклеточным мишеням, дающим быстрый физиологический ответ.

Одним из типов рецепторов, встроенных в плазматическую мембрану, являются белковые молекулы, образующие ионные каналы и другие транспортные системы. Экзогенный эффектор, вступая во взаимодействие с транспортными системами плазмалеммы, приводит к модификации их проводимости.

Основными транспортными системами плазмалеммы растительных клеток являются калиевые каналы, H⁺-АТФазная помпа, система транспорта аммония и неселективные ионные каналы.

В зависимости от глубины модифицирующего мембранотропного действия экзогенных факторов изменяется характер и способность клетки и организма в целом адаптироваться к новым условиям.

В этой связи нами была поставлена цель: на основании изучения мембранотропного действия ряда экзогенных факторов (температуры, различных видов пестицидов, одно- и поливалентных металлов) выявить возможные сдвиги транспортно-барьерных свойств плазмалеммы и их влияние на ионный состав среды, а также разработать приемы оценки их первичных эффектов.

Для осуществления поставленных целей были использованы электрофизиологические приемы анализа механизмов воздействия исследуемых стимулов на транспортные системы переноса ионов через плазматическую мембрану растительной клетки, а также радиоизотопные и фотометрические методики.

Объектами исследования явились интернодальные клетки водоросли *Nitella flexilis* и проростки ячменя, выращенные в лабораторных условиях. Препарирование клеток *Nitella* и их подготовка производились общепринятыми методами. Базовым раствором для водорослей служила искусственная прудовая вода (ИПВ) следующего состава (моль/л): 10^{-3} Na⁺, 10^{-4} K⁺, 10^{-4} Ca²⁺ и рН 7,0±0,2. В экспериментах использовался режим фиксации потенциала на плазматической мембране клеток.

В опытах с корнями проростков основой служил раствор Кнопа, содержащий (ммоль/л) 1,7 KH₂PO₄, 1,8 KCl, 3,1 Ca(NO₃)₂, 2,1 MgSO₄, 0,75 FeCl₃. Изучался ход временного накопления ⁹⁰Sr, взятого в качестве химического аналога кальция.

Кратко рассмотрим полученные нами за последние годы закономерности действия указанных стрессоров на транспортно-барьерные свойства плазмалеммы растительной клетки.

В результате анализа кратковременного и длительного воздействия повышенной (+32 °C) и пониженной (+4 °C) температур на клетку *in vivo* установлены механизмы термоиндуцируемой модификации свойств систем пассивного транспорта плазматической мембраны растительной клетки:

- кратковременное повышение температуры ведет к увеличению, тогда как ее снижение - к падению проводимости калиевых каналов. Для наружу и внутрь выпрямляющих калиевых каналов наблюдается большее снижение входящего тока по сравнению с выходящим. Кратковременное снижение температуры индуцировало замедление, а резкое повышение - ускорение процессов активации и дезактивации наружу выпрямляющих калиевых каналов плазматической мембраны;

- длительное воздействие гипотермии не оказывает существенного влияния на свойства калиевых каналов, в то время как в условиях гипертермии происходит значительное падение проводимости наружу и внутрь выпрямляющих калиевых каналов плазмалеммы, степень которой зависела от времени воздействия. Отмечается снижение селективности внутрь выпрямляющих калиевых каналов;

- проводимость неселективных ионных каналов уменьшалась после кратковременного понижения температуры. Длительное воздействие гипертермии в течение 10 сут приводит к росту, а после 17 сут - к восстановлению проводимости до первоначального уровня. Проводимость неселективных

ионных каналов при гипотермии незначительно уменьшается и выходит на стационарный уровень к 10-м суткам экспозиции;

- после 10-суточной экспозиции при повышенных и пониженных температурах заметно уменьшается концентрация калия в цитоплазме с последующим ее восстановлением к 17-м суткам.

Рецепция экзогенных химических соединений, в частности пестицидов, приводит к функциональным перестройкам ион-транспортных систем плазмалеммы, которые выражаются в следующем:

- пороговые концентрации, т. е. концентрации, вызывающие достоверные сдвиги транспортно-барьерных свойств мембраны, составляют для всех испытанных сим-триазиновых гербицидов и триазоловых фунгицидов $K_{Г} \approx 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Пиретроидные инсектициды оказывали действие в более низких концентрациях - 10^{-7} моль/л;

- триазоловые фунгициды, сим-триазиновые гербициды и пиретроидные инсектициды характеризуются различной степенью мембранотропной активности, располагаясь по мере ее убывания в соответствующие ряды: пропиконазол > тебуконазол > ципроконазол; атразин > симазин > прометрин и эсфенвалерат > дельтаметрин > циперметрин;

- установленный рост коэффициента селективности $\alpha = P_{Na}/P_K$ плазмалеммы под действием $8,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л прометрина и $9,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л атразина происходит в результате преимущественного снижения P_K , а при $2,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л атразина и $9,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л симазина обусловлен увеличением P_{Na} . Обработка клеток симазином в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, приводящая к уменьшению коэффициента селективности, проходила главным образом за счет уменьшения P_{Na} . Сим-триазины в форме неионизированных молекул проявляют более выраженное мембранотропное действие. В присутствии тебуконазола, а также ципроконазола в концентрациях, не превышающих 10^{-4} и $3 \cdot 10^{-4}$ М соответственно, снижается проницаемость плазматической мембраны к ионам K^+ , а в случае ципроконазола - и к ионам Na^+ . При экспозициях клеток в растворах, содержащих $3 \cdot 10^{-4}$ – 10^{-3} моль/л Na^+ , пропиконазол индуцирует рост проницаемости плазмалеммы к ионам Na^+ и в меньшей степени к ионам K^+ . Молекулы пропиконазола обладают способностью образовывать более стабильные по сравнению с двумя другими испытанными триазолами комплексы с ионами Na^+ и K^+ и, таким образом, выступают в роли ионофора. Пиретроидные инсектициды эсфенвалерат в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л и дельтаметрин вызывают преимущественное падение P_K и меньшее увеличение P_{Na} , тогда как циперметрин - уменьшение обоих коэффициентов;

- наиболее значительные эффекты подавления функциональной активности калиевых каналов под действием фунгицидов отмечались в присутствии $(1,5 \pm 3,0) \cdot 10^{-4}$ моль/л ципроконазола, $(3,5 \pm 7,0) \cdot 10^{-5}$ моль/л тебуконазола и 10^{-5} – $1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л пропиконазола. Сим-триазины в концентрациях $(8,4 \pm 9,9) \cdot 10^{-5}$ моль/л ингибируют функциональную активность K^+ -каналов, причем наиболее выраженным действием, особенно в отношении внутрь выпрямляющих каналов, обладают атразин и прометрин. Модификация сим-триазинами K^+ -каналов заключается в снижении их селективных свойств, которые проявляются в увеличении относительной проницаемости к одновалентным катионам Na^+ , Li^+ и Cs^+ . Данный эффект, возможно, обусловлен механическим растяжением стенок канала за счет индуцированного сим-триазином изменения гидрофобного взаимодействия с липидным окружением. Все испытанные инсектициды в концентрациях $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л снижают проводимость наружу выпрямляющих калиевых каналов; при действии эсфенвалерата также отмечается небольшое снижение внутри выпрямляющих каналов, тогда как дельтаметрин и циперметрин практически не влияют на их проводимость;

- реакция плазмалеммы растительных клеток на присутствие в окружающей среде гербицидов и фунгицидов также обусловлена ростом проводимости каналов неселективной ионной утечки;

- триазолы вызывают подавление функциональной активности светостимулируемой электрогенной H^+ -АТФазной помпы плазмалеммы. Ввиду выраженных липофильных свойств молекул испытанных фунгицидов и гербицидов обнаруженное ингибирование, вероятно, осуществляется через изменение липидного микроокружения помпы. Сим-триазины в зависимости от концентрации и времени экспозиции оказывают разнонаправленное воздействие на функционирование фотоиндуцируемой H^+ -АТФазной помпы и системы транспорта ионов NH_4^+ . Наблюдаемые изменения активности H^+ -помпы связаны со взаимодействием гербицидов с активным центром АТФазы на наружной стороне мембраны и величиной электрического потенциала; ингибирование системы транспорта аммония, наоборот, происходит с цитоплазматической стороны плазмалеммы;

- среди гербицидов наиболее выраженным действием на транспортные системы плазмалеммы растительной клетки обладают хлорсодержащие сим-триазины (атразин, симазин) по сравнению с тиометилсодержащими (прометрин), а среди фунгицидов - дихлорсодержащее соединение (пропиконазол). Изменение различных ион-транспортных свойств плазматической мембраны под действием фунгицидов обусловлены наличием и структурой липофильных заместителей в положении N-1 триазольного кольца, а активность испытанных сим-триазинов связана с наличием в их молекуле алкильных радикалов, причем изопропильные группы обладают большим мембранотропным эффектом по сравнению с этильными.

Из результатов, полученных в радиоизотопных экспериментах, отметим следующие:

- накопление стронция в цитоплазме завершается после 5-6 ч выдерживания клеток *Nitella* и корней проростков в радиоактивном растворе;

- в контрольных условиях рост равновесного как калиевого потенциала (переход от полной среды Кнопа к среде Кнопа без калия), так и двухвалентных катионов (переход от раствора Кнопа к среде Кнопа без кальция и магния) повышает накопление катионов;

- ингибиторный анализ (верапамил и нифедипин) показал, что блокирование Ca -каналов, т. е. переход проницаемости плазматической мембраны к неселективным каналам, вызывает значительное снижение стационарного уровня накопления стронция. При блокировании неселективных каналов накопление стронция либо остается прежним (клетки корней проростков), либо возрастает (клетки *Nitella*).

Таким образом, установлено, что изменение проницаемости мембраны, обусловленное функционированием того или иного механизма транспорта, влияет на накопление ионов в клетке.

Полученные результаты, с одной стороны, указывают на высокую разрешающую способность используемых подходов для оценки рецепторных эффектов, приводящих к сдвигам барьерно-транспортных свойств плазматической мембраны под действием экзогенных стимулов, а с другой - подчеркивают определенную общность механизмов поступления ионов в клетки харовой водоросли *Nitella* и корневой системы ячменя.

Поступила в редакцию 27.06.06.

Владимир Михайлович Юрин - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений. Область научных интересов: регуляция функционирования транспортных систем плазматической мембраны растительных клеток, ксенофизиология, электрофизиология растений, скрининг химических соединений и экологический мониторинг среды, физиология иммобилизованных клеток и тканей растений. Автор более 400 научных работ, в том числе 2 учебных пособий (в соавторстве) и 3 учебно-методических комплексов.

Жанна Валерьевна Высоцкая - младший научный сотрудник НИЛ физиологии растительной клетки кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов: механизмы ионного транспорта в растениях. Автор 23 научных работ.

Анатолий Иосифович Соколик - кандидат биологических наук, заведующий НИЛ физиологии растительной клетки кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов: механизмы ионного транспорта в растениях, радиоэкология, ксенобиология. Автор 197 научных работ.

Анатолий Петрович Кудряшов - кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов: механизмы функционирования мембранных систем транспорта азота в растительной клетке, ксенофитофизиология, разработка методов биологического тестирования. Автор около 200 научных работ, в том числе курса лекций, а также 2 учебно-методических комплексов (один в соавторстве).

Светлана Николаевна Найдун - кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов: биохимия вторичных метаболитов растений, электрофизиология растительной клетки. Автор более 45 научных работ, в том числе учебно-методического комплекса (в соавторстве).

Татьяна Ивановна Дитченко - кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов: электрофизиология растительной клетки, функционирование ион-транспортных систем плазматической мембраны растительной клетки, культура растительных клеток и тканей. Автор 48 научных работ.

Оксана Геннадьевна Яковец - кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов: рецепция экзогенных факторов ион-транспортными системами плазматической мембраны растительной клетки. Автор 35 научных работ.

Елена Николаевна Крытынская - младший научный сотрудник НИЛ физиологии растительной клетки кафедры физиологии и биохимии растений. Область научных интересов: электро-физиология растительной клетки, ион-транспортные системы плазматической мембраны. Автор более 20 научных работ.