

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН КЛЕТОК КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ МОДИФИКАЦИИ ИОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПЛАЗМАЛЕММЫ КАНАЛОФОРМЕРОМ НИСТАТИНОМ

© Л. Х. Гордон,¹ Ю. Н. Валитова, Т. И. Огородникова, Д. Ф. Рахматуллина,
А. Ю. Алябьев, Н. Л. Лосева, А. Н. Ценцевицкий, Н. Ф. Рубан

Институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, Казань;

¹ электронный адрес: gordon@mail.knc.ru

Исследовали изменения потребления кислорода, теплопродукции, транспорта калия и протонов в отсеченных корнях 5-суточных проростков пшеницы при краткосрочной и длительной инкубации корней с полиеновым антибиотиком-каналоформером нистатином. Обработка отсеченных корней нистатином приводила к активации энергетического обмена клеток, выражающейся в увеличении скорости дыхания и теплопродукции корневых клеток. Кроме того, регистрировали защелачивание инкубационной среды, небольшую деполяризацию плазмалеммы и значительный выход K^+ из клеток. Стимуляцию дыхания, вызванную нистатином, предотвращали добавлением в среду инкубации ингибитора сукцинатдегидрогеназы малоната, акцептора электронов дихлорфенолиндофенола, а также блокатора H^+ -АТФаз нитрата серебра. Полученные данные дают основание полагать, что стимуляция дыхания нистатином обусловлена активацией переноса электронов по электрон-транспортной цепи митохондрий и сопряжена с активной работой H^+ -АТФазы плазмалеммы. Кроме того, индуцированная нистатином стимуляция дыхания ингибировалась церулеином, блокатором синтеза жирных кислот и стероидов. Косвенно это может свидетельствовать об усилении в клетках синтеза стероидов и фосфолипидов, направленного на восстановление поврежденной нистатином плазмалеммы. Предполагается следующая цепь событий в клетке в ответ на действие нистатина: формирование нистатиновых каналов—вход протонов в клетки—деполяризация плазмалеммы—выход из клеток ионов K^+ , приводящий к нарушению ионного гомеостаза,—активация работы H^+ -АТФазы, осуществляющей выброс протонов из клетки,—возрастание «запросов» энергии для функционирования H^+ -АТФазы—увеличение интенсивности потребления кислорода и теплопродукции. Повышенная энергопродукция корней под действием нистатина, возможно, обеспечивает не только работу H^+ -АТФазы, но и процесс синтеза стероидов и фосфолипидов, необходимых для «залечивания» поврежденных нистатином мембран.

Ключевые слова: корни пшеницы, энергетический обмен, потребление кислорода, теплопродукция, ингибиторный анализ, ионы калия, протоны.

Известно, что полиеновые антибиотики, в частности нистатин, увеличивают проницаемость природных и модельных мембран, содержащих стерин (Ермишкин и др., 1982; Лебедев и др., 1989). Еще в 1968 г. отмечали, что нистатин вызывает истечение из клеток различных по размерам молекул (Васильев, Маленков, 1968). При малых дозах из клеток выходит калий, но поверхность остается непроницаемой для более крупных ионов, например фосфата, сахаров и т. д. Был показан выход из клеток, чувствительных к полиенам, катионов, неорганического фосфата и нуклеотидов (Лебедев и др., 1989).

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о резком увеличении проницаемости плазмалеммы корневых клеток для воды, ионов калия на фоне нистатина, амфотерицина В при краткосрочном (1 ч) воздействии, (Гордон, 1983). При этом оставались совершенно невыясненными аспекты длительного действия полиенов на клетки. Можно было полагать, что длительное действие нистатина на корневые клетки вызовет определенную ответную реакцию, например, энергетического

обмена. До недавнего времени проблема изменения энергетического обмена под влиянием полиенов оставалась малоизученной. Известно, что нистатин оказывал влияние на ряд метаболических процессов, в том числе на эндогенный гликолиз и дыхание, синтез фосфолипидов и т. д. (Касумов, 1979). Было показано, что в основе действия полиенов лежит изменение проницаемости цитоплазматических мембран клеток для ионов, а не непосредственное действие их, например, на дыхание (Касумов, 1979). По-видимому, в условиях действия полиенов происходит выход из клеток ионов калия, что является одной из причин сдвига ионного гомеостаза и, разумеется, активации систем активного транспорта этого катиона. Кроме того, отмечается, что нистатин увеличивает протонную проницаемость плазматической мембраны и производит диссипацию протонного градиента (Eilam et al., 1982). Полиеновый антибиотик этрускомицин индуцирует рост протонной проницаемости бислоевых липосомальных мембран (Лебедев и др., 1989). Таким образом, на фоне нистатина происходит диссипация двух

Т а б л и ц а 1

Изменение содержания ионов калия в инкубационной среде под действием 0.02 мМ нистатина

Вариант опыта	Содержание ионов калия, мкэкв на 1 г сырой массы, $\bar{x} \pm s_x$					
	15 мин	30 мин	45 мин	1 ч	2 ч	3 ч
Контроль	3.68 ± 0.13	2.74 ± 0.12	2.45 ± 0.32	0.56 ± 0.08	0.45 ± 0.06	0.43 ± 0.07
Нистатин	8.82 ± 0.10	7.84 ± 0.15	8.14 ± 0.12	7.65 ± 0.08	8.78 ± 0.10	8.56 ± 0.12

составляющих ионного гомеостаза — калиевого и протонного градиентов. Эти сдвиги ионного гомеостаза могут быть сигналом к увеличению энергетических затрат для восстановления калиевого и протонного градиентов. Энергия будет затрачиваться на работу, например, протонной АТФазы, характерной для растительных клеток (Опритов и др., 1991). Следует отметить, что максимальная интенсивность работы H^+ -АТФазы, как и Na^+, K^+ -АТФазы, не может быть проявлена при сохранении целостности мембраны. «Расшатать» мембрану можно с помощью детергентов типа Тритона X-100 (Казеннов и др., 1986) или перфорацией сапонином (Погудин и др., 1988; Петруняка и др., 1989). Однако эти агенты вызывают деградацию мембраны, поэтому более перспективным является использование различных каналформеров (Борисов и др., 1991). В качестве каналформеров используют полиеновые антибиотики нистатин и амфотерицин В (Борисов и др., 1991, 1994).

Цель работы заключалась в исследовании изменений потребления кислорода, теплопродукции, транспорта калия и протонов при краткосрочной и длительной инкубации корней с нистатином.

Материал и методика

Объектом исследований служили 5-суточные проростки яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Люба. Замоченные в водопроводной воде семена высевали на стекло, покрытое смоченной марлей, и проращивали в течение 1 сут в темноте при 25 °С. В экспериментах проростки выращивали на растворе $CaCl_2$ (0.25 мМ) в течение 5 сут в осветительной установке, где поддерживали режим освещенности 100 Вт/м² при 12-часовом фотопериоде.

Для получения контрольного раствора $CaCl_2$ 100 мкл DMSO (диметилсульфоксида) разводили в 100 мл раствора 0.25 мМ $CaCl_2$. Концентрация DMSO составляла 0.013 М. Раствор нистатина (1.864 мг в 100 мкл DMSO) добавляли к 100 мл раствора $CaCl_2$. Концентрация полученного раствора нистатина составляла 0.02 мМ.

Использованы следующие реактивы: нистатин, блокатор H^+ -АТФаз 0.01 мМ нитрат серебра, ингибитор сукцинатдегидрогеназы 0.025 М малонат (Serva), акцептор электронов 1 мМ дихлорфенилиндифенол, блокатор синтеза жирных кислот 0.2 мМ церуленин, 20 мМ карнозин, 0.1%-ный Тритон X-100 и 0.043 мМ циклогексимид (Sigma, США).

Определение интенсивности дыхания корней. Дыхательный газообмен регистрировали манометрическим методом в аппарате Варбурга (Семихатова, Чулановская, 1965) в трех повторностях. Навеску отсеченных корней (150 мг) помещали в сосудики Варбурга

с соответствующими растворами (3 мл) и после 10—15-минутного термостатирования измеряли дыхание в течение 6 ч. Показания снимали каждые 60 мин. Расчеты проводили в мкл O_2 за 1 ч на 1 г сырой массы.

Темновая микрокалориметрия. Продукцию тепла корневыми клетками регистрировали дифференциальным темновым микрокалориметром LKB-2277 Bio Activity Monitor (Швеция). Для определения тепловыделения навеска корней составляла 180 мг (при объеме калориметрической ампулы 3 см³). Предварительно записывали нулевую линию влажной камеры, после чего в калориметрическую ячейку помещали отсеченные корни. Ампулу держали 20 мин в положении термостатирования, после чего опускали в измерительное положение калориметра. Рабочий диапазон чувствительности усилителя 100 мкВ. Температура в калориметре была 30 °С. Опыт проводили в течение 2—6 ч.

О проницаемости корневых клеток для K^+ судили по содержанию его в инкубационном растворе в сосудах после 6-часовой инкубации. Измерения проводили на плазменном фотометре ПФМ. Количество поглощенного и вышедшего калия выражали в мкэкв на 1 г сырой массы корней.

Измерение pH среды проводили на pH-метре ОР-211/1 (Radelkis, ВНР).

Результаты

В табл. 1 представлены данные о влиянии нистатина на потерю калия клетками пшеницы. Потеря калия клетками наблюдалась уже через 15 мин инкубации корней в растворе нистатина. Выход ионов калия возрастал в 2.5 раза по сравнению с контролем. Обращает на себя внимание факт отсутствия нарастания потери калия со временем. Количество вышедшего из клеток калия сохранялось на одном уровне и составляло примерно 8.0 мкэкв K^+ на 1 г сырой массы корней. В контрольном варианте первоначальная потеря калия постепенно заменялась на его поглощение, и через 5 ч инкубации корней весь вышедший из клеток калий поглощался

Т а б л и ц а 2

Изменение мембранного потенциала клеток корней пшеницы под действием 0.02 мМ нистатина

Вариант опыта	Мембранный потенциал, мВ, $\bar{x} \pm s_x$	
	2 ч	5 ч
Контроль	73.0 ± 1.0	79.0 ± 1.0
Нистатин	66.0 ± 1.0	71.0 ± 0.9

Таблица 3

Изменение рН среды инкубации корней под действием 0.02 мМ нистатина

Вариант опыта	Уровень рН среды инкубации, $\bar{x} \pm s_x$				
	15 мин	30 мин	45 мин	2 ч	3 ч
Контроль	5.84 ± 0.03	5.91 ± 0.15	5.88 ± 0.05	5.82 ± 0.26	6.16 ± 0.35
Нистатин	6.14 ± 0.03	6.30 ± 0.04	6.27 ± 0.09	6.36 ± 0.34	6.38 ± 0.22

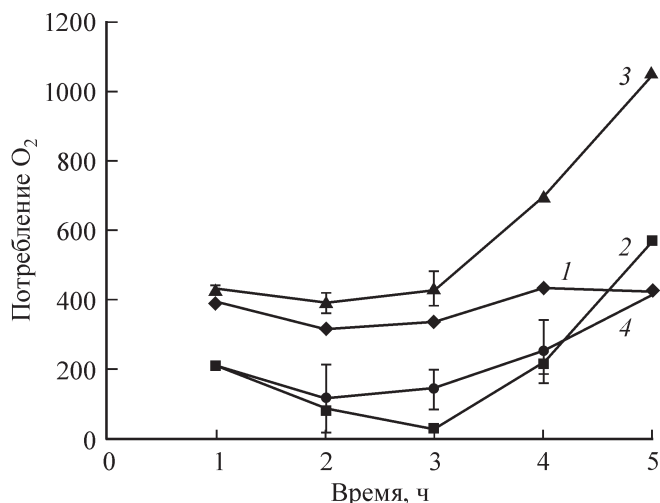


Рис. 1. Влияние 0.02 мМ нистатина на потребление кислорода корнями пшеницы в присутствии ингибитора сукцинатдегидрогеназы малоната или акцептора электронов дихлорфенилиндофенола (ДХФД).

1 — контроль, 2 — нистатин совместно с 1 мМ ДХФД, 3 — нистатин, 4 — нистатин совместно с 0.025 М малоната. Здесь и на рис. 2, 3, 5—7 потребление O_2 выражено в мкл за 1 ч на 1 г сырой массы. Вертикальные отрезки — стандартное отклонение от среднего значения.

Fig. 1. The changes of wheat root oxygen consumption after treatment by 0.02 mM nystatin and inhibitor of succinate dehydrogenase 0.025 M malonate and acceptor of electrons 1 mM dichlorphenolindophenol.

1 — control, 2 — nystatin + 1 mM dichlorphenolindophenol, 3 — nystatin, 4 — nystatin + 0.025 M malonate.

обратно. Кроме того, в присутствии нистатина происходила деполяризация плазмалеммы на 7—8 мВ (табл. 2). Деполяризация сохранялась в течение 5-часовой инкубации корней с нистатином.

На фоне нистатина среда инкубации корней становилась более щелочной (табл. 3). Увеличение рН инкубационного раствора начиналось уже через 15 мин после действия нистатина и сохранялось в течение 3 ч.

Опыты показали, что при действии нистатина на корневые клетки резко возрастало потребление кислорода (рис. 1). При этом практически не изменялся дыхательный коэффициент (ДК; отношение CO_2/O_2). ДК был близок к единице, что может свидетельствовать об использовании глюкозы в качестве субстрата дыхания.

Стимуляция потребления кислорода корнями в присутствии нистатина в значительной мере предотвращалась ингибитором сукцинатдегидрогеназы малонатом и акцептором электронов с флавиновых ферментов ДХФИФ (рис. 1).

Кроме того, стимулирующее влияние нистатина на дыхание корней снималось ингибитором H^+ -АТФаз ионами серебра (рис. 2). В присутствии карнозина, стабилизирующего уровень рН, происходило частичное предотвращение стимуляции дыхания, вызванной нистатином (рис. 3).

Результаты проведенных исследований показали, что при действии на клетки корней нистатина имеет место увеличение «выброса» тепла (рис. 4). При этом наблюдается положительная корреляция между увеличением теплопродукции и стимуляцией потребления кислорода.

Увеличение интенсивности дыхания корневых клеток нистатином совершенно нечувствительно к ингибитору синтеза белка циклогексимиду (рис. 5). Уровень потребления кислорода корнями остается таким же, как и на фоне нистатина.

В связи с возможной ролью вклада липидного компонента мембран в ответной реакции клеток на действие нистатина нами были проведены опыты по ингибированию синтеза жирных кислот и стероидов церуленином. Результаты показали, что церуленин в значительной мере предотвращал стимуляцию потребления кислорода, вызванную нистатином (рис. 6).

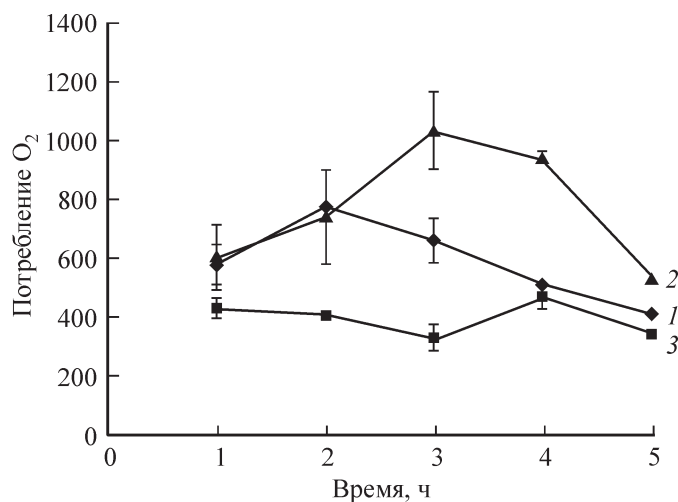


Рис. 2. Влияние 0.02 мМ нистатина на потребление кислорода корнями пшеницы в присутствии блокатора H^+ -АТФаз 0.01 мМ нитрата серебра.

1 — контроль, 2 — нистатин, 3 — нистатин совместно с 0.01 мМ нитрата серебра.

Fig. 2. The changes of wheat root oxygen consumption after treatment by 0.02 mM nystatin and under addition of blockator of H^+ -ATPase 0.01 mM $AgNO_3$ to incubation medium.

1 — control, 2 — nystatin, 3 — nystatin + 0.01 mM $AgNO_3$.

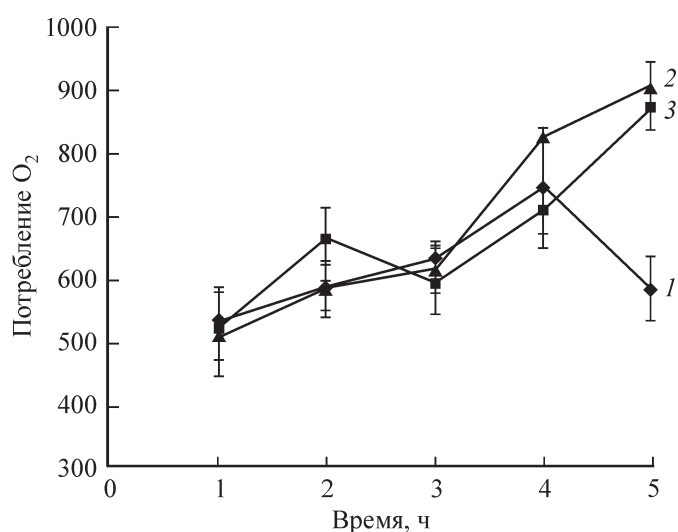


Рис. 3. Влияние 0.02 мМ нистатина на потребление кислорода корнями пшеницы в присутствии рН-стабилизирующего буферного раствора 20 мМ карнозина.

1 — контроль, 2 — нистатин, 3 — нистатин совместно с 20 мМ карнозина.

Fig. 3. The changes of wheat root oxygen consumption after treatment by 0.02 mM nystatin and addition of pH stabilized buffer 20 mM carnosine.

1 — control, 2 — nystatin, 3 — nystatin + 20 mM carnosine.

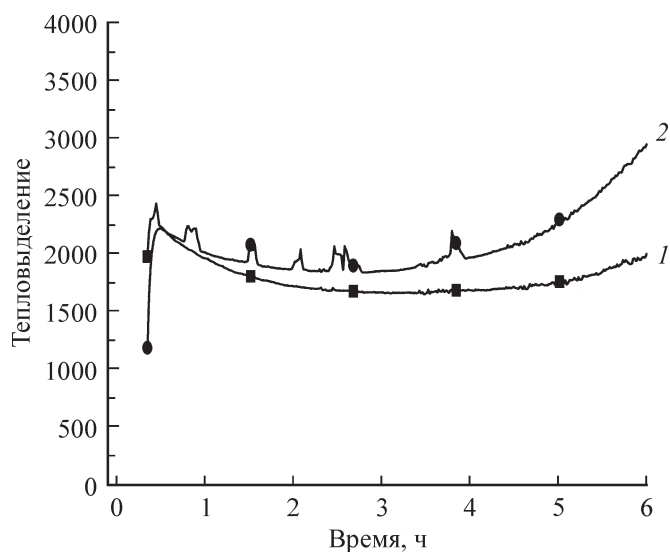


Рис. 4. Влияние 0.02 мМ нистатина на теплопродукцию корней пшеницы.

1 — контроль, 2 — нистатин. Теплопродукция выражена в Вт на 1 г сырой массы.

Fig. 4. The influence of 0.02 mM nystatin on heat production by root cells.

1 — control, 2 — nystatin.

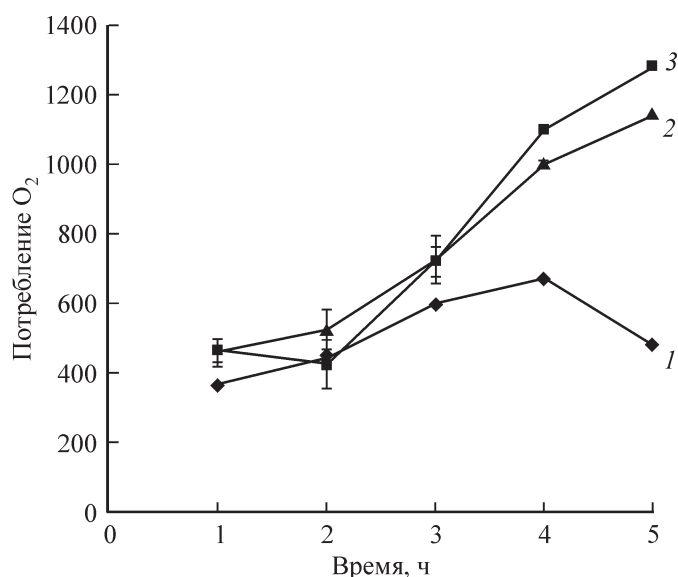


Рис. 5. Влияние 0.02 мМ нистатина на потребление кислорода корнями пшеницы в присутствии ингибитора синтеза белка 0.043 мМ циклогексимида.

1 — контроль, 2 — нистатин, 3 — нистатин совместно с 0.043 мМ циклогексимида.

Fig. 5. The changes of wheat root oxygen consumption after treatment by 0.02 mM nystatin and addition of inhibitor of protein synthesis 0.043 mM cycloheximide.

1 — control, 2 — nystatin, 3 — nystatin + 0.043 mM cycloheximide.

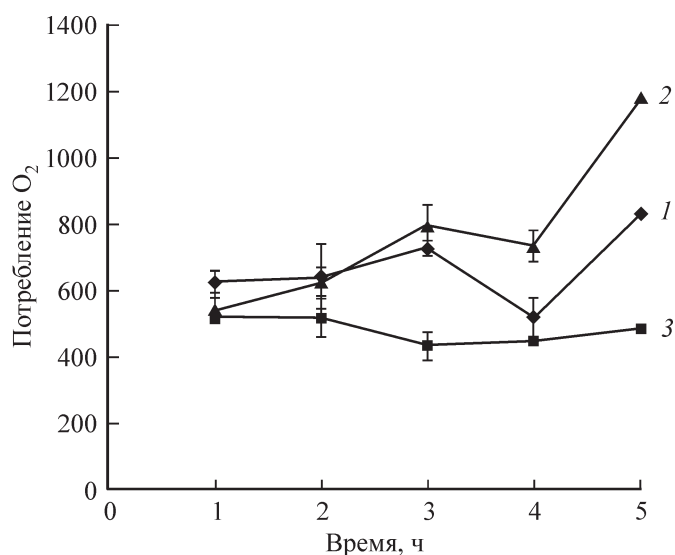


Рис. 6. Влияние 0.02 мМ нистатина на потребление кислорода корнями пшеницы в присутствии блокатора синтеза жирных кислот 0.2 мМ церулена.

1 — контроль, 2 — нистатин, 3 — нистатин совместно с 0.2 мМ церулена.

Fig. 6. The changes of wheat root oxygen consumption after treatment by 0.02 mM nystatin and addition of inhibitor of sterol and fatty acids synthesis 0.2 mM ceruleum to incubation medium.

1 — control, 2 — nystatin, 3 — nystatin + 0.2 mM ceruleum.

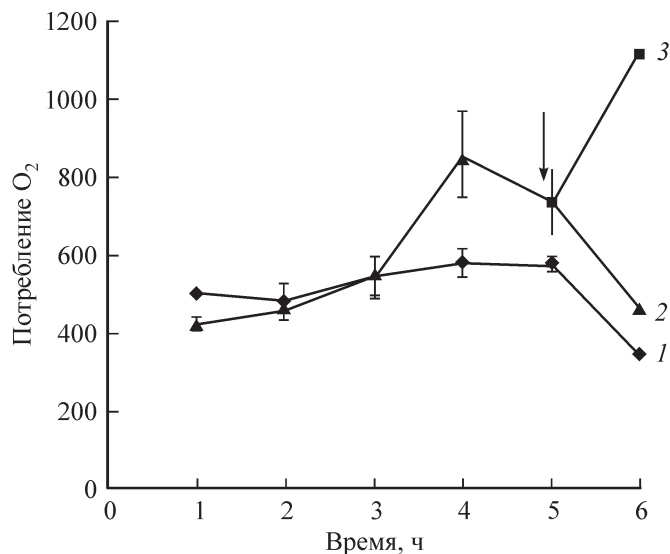


Рис. 7. Изменение потребления кислорода корнями пшеницы под влиянием нистатина с добавлением в среду детергента Тритона X-100 (0.1 %) на 5-м ч инкубации.

1 — контроль, 2 — нистатин, 3 — нистатин совместно с Тритоном X-100 (0.1 %).

Fig. 7. The changes of wheat root oxygen consumption after treatment by 0.02 mM nystatin and detergent Triton X-100.

1 — control, 2 — nystatin, 3 — nystatin + Triton X-100 (0.1 %).

Были также получены данные о том, что дополнительное рассеяние ионных градиентов добавлением в среду инкубации корней (через 5 ч) Тритона X-100 резко усиливало потерю клетками ионов калия на фоне нистатина. При этом наблюдался дополнительный всплеск потребления кислорода (рис. 7).

Обсуждение

Ранее отмечалось, что формирование нистатином ионных каналов обусловлено связыванием стерина мембран, снижение содержания стерина, в частности холестерина, в мембране вызывает 2-кратное уменьшение содержания калия в клетках и увеличение пассивной проницаемости (Le Grimellec et al., 1978). Снижение содержания холестерина увеличивает также уровень pH среды с 5.2 до 6.5, происходит уменьшение закисления среды. Последнее свидетельствует, по мнению авторов, об увеличении протонной проницаемости, которая определяет величину мембранного потенциала. Наблюдаемый нами выход ионов калия, подщелачивание среды инкубации и деполяризация вполне согласуются с предположением о том, что и в клетках растений нистатин, связываясь со стеринами, формирует каналы, по которым внутрь клеток транспортируются протоны, деполяризующие плазмалемму. В свою очередь деполяризация плазмалеммы является одним из индукторов возрастания потери клетками ионов калия.

В одной из работ (Болдырев, 1992) отмечается, что большое различие концентраций ионов внутри и вне клетки воспринимается клеткой как маркер целостности, а следовательно, системы активного транспорта ионов должны включаться в работу при изменении концентрации по обе стороны мембраны. В данном случае можно

ожидать увеличения нагрузки на энергетический аппарат клеток, в частности митохондриальный. Для подтверждения правильности высказанного предположения был проведен ингибиторный анализ. Предотвращение стимуляции потребления кислорода корнями в присутствии нистатина ингибитором сукцинатдегидрогеназы малонатом дает основание полагать, что стимуляция дыхания нистатином обусловлена активацией переноса электронов по электрон-транспортной цепи митохондрий. Известно, что ДХФИФ является акцептором электронов с флавиновых ферментов и может прерывать поток электронов через дыхательную цепь (Арчаков, 1975). В наших экспериментах ДХФИФ (как и малонат) предотвращал стимуляцию дыхания корней, вызванную нистатином. Это еще раз подтверждает включение митохондриального окисления в активацию потребления кислорода нистатином. Уже отмечалось, что действие полиеновых антибиотиков обусловлено не прямым влиянием на гликолиз и дыхание, а является косвенным (изменяется проницаемость плазматических мембран) (Касумов, 1979). Одной из ответных реакций клетки на увеличение проницаемости плазматической мембраны является активация ее транспортных АТФаз (Казеннов и др., 1986; Борисов и др., 1991). При повышении проницаемости плазмалеммы растительных клеток в результате усиления перекисного окисления липидов обнаружена активация протонной помпы (H^+ -АТФазы) (Веселов и др., 2002). Активация этой АТФазы способствует поддержанию мембранного потенциала и выходу из клеток избытка протонов, поступающих по градиенту концентрации. Таким образом, активация транспортных систем плазмалеммы может быть механизмом, переводящим энергетический аппарат клетки на более напряженный режим работы, результатом чего является увеличение интенсивности потребления кислорода. Последнее и наблюдается в наших опытах — нистатин стимулирует интенсивность дыхания. Одним из подтверждений усиления активности H^+ -АТФазы плазмалеммы может быть чувствительность потребления кислорода к специфическому ингибитору протонной помпы ионам серебра. Подавление активности H^+ -АТФазы ионами серебра было продемонстрировано ранее (Лялин, 1981). При ингибировании H^+ -АТФазы плазмалеммы ионами серебра снижается потребность в АТФ, что в результате сказывается на интенсивности дыхания корней. По-видимому, снижения энергетических затрат на выброс протонов можно достичь на только ингибированием H^+ -АТФазы, но и связыванием протонов с помощью специфических рН-стабилизирующих буферов. Таким рН-стабилизирующим буфером является карнозин (Скулачев, 1992; Болдырев, 1999). Ранее нами было показано, что карнозин предотвращает усиление потребления кислорода при действии протонофоров и ингибиторов митохондриального дыхания (Рахматуллина, 2004). В наших экспериментах карнозин лишь частично снижал усиленное нистатином потребление кислорода. По-видимому, поток протонов при формировании нистатиновых каналов в плазмалемме корневых клеток весьма значителен, и буферной емкости карнозина «не хватает». Кроме того, следует учитывать, что энергетические затраты корневых клеток в условиях действия нистатина направлены на другие процессы, например на инактивацию нистатиновых каналов (см. ниже). Необходимо отметить, что работа АТФазных систем сопровождается большими энергетическими затратами, приводя к усилению теплопродукции (Рахматул-

лина, 2002). Ранее нами было показано, что при ингибировании H^+ -АТФаз корневых клеток их теплопродукция снижается (Гордон и др., 1995).

В наших экспериментах теплопродукция клеток корней при действии нистатина возрастала. Наблюдаемая положительная корреляция между увеличением теплопродукции и стимуляции потребления кислорода позволяет предположить, что одним из фрагментов ответной реакции корневых клеток на усиление ионной проницаемости плазмалеммы нистатином является активация работы ионтранспортирующих систем, в частности H^+ -АТФазы плазмалеммы, с нарастанием энергетических затрат и последующим усилением митохондриального дыхания и теплопродукции.

В настоящее время имеются сведения о том, что если АТФазные системы усиливают свою активность, энергия, получаемая при гидролизе АТФ, может быть использована не только на активный транспорт ионов (Борисов и др., 1991, 1994). При длительном действии нистатина на клетки происходит инактивация нистатиновых каналов. Можно предположить, что к этому процессу подключаются белоксинтезирующие системы. В случае усиления синтеза белка и возрастания затрат энергии на этот синтез потребление кислорода на фоне нистатина должно быть чувствительным к ингибитору синтеза белка. В наших опытах это предположение не подтвердилось, циклогексимид не изменял уровня потребления кислорода на фоне нистатина. По-видимому, при действии на клетки полиеновых антибиотиков синтез белков тормозится. Торможение синтеза белков может быть обусловлено не изменением структуры мембран, а потерей клетками калия (Лишневецкая и др., 1976). По-видимому, и в наших опытах нистатин, вызывая потерю клетками ионов калия, приводит к ингибированию синтеза белка. Именно поэтому и не было чувствительности дыхания корневых клеток к циклогексимиду.

Известно, что ранней реакцией на изменение проницаемости мембран является активация синтеза фосфолипидов. Возможно, что происходит синтез не всех фосфолипидов, а лишь определенных фракций. В таких случаях вновь синтезированные фосфолипиды, возможно, используются не для постройки новых мембран, а для «починки» мембран, состояние которых нарушено внешними факторами, в том числе для «починки» самой поверхности (Васильев, Маленков, 1968). Нами были получены данные о том, что при повышении протонной проводимости плазмалеммы растительных клеток нигерицином происходит увеличение содержания насыщенных жирных кислот (Рахматуллина, 2002). Имеются данные об активации в клетках печени синтеза холестерина при механических повреждениях (De Matteis, 1969; Kandutsch, Sancier., 1969; Коломийцева, 1989). Следует подчеркнуть, что любая поврежденная клетка перед восстановлением мембран активизирует собственный синтез холестерина (Коломийцева, 1989). В растительных клетках повышение протонной проводимости плазмалеммы приводит не только к увеличению содержания насыщенных жирных кислот, но и к возрастанию содержания стероидов (Лыгин и др., 1995; Рахматуллина, 2002).

Косвенным подтверждением того, что энергетические затраты клеток при нарушении ионной проводимости плазмалеммы нистатином направлены на синтез жирных кислот и стероидов, являются данные, полученные нами при использовании церуленина, блокатора синтеза жирных кислот и стероидов (Игнатов, 1982), ко-

торый устранял стимуляцию потребления кислорода на фоне нистатина. Возможно, что синтез липидов в ответ на увеличение ионной проницаемости направлен на «починку» мембраны и, в частности, на включение в ее состав новых молекул стероидов вместо связанных нистатином.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что нарушение ионной проводимости плазмалеммы нистатином способствует усилению энергетических затрат и на активацию протонной АТФазы, и на синтез липидных компонентов мембраны. Оба этих процесса направлены на «ликвидацию» нарушений ионного гомеостаза клеток. Уже отмечалось, что на фоне нистатина уровень вышедших из клеток ионов калия сохранялся в течение 5-часового периода времени за счет работы активных механизмов его обратного поглощения и, возможно, частичной инактивации нистатиновых каналов. Дополнительное увеличение потребления кислорода и проницаемости плазмалеммы для ионов Тритонам Х-100 через 5 ч инкубации в присутствии нистатина позволяет выявить «резервные» энергетические возможности клеток, направленные на устранение нарушенных ионных градиентов.

Таким образом, показано, что формирование в плазмалемме корневых клеток нистатиновых каналов приводит к активации энергетического обмена. Предполагаемая цепь событий, лежащих в основе ответной реакции клеток на действие нистатина, может быть представлена следующим образом: формирование нистатиновых каналов → увеличение протонной проницаемости плазмалеммы (вход протонов в клетки) → деполяризация плазмалеммы → выход из клеток ионов калия по градиенту концентрации и в результате деполяризации мембраны → нарушение ионного гомеостаза, которое является сигналом для включения активного транспорта ионов через плазмалемму (активный выброс из клеток протонов и поглощение вышедшего из клеток калия), за счет работы H^+ -АТФазы → возрастание «запросов» энергии для функционирования этой АТФазы → увеличение интенсивности потребления кислорода и теплопродукции. Повышенная энергопродукция корней под действием нистатина, возможно, обеспечивает не только работу H^+ -АТФазы, но и процесс синтеза стероидов и фосфолипидов, необходимых для заживления поврежденных мембран.

Список литературы

- Арчаков А. И. 1975. Микросомальное окисление. М.: Наука. 327 с.
- Болдырев А. А. 1992. Ионные градиенты в жизни клеток. Природа. 7 : 78—83.
- Болдырев А. А. 1999. Карнозин и защита тканей от окислительного стресса. М.: Диалог-МГУ. 364 с.
- Борисов Ю. А., Соболева О. Ю., Суглобова Е. Д., Федорович Е. Е. 1994. Транспорт ионов Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов человека при формировании в ней нистатиновых каналов в условиях *in vitro*: некоторые особенности и анализ процессов. Цитология. 36 (5) : 427—436.
- Борисов Ю. А., Соболева О. Ю., Суглобова Е. Д., Щербак А. И. 1991. Ионметрическое изучение потоков Na и K через мембрану эритроцитов человека, модифицированную нистатином. Цитология. 33 (1) : 24—32.
- Васильев Ю. М., Маленков А. Г. 1968. Клеточная поверхность и реакции клеток. Л.: Медицина. 291 с.
- Веселов А. П., Курганова Л. Н., Лихачева А. В., Сушкова У. А. 2002. Возможное регуляторное влияние перекисного окисления липидов на активность H^+ -АТФазы плазмалеммы в условиях стресса. Физиол. раст. 49 (3) : 385—389.

Гордон Л. Х. 1983. Водный обмен, его связь с дыханием и проницаемостью растительных клеток для воды: Дис. ... д-ра биол. наук. Казань. 339 с.

Гордон Л. Х., Минибаева Ф. В., Рахматуллина Д. Ф., Алябьев А. Ю., Лосева Н. Л., Николаев Б. А. 1995. Термогенез корневых клеток пшеницы при модификации функциональной активности плазмалеммы и детоксикации ксенобиотиков. Докл. РАН. 341 (5): 714—716.

Ермишкин Л. Н., Зильберштейн А. Я. 1982. Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. В кн.: Итоги науки и техники. Биофизика мембран. М. 2: 82—160.

Игнатов С. Г., Андреева О. В., Евдокимова О. А., Арцибанов В. Ю., Перельгин В. В., Котрельянц А. С., Островский Д. Н. 1982. Изучение репарации повреждений мембранного аппарата, вызванных низкотемпературным замораживанием клеток *E. coli*. Биохимия. 47 (10): 1621—1628.

Казеннов А. М., Маслова М. Н., Шалабодов А. Д. 1986. Механизм активирующего действия детергентов и хелаторов на Na, K-АТФазу теньей безъядерных эритроцитов. Биохимия. 51 (2): 224—229.

Касумов Х. М. 1979. Принципы функционирования полиеновых антибиотиков в липидных мембранах — взаимосвязь структуры и функции: Автореф. докт. дис. Пушкино. 37 с.

Коломийцева И. К. 1989. Радиационная биохимия мембранных липидов. М.: Наука. 181 с.

Лебедев А. В., Левицкий Д. О. 1989. Антибиотики в липидном бислое: переносчики и каналоформеры. В кн.: Итоги науки и техники. Сер. «Биофизика». М. 28: 153 с.

Линевская Е. Б., Белоусова И. И., Родыгина Т. Н., Терещин И. М. 1976. Действие полиеновых антибиотиков на синтез белка свободными и мембраносвязанными рибосомами *Candida albicans*. Биохимия. 41 (7): 1969—1975.

Лыгин А. В., Бутакова И. В., Польшгалова О. О., Гордон Л. Х. 1995. Изменение липидного состава отсеченных корней пшеницы под влиянием протонатора 2,4-динитрофенола. Биохимия. 60 (11): 1803—1810.

Лялин О. О., Ахмедов И. С., Киторова И. Н. 1981. Стимуляция и ингибирование электрогенеза плазмалеммы корне-

вого волоска *Trianea bogotensis*: Тез. докл. совещ. «Теоретические и экспериментальные вопросы процессов переноса в сложных молекулярных и биологических системах». Минск. 37—38.

Опритов В. А., Пятыгин С. С., Ретивин В. Г. 1991. Биоэлектрогенез у высших растений. М.: Наука. 214 с.

Петруняк В. В., Северина Е. П., Орлов С. Н., Безлепкина Т. А., Поснюшкина Е. А. 1989. Оценка роли эндогенных регуляторов в активации Ca²⁺-АТФазы мембран эритроцитов. Биохимия. 54 (6): 974—980.

Погудин Н. И., Петруняк В. В., Орлов С. Н. 1988. Участвует ли кальмодулин в регуляции активности Са-насоса в эритроцитах *in vitro*? Биохимия. 53 (5): 753—757.

Рахматуллина Д. Ф., Гордон Л. Х., Алябьев А. Ю., Ценцевичский А. Н., Лосева Н. Л. 2004. Карнозин модулирует потребление кислорода и тепловыделение клеток корней пшеницы. Докл. РАН. 396 (2): 283—285.

Скулачев В. П. 1992. Карнозин и анзерин как специализированные рН-буферы-переносчики ионов водорода. Биохимия. 57 (9): 1311—1316.

De Matteis F. 1969. Liver cholesterol metabolism following trauma. Evidence for increased rate of cholesterol synthesis and breakdown. Biochim. biophys. acta. 187.

Kandutsch A. A., Saucier S. B. 1969. Prevention of cyclic and triton-induced increases in hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and sterol synthesis by puromycin. J. Biol. Chem. 244: 2299—2305.

Le Grimellec C., Leblanc Y. 1978. Effect of membrane cholesterol on potassium transport in *Micoplasma mycoides* Var. Capri. Biochim. biophys. acta. 514: 152—163.

Lichtenberg H. C., Giebeler H., Hofer M. 1988. Measurements of electrical potential differences across yeast plasma membranes with microelectrodes are consistent with values from steady-state distribution of tetraphenylphosphonium in *Pichia hyderabadii*. J. Membr. Biol. 103: 255—261.

Поступила 14 XII 2004

ENERGY METABOLISM IN WHEAT ROOT CELLS UNDER MODIFICATION OF PLASMA MEMBRANE PERMEABILITY BY ANTIBIOTIC NYSTATIN

© L. Kh. Gordon,¹ Y. N. Valitova, T. I. Ogorodnicova, D. F. Rakhmatullina, A. Y. Alyabyev, N. L. Loseva, A. N. Tsentshevitsky, N. F. Ruban

Institute of Biochemistry and Biophysics RAS, Kazan¹;

¹ e-mail: gordon@mail.knc.ru

This paper reports changes in ion transport and energy metabolism of plant cells during short- and long-term expositions, resp., to antibiotic nystatin, which is known to specifically bind with plasma membrane sterols to form channels. The excised roots of 5 days old wheat seedlings were used as a model system in this research. It has been shown that treatment of excised roots with nystatin leads to activation of energy metabolism expressed as an increase of respiration and heat production by root cells. Furthermore, in the presence of nystatin increased pH of incubation medium, plasma membrane depolarization and a significant loss of potassium ions were observed. Nystatin-induced stimulation of respiration was prevented by malonate, an inhibitor of succinate dehydrogenase, electron acceptor dichlorophenolindophenol, and AgNO₃, an inhibitor of H⁺-ATPase. Based on the data obtained it can be suggested that nystatin-induced stimulation of respiration is related to electron transport activation via mitochondrial respiratory chain, and is connected with activation of plasmalemma proton pump. Moreover, nystatin-induced increase of oxygen consumption was prevented by cerulenin, an inhibitor of fatty acid and sterol synthesis. This indicates that additional sterols and phospholipids may be synthesized in root cells to «heal» nystatin-caused damage of plasma membrane. A supposed chain of events of cell response to nystatin action may be as following: formation of nystatin channels—influx of protons—depolarization of plasmalemma—efflux of potassium ions—disturbance of ion homeostasis—activation of H⁺-ATPase work—increase in energy «requests» for H⁺-ATPase function—increase in the rate of oxygen consumption and heat production. The increased energy production under the action of nystatin, may provide the work of proton pump and synthesis of sterols and phospholipids, which are necessary for membrane regeneration.

Key words: wheat root, energy exchange, oxygen consumption, heat production, protons, potassium ions, inhibitory analysis.