

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОТОНОФОРА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ КЛЕТОК КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ

© А. А. Пономарева,¹ О. О. Польшгалова

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН;

¹ электронный адрес: ponomareva@mail.knc.ru

Исследовали структурно-функциональные изменения в клетках отсеченных корней пшеницы при инкубации с протонатором. Векторный перенос H^+ внутрь клеток сопровождался снижением энергообеспечения клеток (подавлением интенсивности дыхания и тепловыделения), выходом ионов калия в среду инкубации и увеличением значения ее pH. Первоначальный всплеск тепловыделения через 1 ч, по-видимому, отражает процесс диссипации электрохимического градиента протонов на плазматической мембране. Уже через 5—10 мин действия 50 мкМ протонатора СССР выявлены изменения функции и ультраструктуры клеток: активация аппарата Гольджи, секреция содержимого везикул в вакуоль, набухание каналов эндоплазматического ретикула, конденсация митохондрий. Начиная со 2-го ч инкубации структурно-функциональные изменения имели деструктивную направленность, и через 5—6 ч большинство клеток в корне было полностью разрушено. В гибнущих клетках происходили фрагментация плазмалеммы, образование миелоноподобных телец, и разрушение ядер. Таким образом, избыточное поступление протонов внутрь клеток отсеченных корней в течение 6 ч совместной инкубации с протонатором СССР полностью дезэнергизирует клетки, что сопровождается многочисленными необратимыми нарушениями в ультраструктурной организации клеток и вызывает их гибель.

Ключевые слова: митохондрии, отсеченные корни пшеницы, протонатор, ультраструктура клеток, энергообеспечение.

Принятые сокращения: СССР — карбонилцианид3-хлорфенилгидразон, ЭР — эндоплазматический ретикулум.

В настоящее время накоплен достаточно обширный теоретический и экспериментальный материал, касающийся регуляторной роли ионов водорода в обеспечении метаболизма и онтогенеза растений (Davies, 1986; Jian-Hua Xia, Roberts, 1996). Поддержание внутриклеточного pH в достаточно узких физиологических пределах осуществляется за счет функционирования механизмов кратковременной и длительной регуляции pH в клетках растений (Felle, 1988; Kurkdjian, Guern, 1989).

Сдвиг внутриклеточного pH возможен при резком изменении pH внешней среды, соотношения кислот и оснований, H^+ -транспорта, фотопериода, при использовании протонаторов, метаболических ингибиторов и фитогормонов (Marre, Ballarin-Denti, 1985). Известно что, участие H^+ -помп плазматической мембраны и метаболических реакций возможно как в кратковременной, так и в длительной pH-регуляции, тогда как буферные свойства цитоплазмы и перемещение протонов внутри клетки обеспечивают только временную нейтрализацию потока H^+ и, по-видимому, исчерпываются в течение минут.

Важнейшая роль H^+ определяется не только поддержанием внутриклеточного pH, но и созданием концентрационной разности H^+ на энергосопрягающих мембранах. Именно электрохимический градиент протонов $\Delta\mu_{H^+}$ является основополагающим в обеспечении работы энергетических, транспортных и сигнальных систем клеток. Наличие электрохимического градиента протонов

на внутренней мембране митохондрий в нефотосинтезирующих тканях растений является основным условием функционирования электрон-транспортной цепи переносчиков и синтеза АТФ АТФ-синтетазой (Альбертс и др., 1987; Скулачев, 1989). Кроме этого, в последнее время иону водорода и протонной системе клеток растений все чаще приписывают регуляторную роль (Тарчевский, 2001; Рахматуллина и др., 2004).

В связи с этим целью работы являлось исследование энергообеспечения и ультраструктурных изменений клеток растений при избыточном поступлении ионов водорода внутрь клеток. Направленный перенос H^+ обеспечивали с помощью протонатора карбонилцианид3-хлорфенилгидразона (СССР). Общее изменение энергосостояния клеток оценивали с помощью интегральных показателей метаболизма — дыхания и теплопродукции корней. При этом в работе особое внимание уделяли характеристике ультраструктурных изменений, происходящих в клетках в течение 6 ч инкубации с протонатором.

Материал и методика

Объектом исследования служили отсеченные корни 5—6-суточных проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Люба, выращенные на растворе 0.25 мМ $CaCl_2$ при комнатной температуре и освещении. В течение 6-часо-

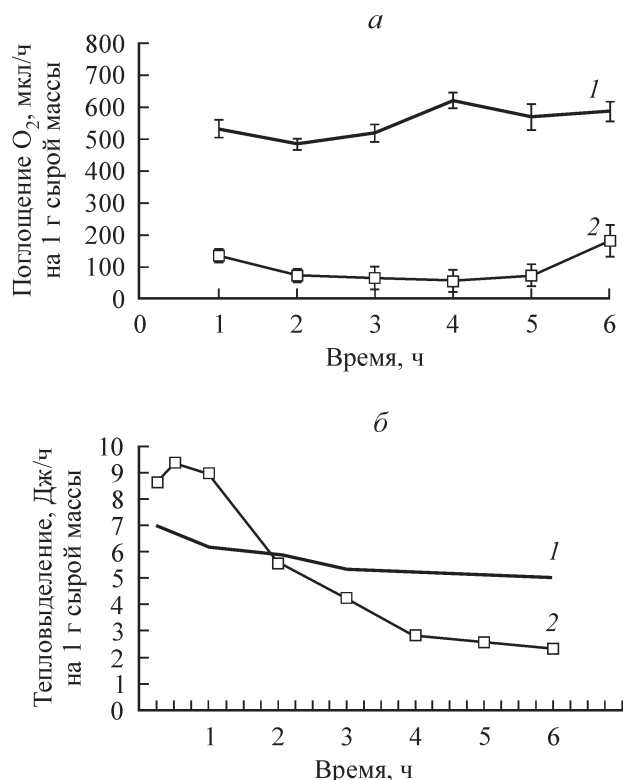


Рис. 1. Влияние 50 мкМ CCCP на интенсивность поглощения кислорода (а) и тепловыделение (б) отсеченными корнями пшеницы.

1 — контроль, 2 — протонофор CCCP.

Fig. 1. The influence of 50 mM CCCP on the intensity of oxygen consumption (a) and heat production (b) of excised wheat.

1 — control, 0.25 mM $CaCl_2$; 2 — protophore CCCP.

вой инкубации отсеченные корни находились в растворе 50 мкМ CCCP (Serva, Швеция). Величина концентрации подобрана на основании предыдущих работ (Пономарева и др., 2002) и исключает возможность адаптации и восстановления внутриклеточного гомеостаза в клетках отсеченных корней, что соответствует поставленной цели. Контролем являлись отсеченные корни пшеницы, инкубированные в растворе 0.25 мМ $CaCl_2$. Поскольку известно, что максимум эффективности протонофора находится в области pH, близкий к значению его pK_a , а для

СССР pK_a 5.9 (Terada, 1981), то значения pH всех растворов доводили до 5.9.

Интенсивность потребления кислорода определяли манометрическим методом в аппарате Варбурга. Навеску корней (150 мг) и 3 мл инкубационного раствора помещали в сосудики и после 10—15 мин термостатирования снимали показания каждый час. В инкубационной среде каждый час определяли содержание ионов калия на пламенном фотометре ПФМ У 4.2 (Россия) и измеряли pH на pH-метре ОР 211/1 (Radelkis, ВНР). Интенсивность тепловыделения корней регистрировали с помощью дифференциального микрокалориметра LKB-2277 (Швеция). В калориметрические ампулы объемом 3 см³ помещали навеску корней 40—50 мг и 1 мл инкубационного раствора. Измерения проводили при 30° С в течение всего опыта и регистрировали на ленте самописца.

Параллельно с вышеперечисленными измерениями отсеченные корни фиксировали для электронно-микроскопических исследований. Отступив от кончика корня 1 см, из зоны роста растяжением нарезали кусочки размером 1—2 мм, которые фиксировали в 2.5%-ном глутаральдегиде на 0.1 М Na-фосфатном буфере (pH 7.2), постфиксировали в 1%-ном растворе OsO_4 на том же буфере с добавлением сахарозы (25 мг/мл). После дегидратации образцы заключали в Эпон-812 (Serva, Германия). Срезы получали на ультрамикротоме LKB III (Швеция), контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. С помощью электронного микроскопа Hitachi HU-125E (Япония) просматривали поперечные срезы корня, анализировали ультраструктуру клеток центрального цилиндра.

На рисунках и в таблице приведены средние арифметические значения для трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки, каждый из экспериментов проведен в 3—5-кратной биологической повторности. Данные по теплопродукции отсеченных корней представлены в виде характерных индивидуальных кривых.

Результаты и обсуждение

Добавление к отсеченным корням протонофора CCCP вызывало значительное подавление дыхания корней с 1-го ч и до окончания эксперимента (на 85—90 % от уровня контрольных значений; рис. 1, а, кривая 2). В то же время наблюдали значительный выход в среду инкубации ионов K^+ , содержание которого оставалось на высоком уровне на протяжении всего опыта (см. таблицу). В течение 1-го ч происходило увеличение значения pH инкубационного раствора (по отношению к контролю), которое почти не изменялось в последующие часы (см. таблицу). Интенсивное тепловыделение наблюдали в течение 1-го ч эксперимента, а затем теплопродукция клеток снижалась, через 5—6 ч уровень тепловыделения составлял лишь 20—30 % от контроля (рис. 1, б, кривая 2).

Значительное торможение дыхания при действии высоких доз соединений, разобщающее воздействие которых основано на протонофорных свойствах, принято считать отражением необратимых процессов в митохондриях (Рубин, Ладыгина, 1974; Лялин, Ахмедов, 1979). Но при работе на целой ткани необходимо иметь в виду, что кроме действия на митохондрии возможно множество других эффектов, особенно при использовании больших концентраций чужеродных соединений. По данным ряда авторов, эффективность ингибирующего влияния на дыхание высоких доз протонофоров не коррелирует с

Изменение содержания ионов калия в инкубационном растворе и его pH в присутствии 50 мкМ протонофора CCCP

Время, ч	K ⁺ , мкэкв на 1 г сырой массы		Значение pH	
	контроль	СССР	контроль	СССР
1	4.3 ± 0.3	20.0 ± 1.3	5.25 ± 0.02	6.00 ± 0.02
2	3.0 ± 0.2	27.0 ± 1.4	5.09 ± 0.03	5.97 ± 0.04
3	2.7 ± 0.2	32.0 ± 0.5	5.17 ± 0.03	5.93 ± 0.02
4	1.5 ± 0.1	30.5 ± 1.6	5.26 ± 0.02	5.90 ± 0.05
5	0.5 ± 0.1	43.0 ± 2.0	5.47 ± 0.01	5.93 ± 0.05
6	0.3 ± 0.1	31.0 ± 1.8	5.56 ± 0.02	6.05 ± 0.03

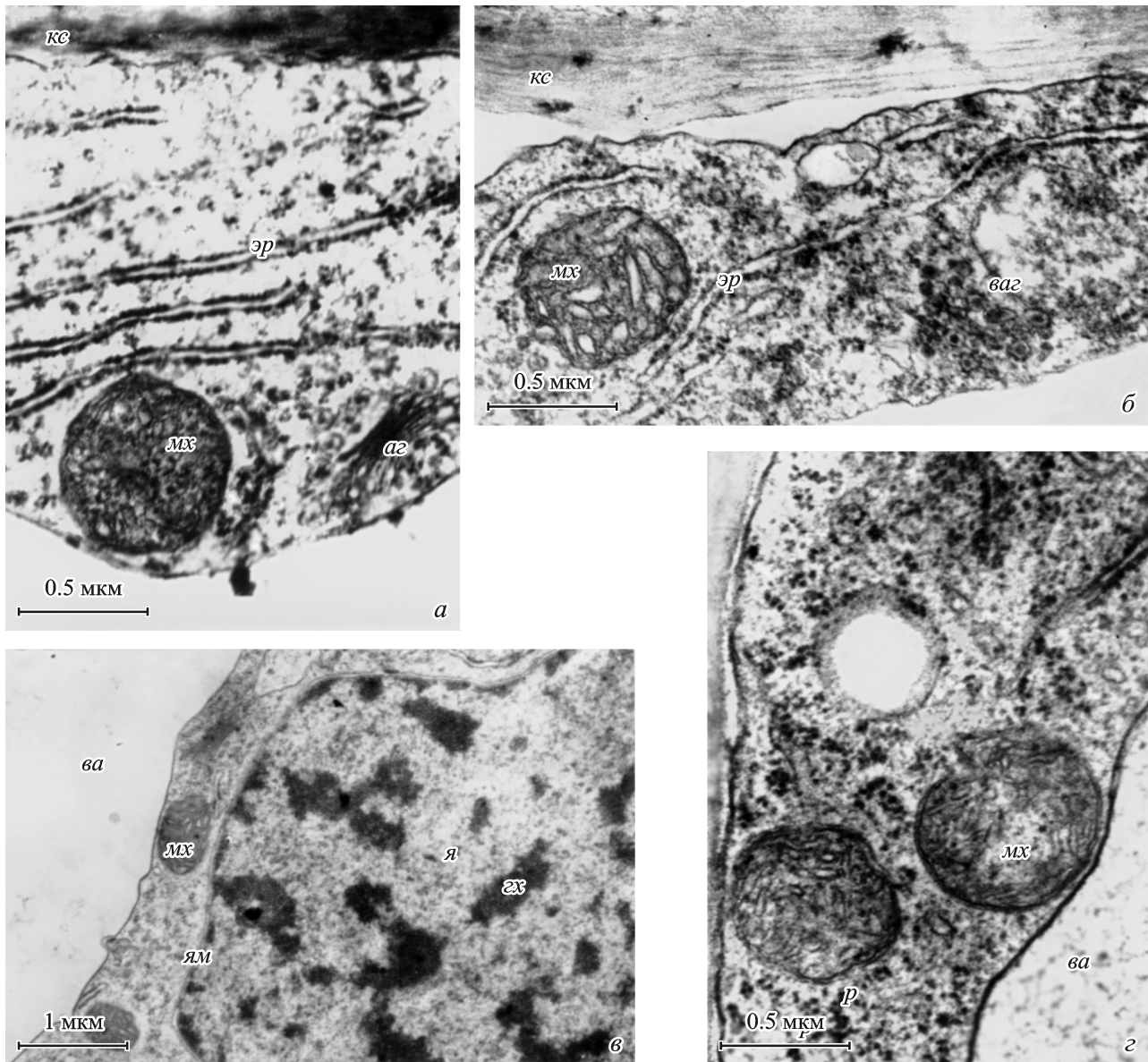


Рис. 2. Ультраструктура отсеченных корней пшеницы в течение 6 ч инкубации в контрольном растворе 0.25 мМ CaCl_2 . а — клетки исходных растений; б—г — митохондрии в клетках отсеченных корней через 15 мин, 1 и 6 ч после отсечения соответственно. аг — аппарат Гольджи, ваг — везикулы аппарата Гольджи, ва — вакуоль, гх — гетерохроматин, кс — клеточная стенка, мх — митохондрия, пм — плазмалемма, р — рибосомы, эр — эндоплазматический ретикулум, я — ядро, ям — ядерная мембрана.

Fig. 2. The ultrastructure of excised wheat roots as seen during a 6 h incubation in the control solution 0.25 mM CaCl_2 . а — cells of intact plants; б—г — mitochondria in cells of excised roots, in 15 min, 1 and 6 h, respectively. аг — Golgi apparatus, ваг — vesicles of Golgi apparatus, ва — vacuole, гх — heterochromatin, кс — cell wall, мх — mitochondria, пм — plasma membrane, р — ribosomes, эр — endoplasmic reticulum, я — nucleus, ям — nuclear membrane.

их разобщающей способностью (Скулачев, 1969; Humphreys, 1975) и, кроме того, вызывает одновременно со сбросом электрохимического градиента протонов потерю барьерных свойств плазмалеммы для низкомолекулярных веществ (Гаврилов, Конев, 1993).

Для выяснения причин всплеска теплопродукции корневых клеток на фоне действия 50 мкМ СССР исследовали ультраструктуру клеток отсеченных корней в начальный период воздействия, в течение 1-го ч (5, 10, 15 и 30 мин). Об ультраструктурных перестройках судили по изменению внутриклеточной организации клеток по сравнению с корнями, инкубированными в контрольном

растворе CaCl_2 . Как клетки исходных корней (рис. 2, а), так и клетки отсеченных корней в течение инкубации (рис. 2, б—г) характеризовались наличием одиночных каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума, диктиосом аппарата Гольджи, единичных пропластид, митохондрий ортодоксального вида (округлой формы, средней плотности матрикса, многочисленными кристами), цитоплазмы, насыщенной рибосомами, и ядра, в котором хроматин конденсирован равномерно по всему объему.

Существенные изменения в ультраструктуре клеток по сравнению с контролем наблюдали уже через 5—10 мин

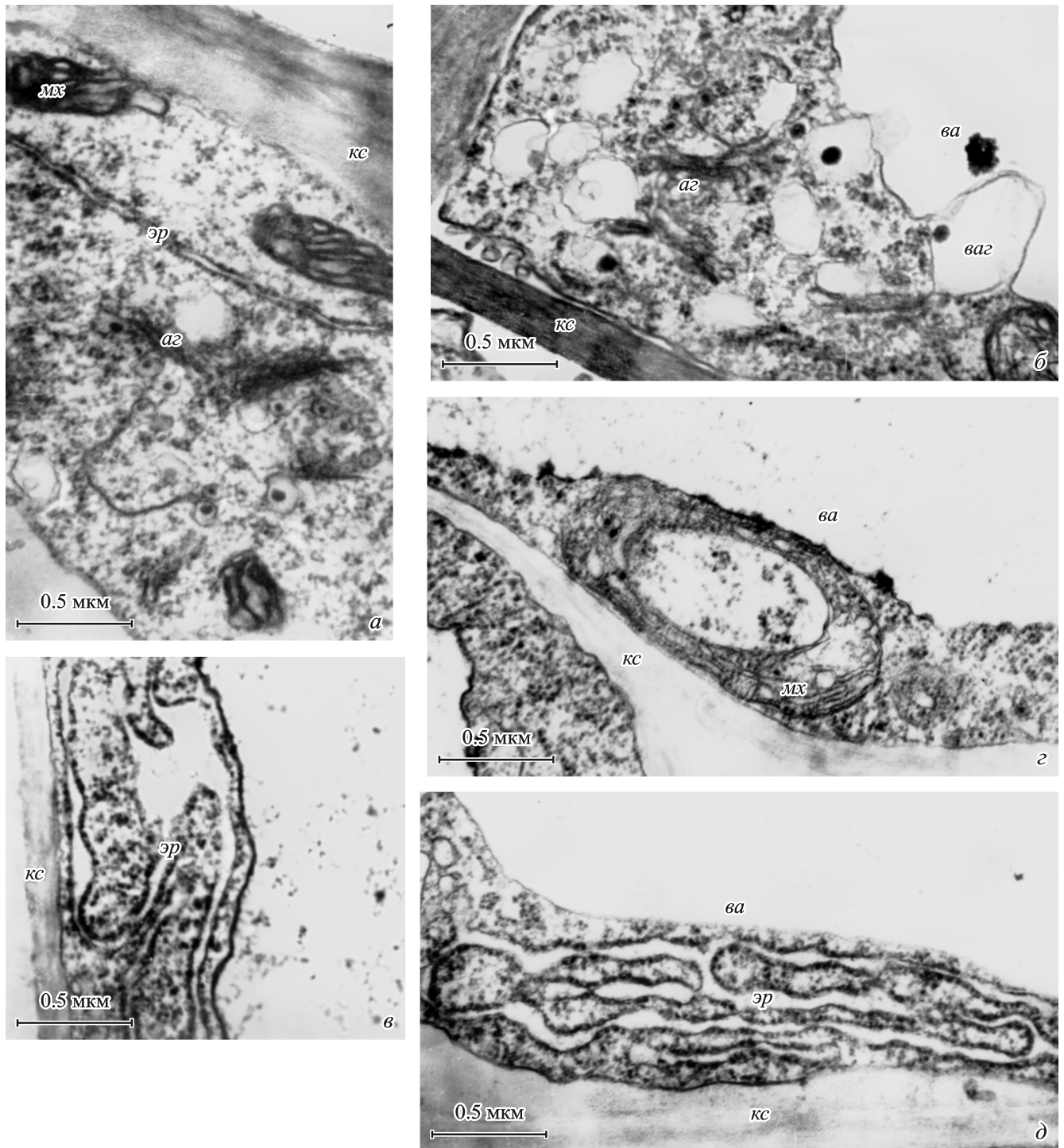


Рис. 3. Быстрые изменения в клетках отсеченных корней пшеницы при инкубации с протонофором СССР в течение 5—30 мин. *а* — конденсированные митохондрии, активно работающий аппарат Гольджи через 5 мин; *б* — секреция везикул аппарата Гольджи в вакуоль (5 мин); *в* — локальное расширение каналов эндоплазматического ретикулума (10 мин); *г* — появление тороидальных митохондрий (10 мин); *д* — равномерное расширение каналов эндоплазматического ретикулума (30 мин). *аг* — аппарат Гольджи; остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Fig. 3. Fast changes in excised wheat root cells occurring during 5—30 min incubation with protonophore CCCC. *a* — condensed mitochondria, actively working Golgi apparatus (5 min); *б* — secretion of Golgi vesicles to a vacuole (5 min); *в* — local swelling in endoplasmic reticulum cisternae (10 min); *г* — torus shaped mitochondria (10 min); *д* — uniform swelling endoplasmic reticulum cisternae (30 min). Designations are the same as in Fig. 2.

инкубирования с протонофором. Митохондрии имели конденсированную структуру (более плотный матрикс, набухшие кристы; рис. 3, *а*). Происходили частичное расширение каналов эндоплазматического ретикулума (ЭР; рис. 3, *в*), активация аппарата Гольджи, о чем можно судить по увеличению числа везикул в цитоплазме, их перемещению и секреции в центральную вакуоль (рис. 3, *а, б*). Известно, что аппарат Гольджи и ЭР связаны между собой функционально, поэтому их активация может быть вызвана более интенсивной работой ферментных систем, локализованных в их мембранах (Аветисова, Марьяхин, 1987; Jamora, 1999). Аналогичные изменения в ультраструктуре клеток растений описаны в условиях засоления (Удовенко, Цибковская, 1983) и при действии Ca^{2+} -ионофора A23187 (Minibayeva et al., 2000). Несомненно, что локальное набухание каналов ЭР и процесс секреции в центральную вакуоль являются ответной реакцией клеток на нарушение осмотических условий и направлены на их восстановление, которое возможно как за счет аккумуляции части ионов в каналах ЭР, так и при их перемещении и депонировании в центральной вакуоли.

Через 10 мин инкубации большинство митохондрий на срезах клеток имело кольцевую, а в пространстве, вероятно, тороидальную форму, что свидетельствует о наличии достаточно быстрого механизма изменения их пространственной организации (рис. 3, *г*). Хотя появление тороидальных митохондрий описано при воздействии на клетки аноксии, закаливании, дыхательных ядов (Алексеева и др., 1981; Генерозова и др., 1984; Абдрахимова, 1995), остаются неизвестными механизм и функциональная необходимость такой пространственной реорганизации органелл. Показано также, что за счет тороидальной формы значительно увеличивается площадь внешней мембраны митохондрий без изменения их объема (Полыгалова, 1984). По данным Буфетова с сотрудниками (2004), переход в тороидальную форму может быть связан с активацией внешней NAD(P)H-дегидрогеназы, локализованной на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий.

В последующие временные отрезки (15 и 30 мин) инкубации корней с протонофором кольцевые митохондрии в клетках не встречались и органеллы снова имели конденсированный вид (рис. 4, *а*), при этом каналы ЭР были равномерно расширены по всей длине (рис. 3, *д*).

Таким образом, в течение 1-го ч инкубации протонофор СССР вызывал целый ряд достаточно быстрых структурных перестроек органелл, в результате которых изменялась не только внутренняя организация, но и внешняя форма митохондрий. Вероятнее всего, эти перестройки связаны с изменением функциональной активности митохондрий на фоне изменения общего метаболизма клеток вследствие падения потенциала на плазмалемме и изменения pH цитоплазмы, а не обусловлены непосредственным взаимодействием СССР с митохондриальными мембранами. Поскольку появление митохондрий как конденсированного вида, так и тороидальной формы описано при широком спектре воздействий (аноксии, закаливании, дыхательных ядов, регуляторов роста и др.), то скорее всего оно носит неспецифический адаптивный характер.

В течение 1—2 ч инкубации часть митохондрий переходила в ортодоксальное состояние, хотя встречались и конденсированные органеллы (рис. 4, *б, в*). Все последующие изменения в ультраструктуре клеток происхо-

дили на фоне деструктивных процессов. В сохранившихся клетках увеличивалась плотность цитоплазмы за счет большого количества свободных рибосом (рис. 4, *г*). Поскольку поддержание структуры полисом является энергозависимым процессом (Лейкина и др., 1977), наблюдаемая дезагрегация полисом может являться как следствием истощения энергетических ресурсов, так и результатом нарушения проницаемости мембран при действии протонофоров (Jackson, 1982). В течение 2—4 ч совместной инкубации корней с СССР происходили отщипывание участков плазмалеммы (рис. 4, *д*) и ее расслоение, образование ламосом и миелоноподобных телец (рис. 5, *а, б*). Через 5—6 ч основные структуры в клетках были разрушены (рис. 5, *г, д*). Учитывая низкий уровень дыхания и тепловыделения корней, высокое содержание ионов K^+ в инкубационном растворе и его pH, можно говорить о полной гибели клеток отсеченных корней к этому сроку.

Таким образом, при действии высоких концентраций протонофора происходили значительные изменения ультраструктуры клеток уже через 5 мин. Митохондрии на протяжении всего эксперимента, и даже в гнущихся клетках, сохраняли свою структурную организацию (рис. 5, *г, д*). При этом СССР вызывал значительные необратимые изменения в метаболизме, которые отражались на общей ультраструктурной организации клеток корней. Начиная со 2-го ч изменялась организация ядра в клетках и можно было выявить начальные этапы пикнотической дегенерации (рис. 5, *в*). Поскольку ядерная мембрана содержит собственную электрон-транспортную цепь и ряд фосфатаз (Matzke et al., 2001), можно предположить как прямое влияние СССР на работу ее переносчиков, так и косвенное за счет изменения pH. Ядра в клетках либо сохраняли овальную форму, либо приобретали извилистые очертания, хроматин образовывал плотные скопления, расположенные непосредственно под ядерной оболочкой, кариоплазма просветлялась.

Описанные изменения соответствуют процессу маргинации хроматина и являются начальным этапом пикнотического разрушения ядра (Гуляев, 1970). Затем происходило разрушение ядерной оболочки, нарушение структурной целостности самого ядра и появление фибриллярных участков хроматина (рис. 5, *г*). Показано, что значительное подкисление внутриядерной среды вызывает необратимую стадию структурных нарушений хроматина за счет усиления как ферментативных, так и неферментативных реакций гидролиза с оптимумом действия pH, смещенным к кислым значениям (Сухоруков, Шварцбург, 1985). Такой автокаталитический характер деструкции пептидных групп белков и сложноэфирных связей нуклеиновых кислот был назван «протонным пробоем» макромолекул. Возможно, что он является одним из основных механизмов конечной стадии развития неспецифической реакции, ведущей к гибели клетки при действии различных повреждающих экзогенных химических и физических факторов.

Хотя при воздействии СССР интенсивность поглощения кислорода клетками корней была значительно подавлена уже через 1 ч, это ингибирование, по-видимому, нельзя объяснить лишь полным отсутствием функциональной активности митохондрий, поскольку митохондрии сохраняли не только свою структурную целостность, но и имели многочисленные кристы. Маловероятно, что клетка будет поддерживать такую сложную структурно-функциональную организацию внутренней мембраны

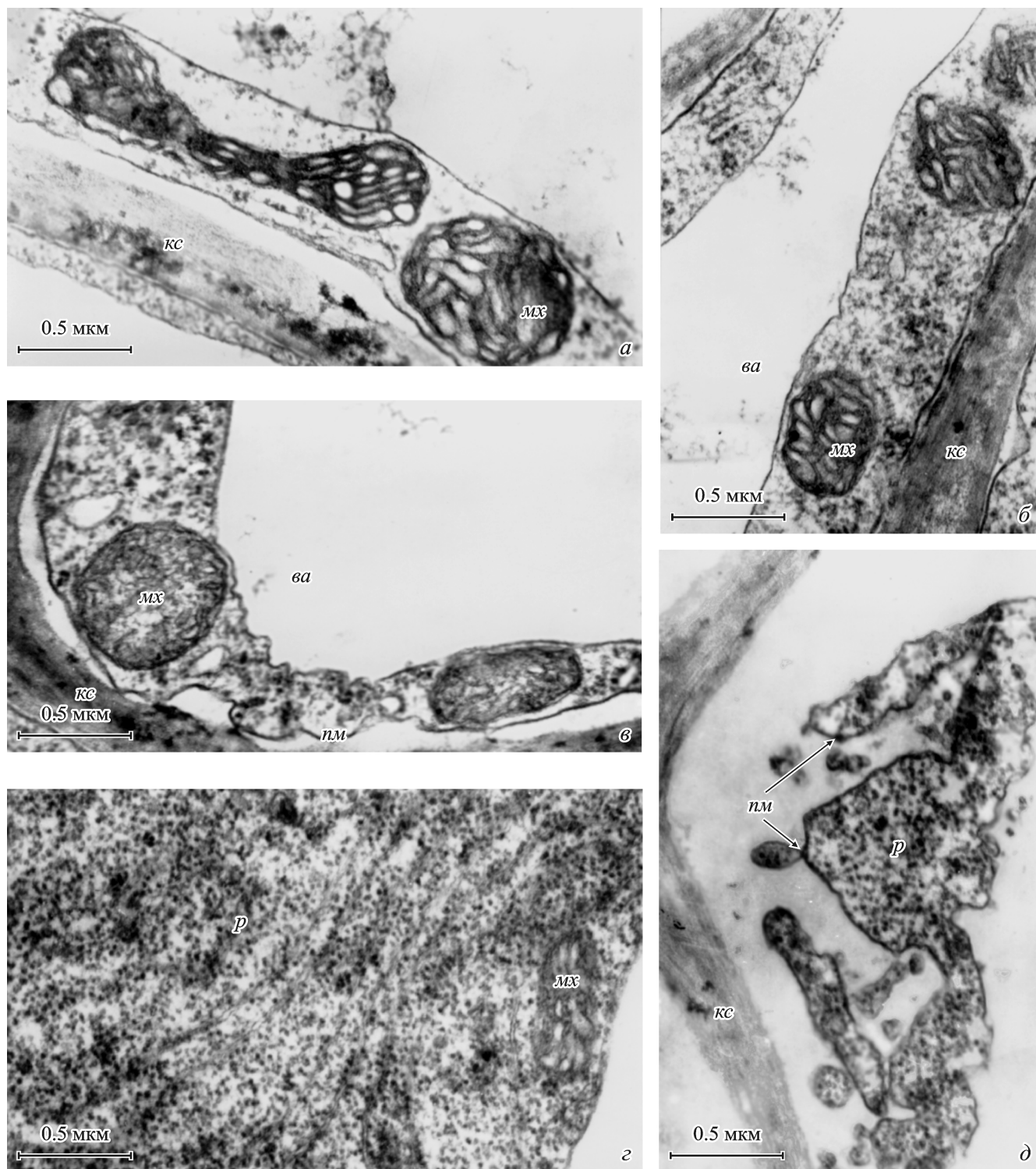


Рис. 4. Ультраструктура клеток отсеченных корней пшеницы при инкубации с протонатором CCCP в течение 1—4 ч. *а* — конденсирование митохондрии через 30 мин; *б, в* — митохондрии в клетках как конденсированного, так и ортодоксального типов (1 ч); *г* — увеличение плотности цитоплазмы за счет дезагрегации полисом (3 ч); *д* — нарушение целостности плазмалеммы, отшнуровывание ее участков (4 ч). *пм* — плазмалемма; остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Fig. 4. The ultrastructure of excised wheat root cells as seen after an incubation with protophore CCCP for 1—4 h. *a* — condensed mitochondria (30 min); *б, в* — mitochondria of both condensed and orthodox type (1 h); *г* — increase in cytoplasm density due to polysome disaggregation (3 h); *д* — plasma membrane integrity disruptions (4 h). Designations are the same as in Fig. 2.

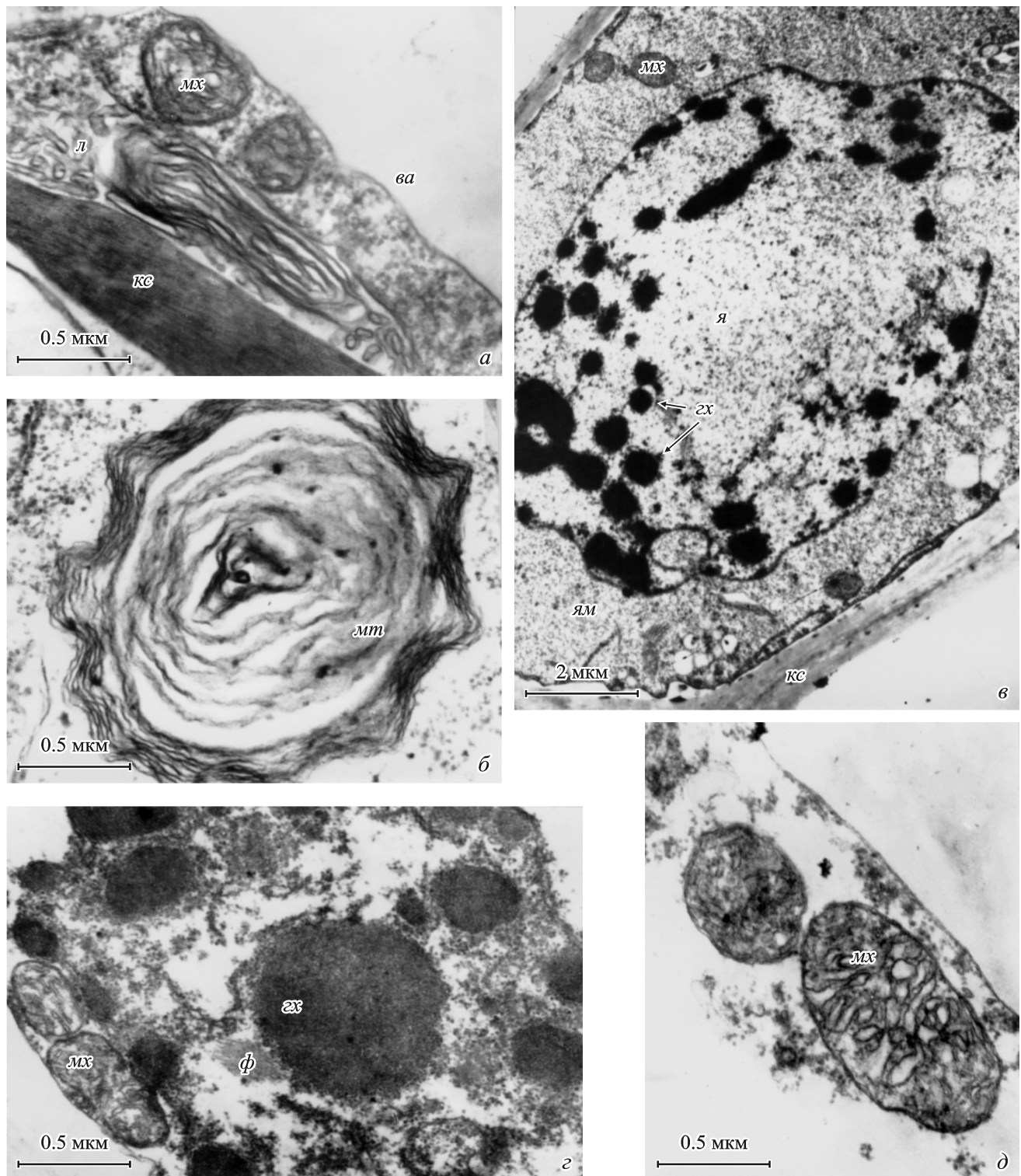


Рис. 5. Признаки деструктивного нарушения ультраструктуры клеток отсеченных корней пшеницы при инкубации с протонофором CCCP.

a — образование миелиноподобного тела и ломасом за пределами цитоплазмы через 2 ч; *б* — образование миелиноподобного тела в цитоплазме клетки через 3 ч; *в* — изменение формы ядра и конденсация хроматина через 2 ч; *г* — разрушение ядерной мембраны, появление фибриллярных зон хроматина в ядре (6 ч); *д* — сохранение структурной целостности митохондрий (6 ч). *л* — ломасомы, *мм* — миелиноподобное тело, *ф* — фибриллярная зона; остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Fig. 5. Features of destructive disruption in the ultrastructure of excised wheat roots cells during incubation with protophore CCCP. *a* — formation of myelin-like bodies and lomasomes outside the cell cytoplasm (2 h); *б* — myelin-like body formation in the cell cytoplasm (3 h); *в* — changes of the nuclear form and chromatin condensation (2 h); *г* — destruction of the nuclear membrane, appearance of fibrous zones of chromatin in the nucleus (6 h); *д* — preservation of structural integrity of mitochondria (6 h). *л* — lomasomes, *мм* — myelin-like body, *ф* — fibrous zones. Other designations are the same as in Fig. 2.

митохондрий без необходимости в их основной функциональной нагрузке, т. е. протекания процессов окисления и фосфорилирования. Показано, что при блокировании работы переносчиков электрон-транспортной цепи происходило просветление матрикса и значительная редукция крист за счет распрямления внутренней мембраны митохондрий (Алексеева и др., 1981; Буфетов и др., 2004). Вероятнее всего, в данном случае СССР резко и необратимо рассеивает протонный градиент на плазмалемме в течение нескольких минут, с чем и может быть связан всплеск тепловыделения (Скулачев, 1969), при этом интенсивный направленный поток протонов сильно закисляет цитоплазму, что косвенно подтверждается измерениями pH среды инкубации корней (см. таблицу). Уже через 1 ч воздействия протонофора уровень pH среды инкубации значительно превышал контрольные значения (т. е. был менее кислым) и почти не изменялся в течение эксперимента. При этом содержание ионов калия в инкубационном растворе оставалось высоким (см. таблицу), а интенсивность поглощения кислорода клетками минимальной (рис. 1, а, кривая 2). Таким образом, изменение этих физиологических параметров имело одинаковую направленность: максимальные изменения происходили в течение 1-го ч, а в последующие часы наблюдали незначительные колебания, сопровождающиеся постепенным разрушением структурной организации клеток. Вероятно, в результате значительного векторного перемещения H^+ и сдвига pH цитоплазмы становится невозможным нормальный ход метаболических процессов и в клетках не хватает внутренних резервов для поддержания и восстановления нарушенных функций. Необходимо также отметить, что необратимость нарушений метаболических процессов в клетках, регистрируемая при действии высокой концентрации СССР, прежде всего связана с рассеиванием трансмембранного электрохимического потенциала на плазмалемме (Renault et al., 1989). Как отмечают Конев и сотрудники (1985), на фоне действия различных по своей природе факторов (озона, высоких температур, диэтилстилбестрола) срабатывает одинаковый механизм гибели клеток, который действует по цепочке: сброс градиента H^+ — дезэнергизация — кооперативная перестройка структуры — потеря барьерных свойств мембраны. Используемый нами протонофор является непосредственным индуктором необратимой дезэнергизации, эффективность которого определяется пороговой концентрацией, вызывающей сброс ΔpH . Таким образом, многочисленные и достаточно быстрые изменения ультраструктуры клеток отсеченных корней уже со 2-го ч совместной инкубации с протонофором были обусловлены катаболическими процессами, связанными, вероятно, с необратимой дезэнергизацией плазмалеммы и значительным подкислением цитоплазмы. Итогом этих событий будет являться гибель клеток.

Преимущество использования метода электронной микроскопии заключается не только в получении общей иллюстративной картины изменений, происходящих в клетке, но и в выявлении структурно-функциональных изменений отдельных органелл клетки, о функциональной активности которых невозможно судить по измеряемым физиологическим параметрам. Общеизвестно влияние протонофоров на конформационные переходы и функциональное состояние митохондрий. Однако при действии СССР происходило изменение агрегации рибосом в цитоплазме, организации эндоплазматического ретикула, аппарата Гольджи и ядра в клетках. Дегра-

ция клеточных структур начиналась с дезагрегации полисом, нарушения структурной целостности плазмалеммы и завершалась конденсацией гетерохроматина, появлением фибриллярных зон и разрушением ядерной мембраны.

Таким образом, выявленные структурно-функциональные изменения в клетках корней пшеницы в течение 6 ч инкубации с 50 мкМ СССР, по-видимому, обусловлены массовым поступлением H^+ внутрь клеток. Разнообразие ультраструктурных изменений в клетках, вероятно, отражает разную степень изменения как pH цитоплазмы, так и потенциала на энергосопрягающих мембранах. На фоне пониженного энергообеспечения (падения интенсивности дыхания и тепловыделения) в клетках уже со 2-го ч инкубации наблюдалась частичная дегградация внутриклеточных структур. При дальнейшей совместной инкубации с СССР увеличивалось количество необратимых нарушений в ультраструктуре клеток, которые вызывали гибель корней к 5—6-му ч воздействия протонофора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-48671).

Список литературы

- Абдрахимова Й. Р. 1995. Субстратная регуляция, цианид-резистентность и ультраструктура митохондрий озимой пшеницы при действии низких температур и картолина: Автореф. канд. дис. Казань. 24 с.
- Аветисова Л. В., Марьяхин И. Я. 1987. Ультраструктура клеток каллуса капусты на средах с различными регуляторами роста. Физиол. раст. 34 (5) : 1012—1024.
- Алексеева В. Я., Гордон Л. Х., Польшалова О. О., Николаев Б. А., Сафина Г. Ф. 1981. Динамика дыхания и изменения ультраструктуры митохондрий в корнях пшеницы при длительном действии антимицина А. Физиол. раст. 28 (5) : 995—999.
- Альбертс Б., Брей Д., Льюис Ж., Рефф М., Робертс К., Уотсон Дж. 1987. Молекулярная биология клетки. М.: Мир. 3 : 6—35.
- Буфетов Е. Н., Польшалова О. О., Пономарева А. А. 2004. Структурно-функциональные изменения клеток корней пшеницы *Triticum aestivum* L. при действии малоната. Цитология. 46 (11) : 979—984.
- Гаврилов В. Б., Конев С. В. 1993. Активный транспорт протонов и энергизация плазматической мембраны дрожжевых клеток: индукция, и сопряжение с метаболизмом. Биол. мембраны. 10 (3) : 255—271.
- Генерозова И. Н., Сихчан А. Г., Вартапетян Б. Б. 1984. Динамика изменения ультраструктуры митохондрий проростков кукурузы в условиях аноксии. Физиол. раст. 31 (4) 683—691.
- Гуляев В. А. 1970. Электронномикроскопическая характеристика пикнотической дегенерации ядра. В кн.: Клеточное ядро и его ультраструктура. М.: Наука. 348—355.
- Конев С. В., Гаврилов В. Б., Орехова Т. А., Матус В. К. 1985. Кооперативная гибель дрожжевых клеток при озон-индуцированном сбросе H^+ -градиента на мембране. ДАН СССР 281 (2) : 454—457.
- Лейкина М. И., Ченцов Ю. С., Стволинская Н. С. 1977. Адаптация клеток в культуре тканей при разобщении окислительного фосфорилирования. Цитология. 19 (12) : 1340—1345.
- Лялин О. О., Ахмедов И. С. 1979. Электрические характеристики клеток и межклеточных контактов листа *Elodea canadensis*. В кн.: Ионный транспорт в растениях. Киев: Наук. думка. 30—92.

- Полыгалова О. О. 1984. Структурно-функциональные изменения в клетках корней пшеницы при воздействии некоторых ингибиторов митохондриального дыхания и мембранотропных соединений: Автореф. канд. дис. Казань. 22 с.
- Пономарева А. А. 2002. Изменение ультраструктуры и энергообеспечения клеток корней пшеницы при действии протонофора: Автореф. канд. дис. Казань. 21 с.
- Пономарева А. А., Полыгалова О. О., Алябьев А. Ю. 2001. Изменение энергетического состояния клеток корней пшеницы при действии протонофора. Физиол. раст. 48 (4): 562—565.
- Рахматуллина Д. Ф., Гордон Л. Х., Алябьев А. Ю., Ценцевский А. Н., Лосева Н. Л. 2004. Карнозин модулирует потребление кислорода и тепловыделение клеток корней пшеницы. Докл. РАН. 396 (2): 283—285.
- Рубин Б. А., Ладыгина М. Е. 1974. Физиология и биохимия дыхания растений. М.: Изд-во МГУ. 513 с.
- Скулачев В. П. 1969. Аккумуляция энергии в клетке. М.: Наука. 440 с.
- Скулачев В. П. 1989. Энергетика биомембран. М.: Наука. 564 с.
- Сухоруков Б. И., Шварцбург П. М. 1985. Влияние концентрации ионов водорода на состояние хроматина в лимфоидных клетках. Биофизика. 30 (4): 637—641.
- Тарчевский И. А. 2001. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фен. 448 с.
- Удовенко Г. В., Цибковская Н. С. 1983. Динамика изменений ультраструктуры органелл в клетках листьев ячменя при засолении. Физиол. раст. 30 (3): 518—526.
- Davies D. D. 1986. The fine control of cytosolic pH. Physiol. Plant. 67: 702—706.
- Felle H. 1988. Short-term pH regulation in plants. Physiol. Plant. 74: 583—591.
- Humphreys T. E. 1975. Dinitrophenol-induced hydrogen-ion influx into the maize scutellum. Planta. 127: 1—10.
- Jackson P. C. 1982. Differences between effects of undissociated and anions 2,4-DNP on permeability of barley roots. Plant Physiol. 70: 1373—1379.
- Jamora C. 1999. 100 years of Golgi complexities. Trends in Cell Biol. 9: 37—38.
- Jian-Hua Xia, Roberts J. 1996. Regulation of H⁺ extrusion and cytoplasmic pH in maize root tips acclimated to a low-oxygen environment. Plant Physiol. 111: 227—233.
- Kurkdjian A., Guern J. 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 40: 271—303.
- Marre E., Ballarin-Denti A. 1985. The proton pumps of the plasmalemma and tonoplast of higher plants. J. Bioenerg. Bioembr. 17: 1—21.
- Matzke M., Aufsatz W., Gregor W., van der Winder J., Papp I., Matzke A. 2001. Ion transporters in the nucleus? Plant Physiol. 127: 10—13.
- Minibayeva F., Polygalova O., Alyabyev A., Gordon L. 2000. Structural and functional changes in root cells by calcium ionophore A23187. Plant and Soil. 219: 169—175.
- Renault S., Despeghel-Caussin C., Bonnemain J. L., Delrot S. 1989. The proton electrochemical transmembrane gradients generated by the transfer cells of the haustorium of *Polytrichum formosum* and their use in the uptake of amino acids. Plant Physiol. 90: 913—920.
- Terada H. 1981. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. Biochim. biophys. acta. 639: 225—242.

Поступила 7 VI 2005

THE INFLUENCE OF PROTONOPHORE HIGH CONCENTRATION ON THE STRUCTURE AND FUNCTIONS OF WHEAT ROOT CELLS

A. A. Ponomareva,¹ O. O. Polygalova

Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan' Research Centre RAS, Kazan';

¹ e-mail: ponomareva@mail.knc.ru

Protonophore induced structural and functional changes in cells of excised roots of wheat seedlings have been investigated. The vector transfer of H⁺ inside the cells was accompanied by a decrease in energy supply of these cells (suppression of oxygen consumption and heat release), an output of K⁺ ions to the incubation medium, and by an increase in its pH value. The initial increase in heat release by roots (1 h) apparently reflects the process of dissipation of $\Delta\mu_{H^+}$ in plasma membrane. Within the first 5—10 min of exposure of 50 μ M CCCP, changes in cell ultrastructure were observed that involved activation of Golgi apparatus, secretion of vesicle contents to the vacuole, and swelling of endoplasmic reticulum canals. Following a 2 h treatment with CCCP, structural and functional changes acquired a destructive character, and after 5—6 h of treatment with protonophore a complete desintegration of cell structure occurred demonstrating formations of myelin-like bodies, fragmentation of plasma membrane, and destruction of the nucleus. Thus, the protonophore induced proton excessive transport inside cells is fast and may cause an irreversible cell de-energization followed by serious disruption of ultrastructural organization of cells leading eventually to their death.

Key words: mitochondria, excised roots of wheat, protonophore, cell ultrastructure, energy supply.