

## ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ ИОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ ПЛАЗМАЛЕММЫ НА ДЫХАНИЕ И ТЕПЛОПРОДУКЦИЮ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ

© В. Я. Алексеева,<sup>1</sup> Л. Х. Гордон, Н. Л. Лосева, Г. Г. Рахимова, А. Н. Ценцевицкий

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН;

<sup>1</sup> электронный адрес: [alekseeva@mail.knc.ru](mailto:alekseeva@mail.knc.ru)

В основе формирования функционального ответа клеток на внешние воздействия лежит взаимосвязь энергетического обмена с ионным транспортом. В настоящей работе сделана попытка оценить энергозатраты на формирование ответных реакций и адаптации в зависимости от степени изменения проницаемости плазмалеммы. Исследовали динамику изменений дыхания, теплопродукции и мембранных характеристик клеток отсеченных корней пшеницы при модуляции ионной проницаемости плазмалеммы мембраноактивными соединениями валиномицином (20 и 50 мкм — В20 и В50 соответственно) и хлорпромазином (50 и 100 мкм — ХП50 и ХП100 соответственно). Показано, что 2-часовое инкубирование отсеченных корней в присутствии этих соединений вызывает усиление потери ионов калия корнями, коррелирующее со снижением мембранного потенциала (МП) клеток, а также изменения дыхания и теплопродукции. Различия в изменении этих показателей обусловлены особенностями механизмов действия мембраноактивных соединений и степенью нарушения ими ионного гомеостаза клеток. В20 оказал слабое влияние на изученные параметры. В50 вызвал увеличение интенсивности дыхания и теплопродукции отсеченных корней, которые усиливались при длительном воздействии (5 ч) и были сопряжены с восстановлением ионного гомеостаза. Степень изменений мембранных характеристик (увеличение потери калия корнями и снижение МП клеток) и энергетические затраты в начальный период под влиянием ХП50 были больше, чем в присутствии В50. При длительном действии ХП50 усиление интенсивности дыхания и увеличение уровня теплопродукции коррелировали с частичным восстановлением ионного гомеостаза клеток корней. Существенное снижение МП клеток и значительная потеря ими калия под влиянием ХП100 уже на ранних этапах ответной реакции клеток сопровождалась подавлением дыхания и теплопродукции. Изменения структурно-функциональных характеристик клеток отсеченных корней свидетельствуют об усилении мембранотропного эффекта ХП100 при длительном воздействии и истощении энергетических ресурсов клеток.

Ключевые слова: дыхание, ионная проницаемость плазмалеммы, корни пшеницы, мембраноактивные соединения, теплопродукция.

Принятые сокращения: МП — мембранный потенциал, ХП — хлорпромазин, ЭР — эндоплазматический ретикулум.

В адаптации клетки фундаментальную роль играет ее мембранная система, интегрирующая действие всевозможных факторов. Изменения транспортных процессов на плазмалемме относятся к числу ранних реакций клеток растений на действие стрессоров. Большинство таких воздействий вызывает снижение электрохимического градиента  $H^+$  на плазмалемме, изменение которого служит пусковым механизмом ответной реакции клеток (Тарчевский, 2002). Регуляция их чувствительности к повреждающим воздействиям связана с функционированием электрогенной помпы и зависит от энергетического статуса клеток (Morsomme, Boutry, 2000; Palmgren, 2001). Энергетические затраты жестко связаны с динамикой структурно-функционального состояния клеточных структур и являются фактором, отражающим специфический ответ клеток на внешние воздействия.

В основе формирования функционального ответа клеток на внешние воздействия лежит взаимосвязь энер-

гетического обмена с ионным транспортом. На поддержание неравновесного распределения большинства ионов между клеткой и средой уходит до 20—30 % общих энергозатрат клетки (Медведев, 2005). Предполагается (Чернышева и др., 2004), что одним из звеньев в регуляции внутриклеточного обмена и соответствующих энергетических затрат является смещение ионного гомеостаза клеток через изменения структурно-функциональных свойств плазмалеммы. Степень возмущения ионного гомеостаза клеток будет определяться изменениями соотношения пассивных и активных транспортных процессов.

В настоящей работе была исследована динамика изменений дыхания, теплопродукции и МП клеток отсеченных корней пшеницы с целью оценить энергозатраты на формирование ответных реакций и адаптации в зависимости от степени изменения проницаемости плазмалеммы.

## Материал и методика

Объектом исследования служили отсеченные корни 5-суточных проростков яровой пшеницы *Triticum aestivum* L., выращенных на дистиллированной воде (низко-солевого статуса). О выделении калия клетками судили по изменению его содержания в среде инкубации (через 1, 2 или 5 ч), определяемому на пламенном фотометре. Количество калия выражали в мэкв на 1 г сырой массы корней (за соответствующее время). Интенсивность потребления кислорода отсеченными корнями определяли каждый час в течение 5 ч манометрическим методом в аппарате Варбурга. МП измеряли с использованием стандартной микроэлектродной техники. Интенсивность тепловыделения измеряли с помощью микрокалориметра LKB 2277 (Швеция), сконструированного по модульной схеме. В ходе опыта регистрировали тепловую мощность, которая характеризует скорость выделения тепла (Дж на 1 г сырой массы) и является показателем эффективности использования энергии (Hansen et al., 1997; Kemp, Guan, 1998). Нами были использованы соединения с различной степенью влияния на структурно-функциональные свойства плазмалеммы: специфический калиевый ионофор валиномицин и ксенобиотик фенотиазинового ряда хлорпромазин (ХП) — мембраноактивное соединение широкого спектра действия. Контролем служили отсеченные корни, инкубированные в дистиллированной воде соответствующее время. Концентрации валиномицина подбирали экспериментально. В настоящей работе он был использован в концентрациях 20 и 50 мкМ (далее В20 и В50 соответственно). Мембраноактивное соединение ХП широко используется как модулятор кальций/кальмодулинзависимых процессов, мембранных АТФаз и фосфатаз (Chandra et al., 1996; Bhattacharya, Sen, 1999; Bhatnagar, Singh, 2003). ХП связывается с полярными группами фосфолипидов мембран, вытесняет ионы кальция, нарушая соотношение зарядов на мембране, что приводит к сдвигам ее проницаемости (Орлов, 1987). В наших экспериментах ХП был использован в концентрациях 50 и 100 мкМ (далее ХП50 и ХП100 соответственно), подобранных ранее для данного объекта (Польгалова и др., 1982). Опыты проводили в 3—5 аналитических и 3—5 биологических повторностях.

Реактивы. Использованы валиномицин (Serva, Германия) и ХП (Sigma, США).

## Результаты

При исследовании динамики выделения ионов калия клетками корней было установлено постепенное снижение выхода  $K^+$  в контрольном варианте (см. таблицу). Инкубирование корней с ХП вызвало увеличение содержания  $K^+$  в среде (по сравнению с контролем), величина которого зависела от концентрации и продолжительности воздействия. В присутствии ХП50 потеря  $K^+$  клетками увеличивалась после 1 и 2 ч воздействия, а через 5 ч содержание калия в среде было меньше, чем при 1-часовой инкубации корней. ХП100 вызвал значительное увеличение выхода клеток  $K^+$  из клеток, которое усиливалось со временем.

В контроле снижение содержания калия в среде через 2 и 5 ч коррелировало с уменьшением рН среды. Под влиянием ХП наблюдалось увеличение рН среды после 1

и 2 ч инкубации, более значительное в присутствии ХП100 (см. таблицу). Кроме того, происходило снижение рН среды после 5 ч инкубации корней с ХП100, коррелирующее с существенной потерей  $K^+$  клетками. Возрастание рН среды является одним из показателей усиления поступления в клетки протонов.

С диссипацией протонного градиента на плазмалемме связано снижение МП клеток в присутствии ХП, более значительное под влиянием ХП100 (рис. 1). Величина МП клеток определяется соотношением электрогенных каналов и каналов утечки. Снижение МП клеток корней в присутствии ХП, коррелирующее с возрастанием потери ими  $K^+$ , связано с увеличением числа каналов утечки на плазмалемме. Увеличение потери калия и повышение рН среды инкубации при одновременном снижении МП клеток свидетельствует о нарушении ионных градиентов и возрастании ионной проницаемости плазмалеммы, особенно существенно при инкубации корней с ХП100. После 5 ч воздействия ХП50 наблюдалось увеличение МП клеток (по сравнению с 1—2 ч), в случае ХП100 МП клеток оставался таким же низким, как после 2 ч воздействия.

С нарушением ионного гомеостаза клеток связаны изменения дыхания отсеченных корней в присутствии ХП. Они не были однозначными. В наших экспериментах ХП50 в первые 2 ч инкубации слабо влиял на потребление  $O_2$  отсеченными корнями. Наблюдалась небольшая стимуляция дыхания (рис. 2), которая при увеличении продолжительности воздействия усиливалась и коррелировала с увеличением МП и снижением потери  $K^+$  клетками. Под влиянием ХП100 происходило снижение потребления  $O_2$  клетками корней. Оно было максимальным через 3 ч инкубации. Ингибирование дыхания корней ХП100 в 1-е ч коррелировало со снижением МП клеток, значительной потерей ими  $K^+$  и увеличением рН среды инкубации. При 4- и 5-часовом воздействии ХП100 ингибирование дыхания сменялось стимуляцией более значительной, чем в присутствии ХП50, однако потеря  $K^+$  и МП клеток оставались примерно такими же, как после 2 ч воздействия.

Дыхание корней восполняет убыль внутренней энергии и обеспечивает необходимый для выполнения жизненных функций энергетический уровень. Часть освободившейся при дыхании энергии является одним из источников теплопродукции. Энергетические затраты, связанные с переносом ионов через плазмалемму, вносят определенный вклад в теплопродукцию клеток (Гордон и др., 1995; Alekseeva et al., 2004). Под влиянием ХП наблюдалось снижение теплопродукции, при воздействии ХП100 оно было более значительным, чем в присутствии ХП50 (рис. 4). При увеличении продолжительности инкубации отсеченных корней с ХП50 происходили повышение уровня тепловыделения, коррелирующее с возрастанием потребления кислорода, и приближение значений к контрольному уровню, а при действии ХП100 теплопродукция оставалась такой же низкой, как и после 2 ч воздействия.

Специфический  $K^+$ -ионофор валиномицин вызвал увеличение потери калия отсеченными корнями (см. таблицу). Содержание  $K^+$  в среде инкубации отсеченных корней зависело от концентрации валиномицина и продолжительности воздействия. В присутствии В20 потеря калия клетками увеличилась незначительно (меньше, чем под влиянием В50) после 1 и 2 ч инкубации отсеченных корней. После 5 ч воздействия валиномицином со-

Влияние хлорпромазина (ХП) и валиномицина на содержание ионов калия в среде инкубации отсеченных корней (СИ) и величину ее pH

Вариант опыта	Содержание K <sup>+</sup> (мкэкв на 1 г сырой массы) в СИ через разное время, ч			pH СИ через разное время, ч		
	1	2	5	1	2	5
Контроль (H <sub>2</sub> O) pH 6.1	3.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0	5.5	5.1	5.3
ХП, 50 мкМ, pH 5.7	5.8 ± 0.1	7.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1	6.0	5.4	5.3
ХП, 100 мкМ, pH 5.7	10.3 ± 0.2	11.8 ± 0.2	14.1 ± 0.2	6.3	5.7	4.7
Валиномицин, 20 мкМ, pH 6.0	4.2 ± 0.1	5.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	6.0	5.5	5.6
Валиномицин, 50 мкМ, pH 6.0	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.0	2.3 ± 0.1	6.0	5.4	5.7

держание калия в среде было меньше, чем при 1-часовом воздействии, т. е. происходило поглощение ионов калия, вышедших в инкубационный раствор. Наблюдалось небольшое подкисление среды инкубации по сравнению с исходными значениями. В20 вызвал незначительное снижение МП клеток, величина которого к 5-му ч воздействия приближалась к значениям в контроле (рис. 1). Деполяризация плазмалеммы клеток корней, вызванная В50, была больше, чем в присутствии В20, но меньше, чем в случае воздействия ХП50. При продолжительном действии В50 на корни увеличение МП клеток коррелировало с уменьшением содержания K<sup>+</sup> и снижением pH среды инкубации.

Валиномицин вызвал увеличение потребления кислорода отсеченными корнями. Стимуляция дыхания усиливалась со временем и была больше под влиянием В50 (рис. 3). На теплопродукцию корней В20 практически не оказал влияния, а в присутствии В50 наблюдалось увеличение тепловыделения (рис. 4).

## Обсуждение

Таким образом, и специфический калиевый ионофор валиномицин, и хлорпромазин, обладающий широким спектром действия на клетки, вызвали увеличение потери K<sup>+</sup> отсеченными корнями. Восстановительные процессы, направленные на предотвращение деструктивных изменений ионного гомеостаза, связывают с активированием H<sup>+</sup>-помпы, в частности H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы, использующей энергию метаболизма для генерации МП и переноса K<sup>+</sup> через мембрану (Slayman, 1987). Одним из механизмов регуляции H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы при стрессовых воздействиях является модуляция ее активности ионами калия как с внутренней, так и с наружной стороны мембраны (Grouzis et al., 1990; Опритов и др., 1999; Zheng et al., 2000). H<sup>+</sup>-АТФаза активируется при достижении определенного уровня содержания внеклеточного калия. Ранее нами было показано, что увеличение потери калия отсеченными корнями при 2-часовом

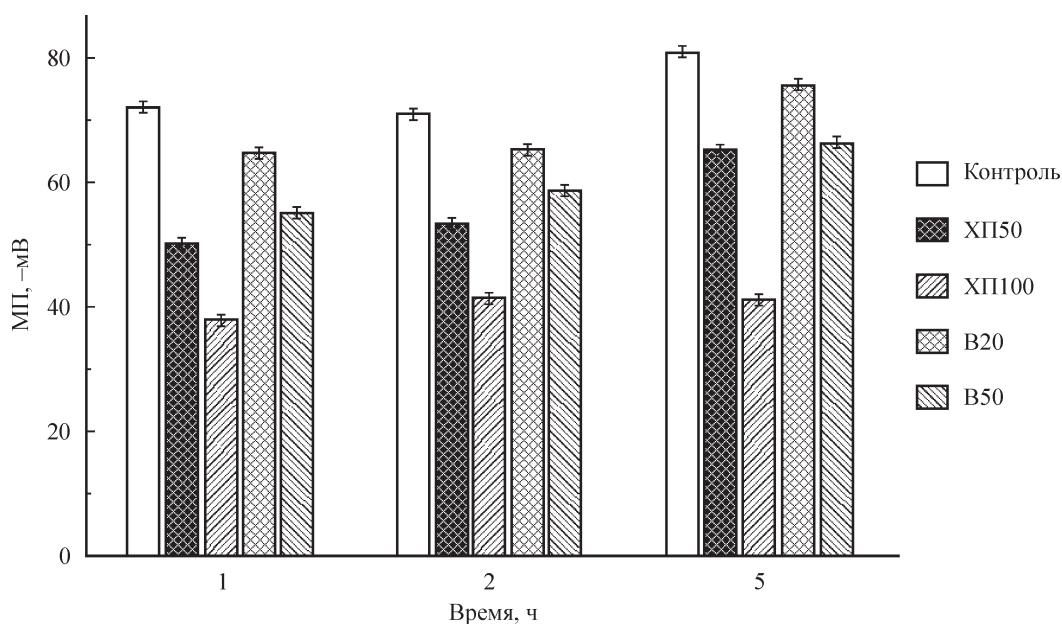


Рис. 1. Влияние хлорпромазина в концентрации 50 (ХП50) или 100 (ХП100) мкМ и валиномицина в концентрации 20 (В20) или 50 (В50) мкМ на мембранный потенциал клеток отсеченных корней.

Fig. 1. Effect of chlorpromazine at concentrations of 50 (CP50) or 100 (CP100)  $\mu$ M, and valinomycin at concentrations of 20 (V20) or 50 (V50)  $\mu$ M on the membrane potential of excised root cells.

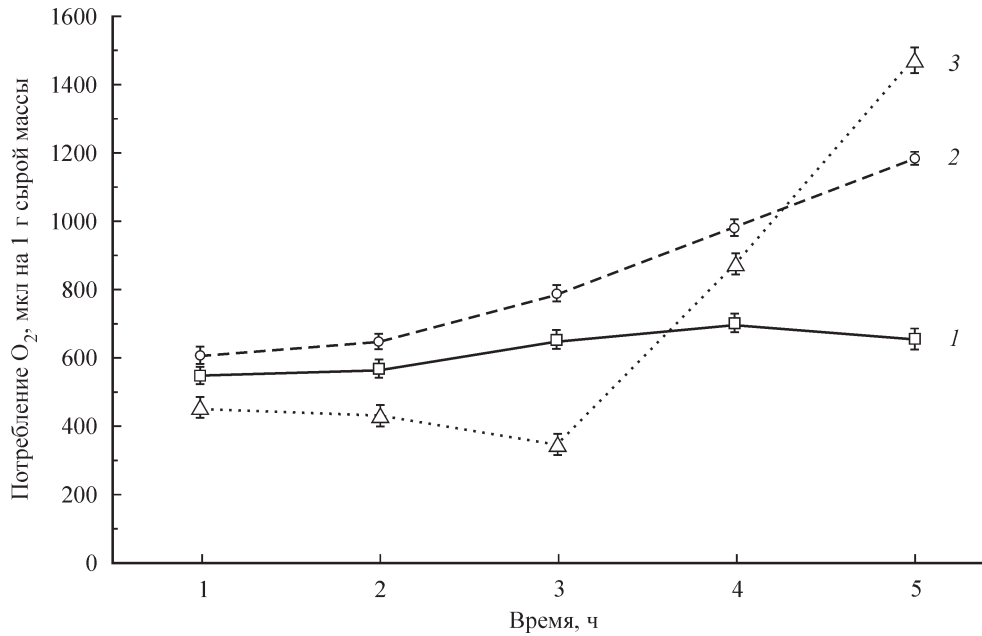


Рис. 2. Влияние хлорпромазина (ХП) на интенсивность дыхания отсеченных корней пшеницы.

1 — контроль, 2 — 50 мкМ ХП, 3 — 100 мкМ ХП.

Fig. 2. Effect of chlorpromazine (CP) on respiration intensity of excised roots.

1 — control, 2 — 50 μM CP, 3 — 100 μM CP.

воздействию валиномицина сопровождалось повышением АТФазной активности на плазмалемме (Чернышева и др., 2004). Об активировании электрогенных каналов и усилении  $K^+/H^+$ -обмена, компенсирующих увеличение каналов утечки, вызванное валиномицином, свидетельствуют поглощение ионов калия, вышедших из отсеченных корней в 1-е ч инкубации, подкисление среды и частичное восстановление МП клеток после 5 ч воздействия.

Поддержание оптимального уровня метаболических процессов и соотношения жизненных функций при действии стрессоров связано с работой механизмов регуля-

ции. Поддержание оптимального уровня метаболических процессов и соотношения жизненных функций при действии стрессоров связано с работой механизмов регуля-

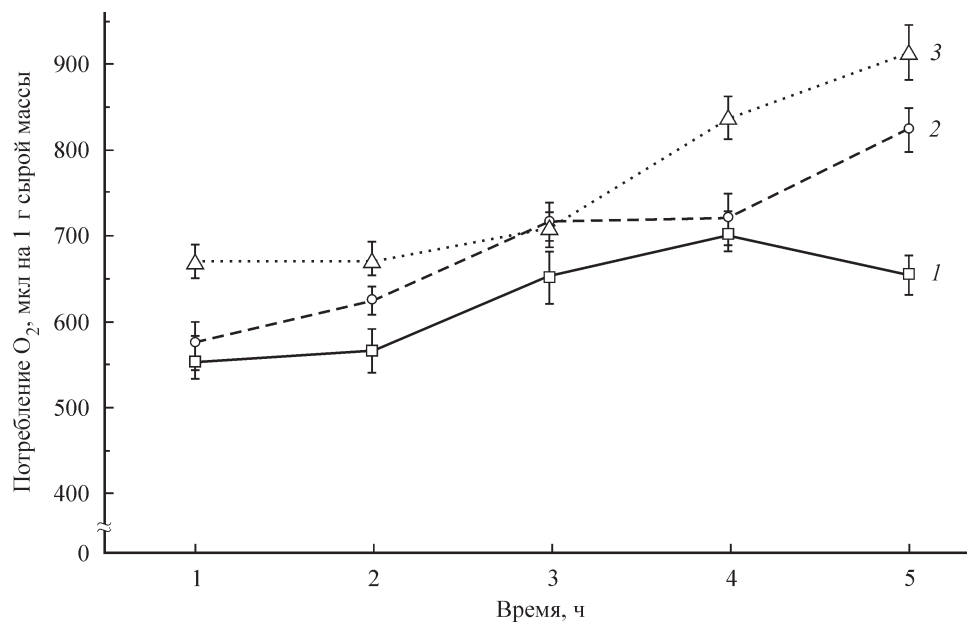


Рис. 3. Влияние валиномицина (В) на интенсивность дыхания отсеченных корней.

1 — контроль, 2 — 20 мкМ В, 3 — 50 мкМ В.

Fig. 3. Effect of valinomycin (V) on respiration intensity of excised roots.

1 — control, 2 — 20 μM V, 3 — 50 μM V.

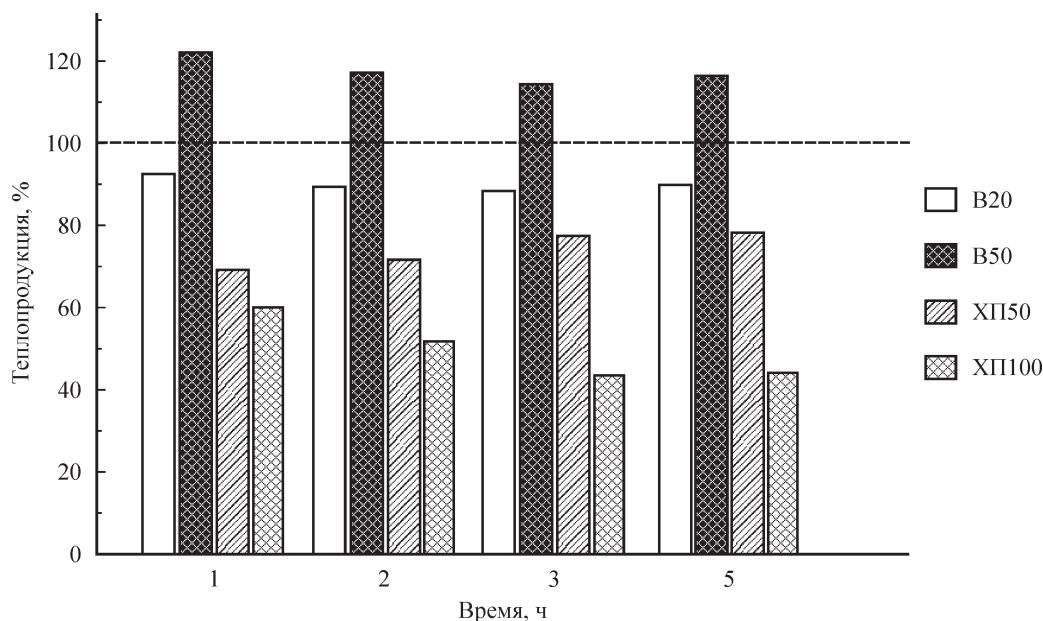


Рис. 4. Теплопродукция отсеченных корней в присутствии валиномицина и хлорпромазина. За 100 % принято тепловыделение в контрольном варианте.

Fig. 4. Heat production by excised roots with valinomycin and chlorpromazine.

Ordinate axes — heat production, % heat release in control sample was taken as 100 %.

ции, требующих дополнительного расхода энергии. Одним из кардинальных физиологических процессов, осуществляющих энергетическое и субстратное обеспечение ответных и адаптивных реакций, является дыхание. Энергетическая регуляция функционального состояния организма и различных подсистем в процессе адаптации направлена на минимизацию дополнительных затрат энергии и восстановление стационарного состояния. При воздействии валиномицина наблюдалось увеличение интенсивности дыхания корней в течение 5 ч инкубации. Причем усиление дыхания, так же как изменения мембранных характеристик, было более значительным при инкубации корней с B50 и коррелировало с увеличением тепловыделения. Очевидно, что чем в большей степени количество поставляемой дыханием энергии превышает теплоотдачу, тем большим запасом свободной энергии располагает живая система (для эндотермических процессов) (Жолкевич, 1968). Усиление потребления кислорода, увеличение теплопродукции в течение 5 ч инкубирования отсеченных корней, а также увеличение МП клеток, лабильного компонента системы регулирования ионного транспорта, непосредственно зависящего от энергетического статуса клеток, свидетельствуют о том, что клетки активно противостоят многочасовому воздействию специфического  $K^+$ -ионофора валиномицина посредством компенсаторной активации  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы и усиления  $K^+/H^+$ -обмена, способствующими энергозависимой регуляции рН цитоплазмы и восстановлению  $H^+$ -градиента на мембране.

В наших экспериментах XP50 и XP100, так же как валиномицин, вызвали усиление выхода  $K^+$  из клеток в первые 2 ч инкубации отсеченных корней. Сравнение показателей, характеризующих изменение свойств плазмалеммы в начальный период воздействия (МП клеток, содержание  $K^+$  в среде инкубации и ее рН), свидетельствует о более сильном действии XP50, чем B50, а также

о существенном увеличении ионной проницаемости плазмалеммы клеток отсеченных корней под влиянием XP100. То есть ранние ответные реакции клеток отсеченных корней на воздействие специфического  $K^+$ -ионофора валиномицина и ксенобиотика ХП, обладающего сильным мембранотропным эффектом, характеризуются однонаправленными изменениями мембранных показателей клеток, различающихся по величине. Они свидетельствуют о нарушении ионного гомеостаза клеток, более существенном под влиянием XP100.

Как уже отмечалось, важную роль в поддержании гомеостаза и устойчивости растительных клеток играют транспортные АТФазы плазмалеммы, которые активизируются при стрессе. Активность  $H^+$ -АТФазы *in vivo* может регулироваться различными факторами. В регуляции активности  $H^+$ -АТФазы и  $H^+$ -проводимости плазмалеммы при различных воздействиях на растительные клетки участвуют механизмы, чувствительные к изменению концентрации  $H^+$  и  $Ca^{2+}$  в цитоплазме. Кроме уже отмеченного стимулирующего влияния выхода  $K^+$  в среду одним из факторов, оказывающих быстрое и неспецифическое влияние на  $H^+$ -АТФазу плазмалеммы, является изменение фазово-структурного состояния мембраны через изменение липидного состава и текучести мембран (Cooke, Burden, 1990).

Регуляторная цепь системы восприятия, передачи сигнала и регуляции ответа может индуцироваться химическими реагентами, в частности ХП, который взаимодействует с полярными группами мембранных липидов и вызывает изменение текучести мембран и уровня свободного кальция в цитоплазме. При увеличении текучести мембран происходит экспрессия генов, кодирующих белки, которые, связываясь с липидами, могут предотвращать дезинтеграцию мембран (Лось, 2001). Кроме того, известно, что состояние липидного компонента плазмалеммы в значительной степени определяет ее ион-

ную проницаемость и величину отрицательного поверхностного потенциала, от которого зависят уровень окисления SH-групп мембранных белков, а также функционирование редокс-систем, генерирующих супероксид и  $H_2O_2$  (Веселова и др., 1993). В регуляции прооксидантно-антиоксидантного равновесия в клетках значительная роль отводится ионам кальция, которые могут способствовать повышению активности антиоксидантных ферментов при стрессе, а также индуцировать синтез ряда белков с антиоксидантными свойствами (Колупаев и др., 2005). Степень изменения липидного компонента плазмалеммы и уровня свободного кальция в цитоплазме при воздействии ХП50, по-видимому, находится в пределах, когда подобные механизмы могут быть реализованы. Под влиянием ХП100 наблюдались не только снижение МП клеток и усиление потери калия корнями, но и увеличение продукции супероксида уже на ранних этапах воздействия (Алексеева и др., 2005), что является показателем смещения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Об активации ПОЛ и существенном мембранотропном эффекте ХП100 свидетельствуют полученные нами ранее данные об устранении вызванных им структурно-функциональных изменений клеток корней витамином Е, обладающим антиоксидантными и стабилизирующими мембраны свойствами (Польгалова и др., 1982). Известно, что в случае значительного усиления ПОЛ влияние его продуктов может происходить путем нарушения липидной регуляции активности мембранных АТФаз и их прямого окисления, а также торможения транспортной функции  $H^+$ -АТФазы посредством нарушения проницаемости бислоя липидов (Палладина, 1999).

Ранее нами было показано, что в условиях существенного «возмущения» ионного гомеостаза клеток и нарушения структурной организации плазмалеммы уже на ранних этапах ответной реакции (спустя 2 ч инкубации отсеченных корней в среде с ХП100) АТФазная активность на плазмалемме не выявлялась, а локализовалась на тонопласте, мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) и в цитоплазме (Чернышева и др., 2004). «Перемещение» АТФазной активности внутрь клетки свидетельствует о подключении этих структур к гомеостатической регуляции содержания  $H^+$ ,  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  в цитозоле (Diaz de Leon, Win, 1985; Brauer et al., 1995; Walker et al., 1996). Существенное «возмущение» ионного гомеостаза клеток, в том числе кальциевого, в присутствии ХП100, а также блокирование АТФаз и нарушение структурной организации плазмалеммы исключают участие последней в процессах регулирования ионного гомеостаза клеток на ранних этапах ответной реакции.

Изменения мембранных характеристик клеток корней при 5-часовом воздействии ХП свидетельствуют о том, что в случае действия ХП50, так же как и В50, происходит частичное восстановление ионного гомеостаза клеток: увеличивается МП клеток, снижаются выход  $K^+$  и рН среды (по сравнению с 2-часовой инкубацией). Восстановление мембранных характеристик клеток при длительном действии ХП50 обусловлено тем, что данная доза ксенобиотика, по-видимому, лишь частично нарушает регулирование ионного транспорта через плазмалемму и рабочий исполнительный аппарат (Александров, 1985). Изменение соотношения зарядов, жидких и плотных частей в мембране (текучести) вследствие взаимодействия ХП50 с кислыми фосфолипидами, мембран-

ными белками и вытеснения  $Ca^{2+}$  не достигает, по-видимому, критического уровня, когда мембрана «насыщается». Известно, что значительная роль в процессах адаптации принадлежит биосинтезу структурных липидов и изменениям текучести мембран, связанным в основном с содержанием стероидов (Игнатов и др., 1982). В ряде работ имеются сведения об изменении липидного состава мембран растений в ответ на стрессорные воздействия (Лыгин и др., 1995; Алексеева и др., 1999). Изменение в мембране соотношения стероидов и полярных липидов может менять ее молекулярную структуру и физиологические функции (Wang, Faust, 1988). Изменение уровня свободного кальция в цитоплазме клеток корней под влиянием ХП50 могло оказать влияние на синтез структурных липидов, поскольку  $Ca^{2+}$  является посредником в транслокации внешнего сигнала в геном (Braam, Davis, 1990). Частичное восстановление ионного гомеостаза клеток корней при длительном действии ХП50 может быть связано с синтезом структурных липидов плазмалеммы с определенными характеристиками, способствующими поддержанию ее микровязкости. При 5-часовом воздействии ХП100 выход  $K^+$  в среду инкубации увеличивается, а МП клеток не восстанавливается. Усиление мембранотропного эффекта ХП100 со временем обусловлено повреждением плазмалеммы вследствие «пересыщения» данным соединением и поломки не только механизмов регулирования ионного транспорта, но и рабочего исполнительного аппарата (АТФаз), что вызывает неконтролируемый транспорт ионов через плазмалемму.

Изменения энергетических процессов, обеспечивающих поддержание ионного гомеостаза клеток, также зависят от степени его нарушения. В первые 1—3 ч воздействия ХП50 наблюдалась слабая стимуляция потребления  $O_2$  отсеченными корнями, а ХП100 ингибировал дыхание. Подавление дыхания корней ХП100 вызвано существенным нарушением ионного гомеостаза и структурной организации плазмалеммы и связано, по-видимому, со значительной потерей клетками  $K^+$  и поступлением протонов в цитоплазму. Показано, что при понижении концентрации  $K^+$  и уменьшении рН цитоплазмы происходит подавление дыхания, обусловленное влиянием катионов на оксидоредуктазные реакции дыхательной цепи митохондрий (Самуилов, Хакимов, 1991). И в наших экспериментах не исключено подобное опосредованное влияние ХП100 на дыхательную цепь митохондрий на начальных этапах ответной реакции клеток. Увеличение подавления дыхания корней ХП100 к 3 ч инкубации связано, по-видимому, с проникновением ХП внутрь клеток и обусловлено неспецифическим ингибированием митохондриальных и гликолитических ферментных систем. На выделенных митохондриях и тканевых препаратах животных тканей показано, что ингибирующее влияние ХП на окисление НАД-зависимых субстратов и янтарной кислоты связано с их специфическим взаимодействием с изоаллоксазиновым кольцом флавопротеида и с активными центрами связывания кальция (Кондрашова и др., 1974). Изменения липидной фазы плазмалеммы под влиянием ХП50 не вызывают критических нарушений ионного гомеостаза клеток, а рН цитоплазмы находится, по-видимому, в пределах величин, когда возможно повышение функции (путем снятия регулирующего тормоза) через активацию АТФаз плазмалеммы, тонопласта и стимуляцию дыхания. При более длительной инкубации корней в среде с ХП50 сти-

муляция дыхания увеличивалась, а при действии ХП100 ингибирование сменялось стимуляцией, однако не происходило частичного восстановления мембранных характеристик и уровня тепловыделения, как это имело место при длительном действии ХП50. Стимуляция дыхания при длительном действии ХП50 не сопровождалась увеличением выхода  $K^+$  из клеток и поэтому не связана с разобщением в результате усиления мембранотропного эффекта, как в случае ХП100. Стимуляция дыхания при длительном действии ХП может быть связана с эффектом разобщения (ХП100), возрастанием энергетических затрат на поддержание ионного гомеостаза, а также с детоксикацией этого ксенобиотика при участии электронно-транспортной цепи ЭР и других ферментных окислительных систем, в частности аминоксидаз (Арчаков, 1975), что подтверждается изменениями ультраструктуры клеток.

Ранее было показано (Полыглова и др., 1982), что изменения ЭР, связанные с аккумулярованием ионов и активированием ферментных систем, осуществляющих окисление ксенобиотиков, были более выражены под влиянием ХП100, а изменения структуры митохондрий, которым принадлежит важная роль в поддержании ионного гомеостаза клеток и которые могут выполнять роль временных резервуаров для накопления ионов, в частности  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ , были различными. Набухание митохондрий и просветление их матрикса, которое было отмечено при воздействии ХП50, наблюдается при действии различных повреждающих факторов и считается ответной реакцией клеток на нарушение ионного гомеостаза. Митохондрии клеток корней, инкубированных с ХП100, не были набухшими через 2—3 ч, что может быть связано с проникновением ХП, поскольку при непосредственном действии ксенобиотиков на первый сегмент дыхательной цепи митохондрий их способность связывать и удерживать кальций нарушается (Кондрашова и др., 1974). Кроме того, наблюдались изменения цитоплазмы и клеточных структур, в том числе ядра и аппарата Гольджи, свидетельствующие о развитии апоптоза клеток (Чернышева и др., 2004), что, по-видимому, связано с изменениями физических свойств липидной фазы плазмалеммы уже на ранних этапах ответной реакции клеток. Длительное воздействие ХП100 приводит к разрушению и гибели значительной части клеток.

Ионный гомеостаз является ключевым компонентом пути адаптации клеток в условиях стресса. При недостаточном снабжении энергией разрегулированное передвижение ионов представляет непосредственную опасность для клетки. При нарастании накопления свободного внутриклеточного кальция, а также снижении рН цитоплазмы и содержания  $K^+$  способность клеток к адаптивным реакциям подавляется, и основную роль начинают играть каталитические процессы (Суббайя, Сакс, 2003).

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что усиление потери ионов калия отсеченными корнями под влиянием мембраноактивных соединений коррелировало со снижением МП клеток и сопровождалось изменениями дыхания и теплопродукции, различающимися по направлению и величине. Различия в изменении этих показателей обусловлены особенностями механизмов действия мембраноактивных соединений и степенью нарушения ими ионного гомеостаза клеток. Снижение мембранных характеристик клеток под влиянием специфического  $K^+$ -ионофора валиномицина, не оказывающего дезорганизующего влияния на регулятор-

ные системы плазмалеммы, сопровождалось усилением интенсивности дыхания. В присутствии В50 более значительное увеличение интенсивности дыхания отсеченных корней, связанное с компенсаторной активацией  $H^+$ -АТФазы, сопровождалось увеличением скорости теплопродукции. Увеличение мембранных характеристик клеток, коррелирующее с усилением интенсивности дыхания и теплопродукции при длительном воздействии валиномицина, свидетельствует о частичном восстановлении ионного гомеостаза клеток и преобладании адаптивных реакций, сопряженных с затратами энергии.

Степень изменений мембранных характеристик (увеличение потери  $K^+$  корнями и снижение МП клеток) и энергетические затраты (увеличение интенсивности дыхания и снижение теплопродукции) в начальный период под влиянием ХП50 были больше, чем в присутствии В50. Это обусловлено сильным мембранотропным эффектом ХП и связано, по-видимому, с широким спектром систем и клеточных структур, вовлеченных в формирование ответных реакций клеток. Усиление дыхания и увеличение уровня теплопродукции при длительном действии ХП50, сопряженные с частичным восстановлением ионного гомеостаза клеток, свидетельствуют о том, что клетки активно противостоят данному воздействию. Существенное снижение МП клеток и значительная потеря ими калия под влиянием ХП100, вызванные нарушением липидной фазы и систем регулирования транспортных процессов плазмалеммы, уже на ранних этапах ответной реакции клеток сопровождалась подавлением дыхания и теплопродукции. Несмотря на интенсивную работу митохондрий и подключение к гомеостатической регуляции содержания ионов в цитоплазме внутриклеточных структур и процессов, связанных с активацией систем обезвреживания, энергетические ресурсы клеток недостаточны для устранения повреждающего действия ХП100. Изменения структурно-функциональных характеристик клеток отсеченных корней при длительном воздействии ХП100 свидетельствуют об истощении энергетических ресурсов клеток и преобладании катаболических процессов.

#### Список литературы

- Александров В. Я. 1985. Реактивность клеток и белки. Л.: Наука. 318 с.
- Алексеева В. Я., Гордон Л. Х., Колесников О. П., Ценцевичкий А. Н. 2005. Влияние модуляторов ионной проницаемости плазмалеммы на биоэлектрические характеристики клеток корней пшеницы и продукцию ими супероксидного аниона. Цитология. 47 (7) : 578—583.
- Алексеева В. Я., Лыгин А. В., Гордон Л. Х., Николаев Б. А. 1999. Изменение липидного состава корней пшеницы при модификации кальцием клеточной поверхности. Физиол. биохим. культ. раст. 31 (6) : 440—446.
- Арчаков А. И. 1975. Микросомальное окисление. М.: Наука. 327 с.
- Веселова Т. В., Веселовский В. А., Чернавский Д. С. 1993. Стресс у растений. М.: МГУ. 144 с.
- Гордон Л. Х., Минабаева Ф. В., Рахматуллина Д. Ф., Алябьев А. Ю., Лосева Н. Л., Николаев Б. А. 1995. Термогенез корней клеток пшеницы при модификации функциональной активности плазмалеммы и детоксикации ксенобиотиков. Докл. РАН. 341 (5) : 972—981.
- Жолкевич В. Н. 1968. Энергетика дыхания высших растений в условиях водного дефицита. М.: Наука. 230 с.
- Игнатов С. Г., Андреева А. В., Евдокимова О. А., Арциатбапов В. Ю., Перельгин В. В., Капрельяни А. С., Островский Д. Н.

1982. Изучение репарации повреждений мембранного аппарата, вызванных низкотемпературным замораживанием клеток *E. coli*. Биохимия. 47 (10) : 1621—1628.

Колупаев Ю. А., Акинина Г. Е., Мокроусов А. В. 2005. Индукция теплоустойчивости колеоптилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом. Физиол. раст. 52 (2) : 227—232.

Кондрашова М. Н., Ахмеров Р. Н., Акоев И. Г., Каминский Ю. Г., Лабас Ю. А., Суворов Н. Н., Орлова Л. М., Маевский Е. И. 1974. О регуляции соотношения окисления янтарной кислоты и НАД-зависимых субстратов производными индола. Митохондрии. В кн.: Регуляция процессов окисления и сопряжения. М.: Наука. 145—163.

Лось Д. А. 2001. Восприятие сигналов биологическими мембранами: сенсорные белки и экспрессия генов. Сорос. образов. журн. 7 (9) : 14—22.

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

Медведев С. С. 2005. Кальциевая сигнальная система растений. Физиол. раст. 52 (2) : 282—305.

Опритов В. А., Калинин В. А., Пятыгин С. С., Орлова О. В., Абрамова Н. Н. 1999. Увеличение потенциалчувствительности АТФазной активности плазмалеммы при холододомо закаливании проростков пшеницы. Физиол. раст. 46 (1) : 153—158.

Орлов С. Н. 1987. Кальмодулин. Общие проблемы физико-химической биологии. М.: ВИНТИ. 8: 212 с.

Палладина Т. А. 1999. Роль протонных насосов плазмалеммы и тонопласта в устойчивости растений к солевому стрессу. Успехи соврем. биол. 119 (5) : 451—461.

Полягалова О. О., Сафина Г. Ф., Гордон Л. Х., Алексеева В. Я. 1982. Ультраструктура и дыхательная активность клеток корня при действии аминазина. Цитология. 24 (10) : 1160—1165.

Самуилов В. Д., Хакимов С. А. 1991. Зависимость дыхания клеток *Bacillus subtilis* от одновалентных катионов. Биохимия. 56 (7) : 1209—1214.

Суббайя Ч. С., Сакс М. М. 2003. Опосредованные кальцием реакции растений кукурузы на аноксию. Физиол. раст. 50 (6) : 841—851.

Тарчевский И. А. 2002. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука. 294 с.

Чернышева Ф. А., Алексеева В. Я., Полягалова О. О., Гордон Л. Х. 2004. Локализация АТФазной активности, дыхание и ультраструктура клеток корней пшеницы при модуляции уровня ионной проводимости плазмалеммы. Цитология. 46 (3) : 221—228.

Alekseeva V. Ya., Gordon L. K., Tsensevitsky A. N., Loseva N. L., Rakhimova G. G., Chernysheva F. A. 2004. Heat production and respiration of wheat roots under the modulation of plasma membrane ion conductivity. Termochimica acta. 422: 105—108.

Bhatnagar K., Singh V. P. 2003. Ca<sup>2+</sup>-dependence and inhibition of transformation by trifluoperazine and chlorpromazine in *Thermoactinomyces vulgaris*. Curr. Microbiol. 46 : 265—269.

Bhattacharyya D., Sen P. C. 1999. The effect of binding of chlorpromazine and chloroquine to ion transporting ATPases. Mol. Cell. 60 : 357—364.

Braam J., Davis R. W. 1990. Rain, wind and touch-induced expression of calmodulin-related genes in Arabidopsis. Cell. 60 : 357—364.

Brauer D., Ulkuaes J., Triana R., Shacher-Hill Y., Tu S. I. 1995. Effects of bafilomycin A and metabolic inhibitors on the maintenance of vacuolar activity in maize roots hair cell. Plant Physiol. 108 : 641—649.

Chandra S., Heistein P. F., Low P. S. 1996. Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. Plant Physiol. 110 : 979—986.

Couke D. T., Burden R. S. 1990. Lipid modulation of plasma membrane bound ATPases. Physiol. Plant. 78: 153—159.

Diaz de Leon J. L., Wyn Jones R. G. 1985. Biochemistry and function. In: Vacuolar adenosin-triphosphatase fungi and plants. Berlin. 56—66.

Grouzis J.-P., Gibrat R., Rigaut J., Ageorges A., Grignon C. 1990. Potassium stimulation of corn root plasmalemma ATPase. I. Hydrolytic activity of native vesicles and purified enzyme. Plant Physiol. 93 : 1175—1182.

Hansen L. D., Hopkin M. S., Griddle R. S. 1997. Plant calorimetry: a window to plant physiology and ecology. Thermochemica acta. 300 : 183—197.

Kemp R. V., Guan Y. 1998. Determination of reaction energy values for biological pyrite oxidation by calorimetry. Thermochemica acta. 309 : 63—78.

Morsomme P., Boutry M. 2000. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. Biochim. biophys. acta. 1465 : 1—16.

Palmgren M. G. 2001. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: powerhouses for nutrient uptake. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 817—845.

Slayman S. L. 1987. The plasma membrane ATPase of *Neurospora*: a proton pumping electroenzyme. J. Bioenerg. Biomembr. 19 : 1—20.

Walker D. J., Leingh R. A., Miller A. J. 1996. Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 10 510—10 514.

Wang S. Y., Faust M. 1988. Changes of fatty acids and sterols in apple buds during bud break induced by a plant bioregulator thidiazuron. Physiol. Plant. 72 : 115—120.

Zheng H. L., Zhao Z. Q., Zhang C. G., Feng J. Z., Ke Z. L., Su M. I. 2000. Changes in lipid peroxidation, the redox system and ATPase activities in plasma membranes of rice seedling roots caused by lanthanum chloride. Biometal. 13 : 157—163.

Поступила 30 IX 2005

#### EFFECT OF PLASMA MEMBRANE ION PERMEABILITY MODULATORS ON RESPIRATION AND HEAT PRODUCTION OF WHEAT ROOTS

V. Ya. Alekseeva,<sup>1</sup> L. K. Gordon, N. L. Loseva, G. G. Rakhimova, A. N. Tsensevitsky

Kazan' Institute of Biochemistry and Biophysics RAS;

<sup>1</sup> e-mail: alekseeva@mail.knc.ru

A study was made of changes in the rates of respiration, heat production, and membrane characteristics in cells of excised roots of wheat seedlings under the modulation of plasma membrane ion permeability by two membrane active compounds: valinomycin (20 μM (V50)) and chlorpromazine (50 μM (CP50) and 100 μM (CP100)). Both compounds increased the loss of potassium ions, which correlated with the lowering of membrane potential, rate of respiration, and heat production after a 2 h exposure. The differences in alteration of these parameters were due to specific action of either compound on the membrane and to the extent of ion homeosta-



sis disturbance. V20 had a weak effect on the studied parameters. V50 caused an increase of the rate of respiration and heat production, which enhanced following a prolonged action (5 h) and were associated with ion homeostatis restoration. The extent of alteration of membrane characteristics (an increase of potassium loss by roots, and lowering of cell membrane potential) as well as energy expense under the action of CP50 during the first period were more pronounced than in the presence of V50. During a prolonged action of CP50, the increase of respiration intensity and heat production correlated with partial recovery of ion homeostatis in cells. Essential lowering of membrane potential and substantial loss of potassium by cells, starting from the early stages of their response reaction, were followed by inhibition of respiration rate and heat production. Alterations of the structure and functional characteristics of excised root cells indicate the intensification of the membrane-tropic effect of a prolonged action of CP100, and the lack of cell energy resources.

---