

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ ПРОТОННОЙ ПОМПЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПИРЕТРОИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ

Е.Н. Крытынская, О.Г. Яковец, А.И. Соколик, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ВВЕДЕНИЕ

В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ ПРОИЗВОДСТВО ПЕСТИЦИДОВ – ОДНА ИЗ НАИБОЛЕЕ МОЩНЫХ ОТРАСЛЕЙ СОВРЕМЕННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ. НАРЯДУ С КОЛИЧЕСТВЕННЫМ РОСТОМ НЕПРЕРЫВНО РАСШИРЯЕТСЯ АССОРТИМЕНТ ПЕСТИЦИДОВ. БЕСПРЕРЫВНО ПОЯВЛЯЮТСЯ СООБЩЕНИЯ О ВСЕ НОВЫХ И НОВЫХ ПЕСТИЦИДАХ [1].

В этой связи живые организмы подвергаются огромному «пестицидному прессу». Возникла острая необходимость снижения негативного действия пестицидов на флору и фауну. С этой целью на современном этапе во всем мире стоит задача разработки препаратов высокой активности в низких дозах (граммы на 1 га), невысокой опасности для теплокровных животных, полезной флоры и фауны. Кроме того, препараты должны разрушаться в течение одного периода вегетации и не оставлять токсичных остатков в окружающей среде [1].

Для создания таких пестицидов необходимо детальное изучение их действия на защищаемое растение, и в первую очередь на первичную мишень их действия – плазматическую мембрану. Вообще, биологические мембраны весьма чувствительно реагируют на действие экзогенных химических агентов через изменения своих функциональных и структурных свойств [2] Специфичность действия химических агентов зависит от их избирательного связывания с мембраной, избирательная проницаемость которой определяется наличием пассивных и активных транспортных систем.

Для плазматической мембраны растительной клетки характерна «протонная энергетика», которая связана с работой H^+ -АТФазной помпы. Поэтому одной из задач при детализации мембранотропного действия инсектицидов является выявление их модифицирующего действия на функционирование протонной помпы.

Методы исследования

При изучении мембранотропного действия различных химических соединений важное значение имеет прижизненный контроль наблюдаемых эффектов *in vivo*. В настоящей работе это достигается использованием микроэлектродной техники [3,4] и метода ионселективной электрометрии [5]. В качестве объектов исследования служили интернодальные клетки пресноводной харовой водоросли *Nitella flexilis* и интактные проростки ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта «Сталы». Используемая в настоящей работе культура водоросли выращивалась в лабораторных условиях в среде следующего состава (моль/л): 10^{-4} KH_2PO_4 , $4 \cdot 10^{-3}$ $CaCl_2$, 10^{-3} $NaHCO_3$, 10^{-4} $Mg(NO_3)_2$, pH 7,2. Обеспечивался постоянный цикл освещения – 12 часов свет/12 часов темнота. Выращивание проростков ячменя проводили в течение 7-8 суток в темноте в рулонах, которые помещали в раствор 10^{-4} моль/л $CaSO_4$ [6].

Клетки *Nitella flexilis* представляет собой удобную модель автотрофных фотосинтезирующих тканей растений, жизненно важные системы мембранного транспорта минеральных веществ которых аналогичны таковым у клеток корневой системы растений [7]. Для клеток корневой системы проростков характерно гетеротрофное питание.

Сравнение электрофизиологической реакции плазматической мембраны на действие выбранных инсектицидов двух объектов, позволяет, с одной стороны, выявить особенности в закономерностях химически индуцируемых сдвигов транспортно-барьерных характеристик, с другой, показать различия в первичном действии инсектицидов для клеток с гетеротрофным и автотрофным типами питания.

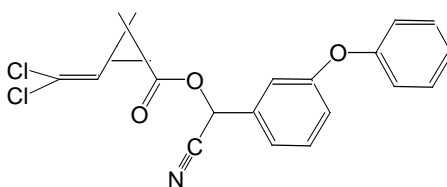
Базовым раствором в экспериментах с *Nitella flexilis* служил раствор искусственной прудовой воды (ИПВ) состава (моль/л): 10^{-4} KCl, 10^{-3} NaCl, 10^{-4} CaCl₂, значения pH которого поддерживалось с помощью буферной системы ТРИС-HCl на уровне $7,0 \pm 0,1$. В экспериментах по регистрации ацидофицирующей активности корней проростков ячменя использовался раствор состава 10^{-4} моль/л CaSO₄ + 10^{-3} моль/л KCl [8]. Экспериментальные растворы готовились путем добавления к базовым растворам соответствующего количества 1% спиртового раствора инсектицида. Добавление инсектицидов производили в темноте.

В ходе электрофизиологических экспериментов эффект инсектицидов оценивали по биоэлектрической реакции клеток и на основании снятых мгновенных вольт-амперных характеристик (МВАХ) в ответ на переход темнота-свет, так как протонная помпа плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis* активируется при их освещении. МВАХ регистрировали после достижения током стационарного значения. Регистрация производилась при ступенчатой смене потенциала в стороны гипер- и деполяризации от уровня потенциала фиксации -180 мВ с шагом 20 мВ. Исходя из полученных МВАХ помпы оценивали следующие показатели: величину ионных токов, проводимость в точке нулевого тока (ТНТ), величину и направление смещения потенциала реверсии тока (ПРТ).

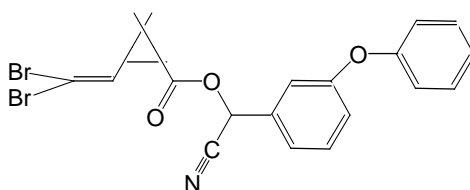
Измерения ацидофицирующей активности корней проводились при pH 6,8 в течение 60-80 минут путем ионометрического титрования контрольной и экспериментальных сред $5,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л раствором NaOH.

Результаты и обсуждение

Для выявления влияния на протонную помпу пиретроидных инсектицидов протестированы коммерческие препараты Децис, 12% (действующее вещество – дельтаметрин) и Алметрин, 25% (действующее вещество – циперметрин) в концентрациях 10^{-7} , $5,0 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , $1,5 \cdot 10^{-5}$ и $2,5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} моль/л (по действующему веществу). Химическое строение дельтаметрина и циперметрина отличается наличием в их молекуле разных галогенов-заместителей (рис.1).



Циперметрин



Дельтаметрин

Рисунок 1 – Строение молекул испытанных инсектицидов

При освещении клеток под действием низких концентраций циперметрина ($5,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л) наблюдали незначительное по сравнению с контролем увеличение фотоиндуцированной гиперполяризации (рис. 2). В присутствии циперметрина в концентрации 10^{-5} моль/л происходило ингибирование фотоиндуцированной гиперполяризации плазмалеммы. С увеличением концентрации данного инсектицида в среде до $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л степень подавления фотоиндуцированных изменений разности электрических потенциалов плазматической мембраны изменялась незначительно. Полное подавление светостимулируемой H^+ -АТФазной помпы с сохранением жизнеспособности клеток наблюдалось в присутствии $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л циперметрина; концентрация 10^{-4} моль/л вызывала гибель клеток.

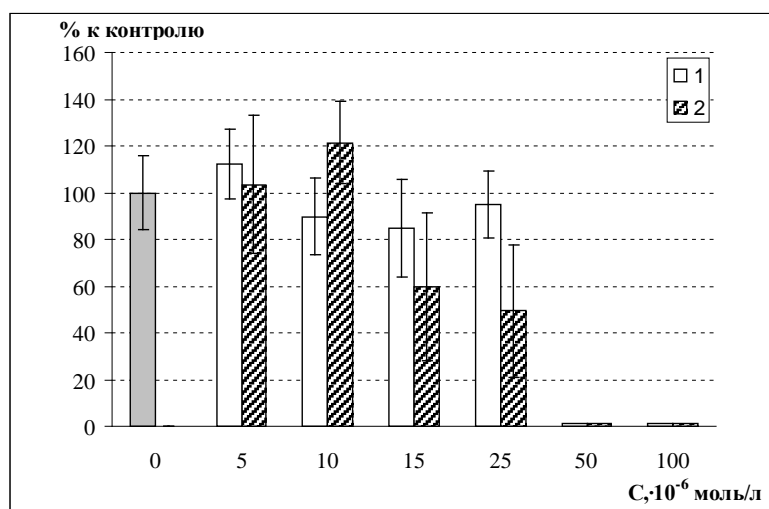


Рисунок 2 – Зависимость фотоиндуцированной гиперполяризации от наружной концентрации инсектицидов группы синтетических пиретроидов:
1- циперметрина и 2- дельтаметрина

Из анализа полученных МВАХ протонной помпы установлено, что циперметрин в концентрации $5,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л увеличивал по сравнению с контролем величину входящего и выходящего ионных токов, смещал ПРТ в сторону деполяризации и вызывал некоторую активацию проводимости в ТНТ (рис.3). В концентрации 10^{-5} моль/л наблюдали снижение величины выходящего тока МВАХ помпы, смещение ПРТ в сторону деполяризации и уменьшение проводимости в ТНТ.

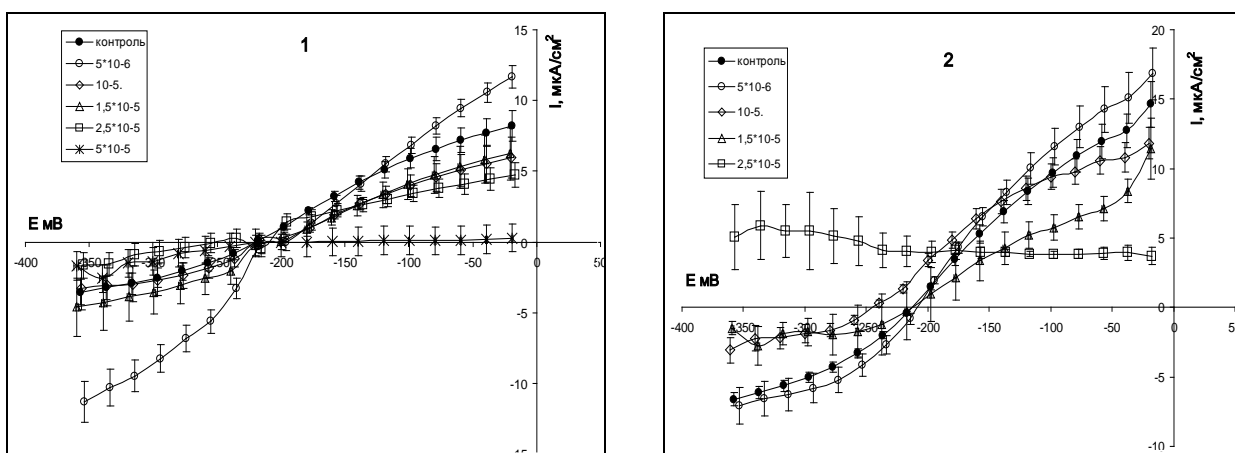


Рисунок 3 – Модификация МВАХ H^+ -АТФазной помпы клеток *Nitella flexilis* под действием циперметрина (1) и дельтаметрина (2)

В концентрациях $1,5 \cdot 10^{-5}$ и $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л циперметрин проявлял однотипный эффект, который заключался в уменьшении выходящих токов, смещении ПРТ в сторону деполяризации и ингибировании проводимости в ТНТ в среднем на 30% и 50% соответственно. При исследовании концентрационных зависимостей модификации циперметрином показателей светоактивации H^+ -АТФазы было установлено, что практически полное ингибирование проводимости протонной помпы наблюдалось уже при его концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л в среде (рис. 4), при которой происходило наибольшее смещение ПРТ в сторону деполяризации и снижение величины как входящего, так и выходящего ионных токов.

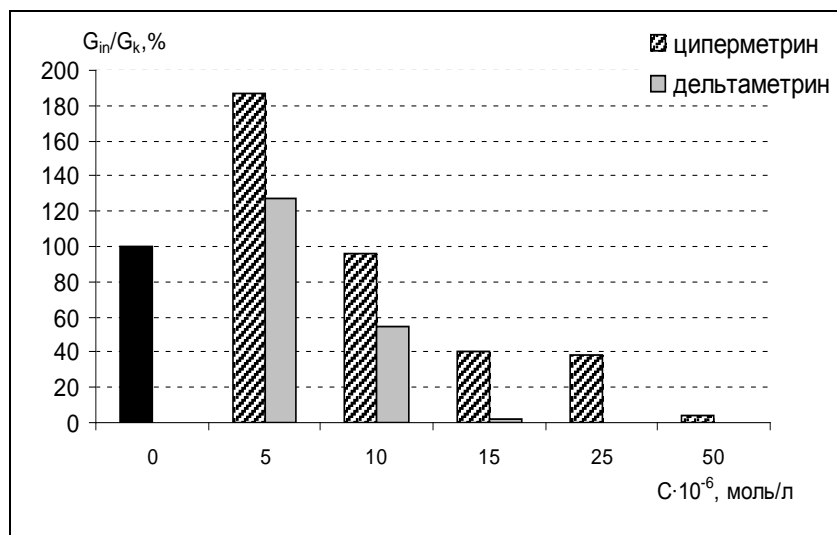


Рисунок 4 – Изменение проводимости H^+ -АТФазной помпы плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis* в точке нулевого тока в зависимости от концентрации инсектицидов группы синтетических пиретроидов

Экспозиции клеток в низкой концентрации ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л) дельтаметрина приводила к незначительному росту фотоиндуцированной гиперполяризации плазмалеммы (см. рис. 2). Увеличение содержания его в среде до 10^{-5} моль/л сопровождалось ростом величины фотоиндуцируемой гиперполяризации плазмалеммы. При концентрациях $(1,5-2,5) \cdot 10^{-5}$ моль/л наблюдалось ингибирование, возрастающее с увеличением действующей концентрации дельтаметрина. Полное подавление светостимулируемой H^+ -АТФазной помпы с сохранением жизнеспособности клеток зафиксировано в присутствии $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л дельтаметрина. Летальной для клеток была концентрация 10^{-4} моль/л.

Анализ МВАХ показал, что под влиянием дельтаметрина, аналогично циперметрину, происходила зависящая от концентрации модификация электрофизиологических параметров как по их величине, так и по направлению (см. рис. 3). Так, если в концентрации $5,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л дельтаметрин увеличивал по сравнению с контролем входящий и выходящий ионные токи МВАХ помпы, практически не смещал ПРТ и активировал проводимость помпы, то с ростом его концентрации до 10^{-5} моль/л величина ионных токов уменьшалась, ПРТ смещался в сторону гиперполяризации и наблюдалось уменьшение проводимости в ТНТ в среднем на 5-10% (см. рис. 4). Экспозиция клеток в растворах 10^{-5} – $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л дельтаметрина характеризовалась монотонным возрастанием ингибирующего эффекта: в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л инсектицид полностью подавлял работу H^+ -АТФазы плазмалеммы.

Полученные результаты свидетельствуют о функциональных перестройках протонной помпы плазматической мембраны растительной клетки при действии пиретроидных инсектицидов. С ростом концентрации тестируемых препаратов в среде характер их действия изменяется: низкие концентрации приводят к некоторой активации

помпы (пиретроиды при освещении клетки индуцировали дополнительную проводимость); высокие концентрации ($2,5 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) полностью подавляют активность H^+ -АТФазы плазмалеммы. Особенность действия инсектицидов заключается в полном подавлении активности H^+ -помпы плазмалеммы клеток *Ntella flexilis* при сохранении их жизнеспособности. Для циперметрина такая концентрация составляет $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л, для дельтаметрина – $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Более того, на основании оценки концентрации инсектицидов, вызывающей 50%-ное ингибирование активности протонной помпы, установлено, что наиболее сильным модифицирующим эффектом по отношению к данной транспортной системе плазмалеммы клеток харовой водоросли обладает дельтаметрин по сравнению с циперметрином.

В большинстве экспериментов, проведенных на корнях проростков ячменя, внесение в наружную среду циперметрина в концентрации 10^{-6} моль/л незначительно уменьшало скорость ацидофикации (рис. 5). Дальнейшее увеличение наружной концентрации пиретроида до 10^{-5} и 10^{-4} моль/л приводило к увеличивающейся активации выхода протонов.

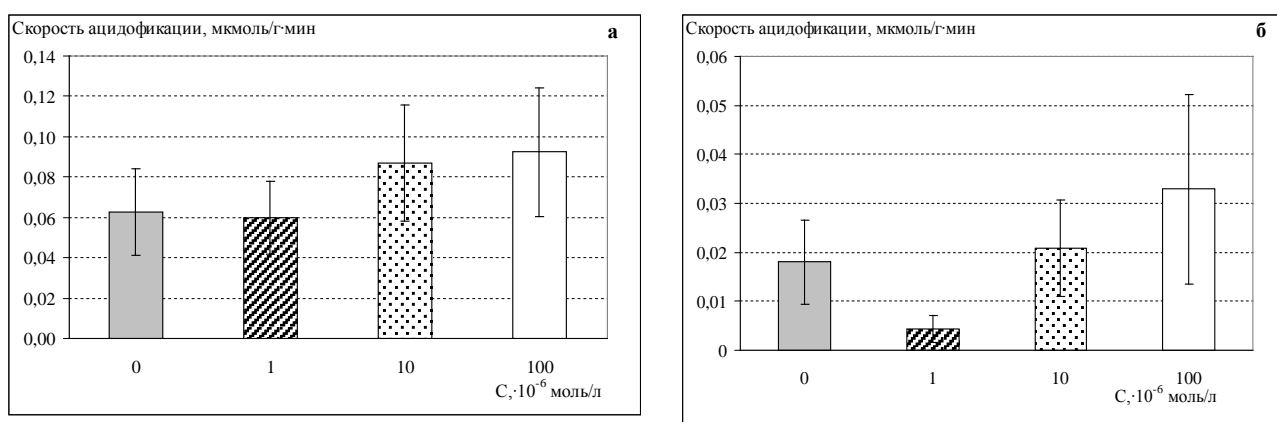


Рисунок 5 – Зависимость скорости ацидофикации наружной среды корнями проростков ячменя сорта "Сталы" от концентрации в наружной среде циперметрина (а) и дельтаметрина (б)

Дельтаметрин в аналогичных концентрациях оказывал сходное действие на ацидофицирующую активность корней проростков ячменя (см рис.5). Однако, в концентрации 10^{-6} моль/л в отличие от циперметрина заметно снижал скорость подкисления наружной среды (более, чем в 2 раза). При переходе от концентрации 10^{-5} к 10^{-4} моль/л дельтаметрин индуцировал относительно большой рост скорости ацидофикации. Наблюдаемый эффект, вероятно, может быть обусловлен наличием в молекулах тестируемых пиретроидов атомов разных галогенов. Известно, что токсичность органических соединений возрастает по мере включения в их молекулу галогенов (Cl, Br, I), при этом хлорсодержащие – являются наиболее сильнодействующими [8, 9]. В наших экспериментах большей активностью обладал дельтаметрин, содержащий 2 атома брома. Дельтаметрин представляет собой (1R) –цис-3-(2,2-дибромвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты (S)-3-фенокси- α -цианобензиловый эфир, циперметрин-(1RS)-цис, транс-3-(2,2-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты (RS)-3-фенокси- α -цианобензиловый эфир. Следовательно, более существенную роль в активности инсектицида будет играть цис-транс-изомерия его молекулы.

Наряду с вышеописанными эффектами в ряде экспериментов наблюдалось наоборот снижение ацидофицирующей активности корней под действием инсектицидов в концентрациях 10^{-7} и 10^{-4} моль/л. Причем, с увеличением концентрации циперметрина до 10^{-4} моль/л наблюдалось 90%-ое ингибирование скорости ацидофикации, а с увеличением концентрации дельтаметрина – 30%-ое ингибирование (рис.6). При этом с ростом действующей концентрации в присутствии циперметрина наблюдалось увеличение, а в

присутствии дельтаметрина уменьшение степени подавления ацидофицирующей активности корней.

Инсектициды группы синтетических пиретроидов, являясь чужеродными соединениями для растительного организма, выступают в качестве экзогенного стрессового фактора. В ответ на воздействие большинства стрессоров высшие растения отвечают усилением функциональной активности H^+ -АТФазной помпы, которая выполняет роль рецептора стрессового фактора. В работах [10, 11, 12, 13, 14] сообщается о стимулирующем влиянии на активность H^+ -помпы таких факторов, как увеличение кислотности цитоплазмы, низкотемпературные воздействия, засоление, изменения липидного состава мембран.

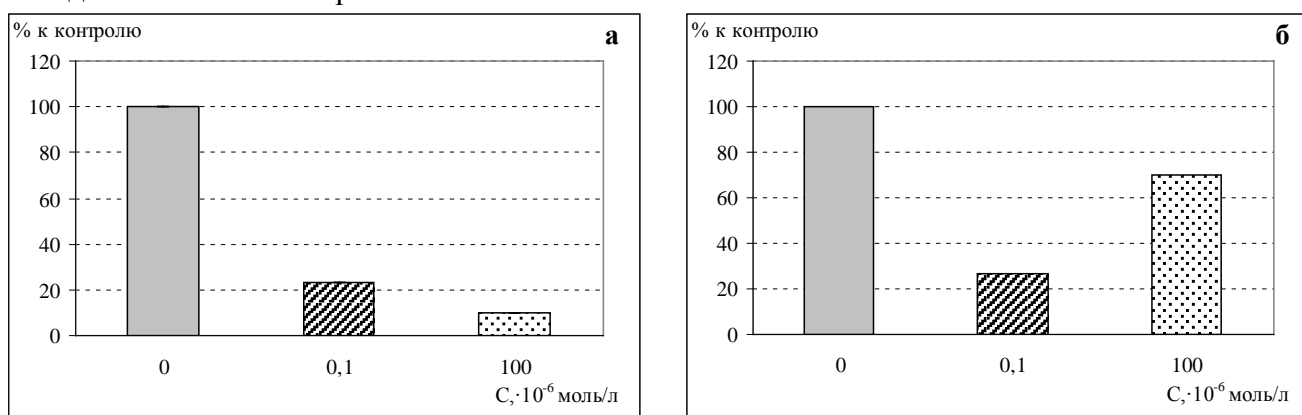


Рисунок 6 – Относительная ацидофицирующая активность корней проростков ячменя сорта "Сталы" в присутствии разной концентрации циперметрина (а) и дельтаметрина (б)

Ацидофицирующая активность, свидетельствующая о функционировании на плазмалемме корней H^+ -АТФазной помпы, является наиболее информативным показателем характеристики поглотительной способности корневой системы [15]. Учитывая, что тестируемые инсектициды изменяют функциональную активность других ион-транспортных систем, обеспечивающих поступление элементов минерального питания (в частности, ингибируют K^+ -каналы, увеличивают проводимость неселективной ионной утечки [16, 17, 18, 19]), не исключено, что зафиксированное увеличение функциональной активности H^+ -помпы может быть направлено на поддержание внутриклеточного ионного гомеостаза. В этом случае индуцируемый пиретроидами рост ацидофицирующей активности корней проростков ячменя является вполне закономерной реакцией на присутствие инсектицидов. Выявленное в ряде случаев подавление ацидофицирующей активности корней, возможно, связано с разной адаптационной способностью растительных организмов в пределах одного сорта.

Сравнение функциональной активности H^+ -АТФазной помпы автотрофных и гетеротрофных организмов свидетельствует о разном адаптационном потенциале данных объектов. Кроме этого, реакция на присутствие в наружной среде ксенобиотиков отдельно взятой растительной клетки отличается от реакции целостного органа. Отдельно взятая клетка более чувствительна к воздействию стрессовых факторов. Это подтверждается гибелью интернодальных клеток харовой водоросли при концентрации исследованных инсектицидов 10^{-4} моль/л. Интеграция клеток корневой системы обуславливает большую устойчивость к действию чужеродных веществ.

Список литературы

1. Мельников Н.Н., Мельникова Г.М. Пестициды в современном мире // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 4. С. 33-37.
2. Юрин В.М., Иванченко В.М., Галактионов С.Г. Регуляция функций мембран растительных клеток/ под ред. М.Н. Гончарика. Мн.: Наука и техника. 1979. 200 с.

3. Юрин В.М., Гончарик М.Н., Галактионов С.Г. Перенос ионов через мембраны растительных клеток. – Мн.: Наука и техника, 1977.–159 с.
4. Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. – Минск: Наука и техника, 1991.–271 с.
5. Камман К. Работа с ионселективными электродами. – М.: Мир, 1980. – 288 с.
6. Зайцев В. А. Корсанова О. М. Жукова Н. В. Эффективность проращивания семян в рулонах // Селекция и семеноводство.- 1983, № 11. – С. 39-40.
7. Грабов А.М. Потенциалзависимые калиевые каналы в плазмалемме корневых волосков // Физиол. раст. - 1990. - Т. 37, вып. 2. - С. 324-330.
8. Юрин В.М. Основы ксенобиологии: Учеб. пособие.Мн.: Новое знание. 2002. 267 с.
9. Телитченко М.М., Остроумов С.А. Введение в проблемы биохимической экологии. Биотехнология, сельское хозяйство, охрана среды. – М: Наука, 1990. – 288 с.
10. Воробьев Л.Н., Егорова Н.Н. Активная H^+ -секреция и протонная емкость апопласта // Структура и функции биологических мембран растений. – Новосибирск: Наука, 1985. – С. 43-47.
11. Ларская И.А., Заботин А.И. Исследование изменения активности протонной помпы плазмалеммы при низкотемпературном закаливании проростков озимой пшеницы // Вестник Башкирского университета. – 2001, № 2 (II). – С. 87-90.
12. Палладина Т.А. Роль протонных насосов плазмалеммы и тонопласта в устойчивости растений к солевому стрессу // Успехи современной биологии. – 1999. –Т. 119, № 5. – С. 451-461.
13. Опритов В. А. H^+ – АТФаза плазматической мембраны – основная электрогенная система высших растений // Соросовский образовательный журнал. – 2000. -№ 6. – С. 28-32.
14. Palmgren MG. Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H^+ -ATPase // Advances in Botanical Research. – 1998, №28. – P. 1–69.
15. Воробьев Л.Н. Регулирование ионного транспорта: теоретические и практические аспекты минерального питания растений // Итоги науки и техники. Сер. физиология растений. – М., ВИНТИ, 1988. -Т.5. – С. 5 – 176.
16. Юрин В.М., Кудряшов А.П., Дитченко Т.И., Яковец О.Г., Крытынская Е.Н. Ксенобиотики. Основные закономерности взаимодействия с ион-транспортными системами плазматической мембраны растительной клетки. Оценка их биобезопасности // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2007. Вып. 1. - С. 3-15.
17. Крытынская Е.Н., Яковец О.Г., Юрин В.М. Функциональная активность K^+ -каналов в присутствии пиретроидных инсектицидов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Сб. статей Междунар. конференции, Восьмого съезда БООФиБ, 25-27 июня 2008г., Минск, Беларусь, ч. 1– Минск, 2008. – С. 359-361.
18. Яковец О.Г., Крытынская Е.Н., Юрин В.М. Индуцированные циперметрином изменения неселективной ионной утечки // Ксенобиотики и живые системы: Материалы III Межд. науч. конф. - Минск, 2008. - С. 170-172.
19. Юрин В.М., Соколик А.И., Крытынская Е.Н., Яковец О.Г. Изменения селективности потенциал-зависимых K^+ -каналов плазматической мембраны под действием дельтаметрина // Ксенобиотики и живые системы: Материалы III Межд. науч. конф. - Минск, 2008. - С. 167-170.