

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

В. М. Юрин

БИОМЕДИАТОРЫ В РАСТЕНИЯХ

Допущено

*Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия для студентов
учреждений высшего образования
по биологическим специальностям*

МИНСК
БГУ
2013

УДК 581.192.7(075.8)
ББК 28.57я73
Ю72

Рецензенты:
кафедра ботаники и основ сельского хозяйства
Белорусского государственного педагогического
университета имени Максима Танка
(заведующий кафедрой доцент *Н. Д. Лисов*);
академик НАН Беларуси *Н. А. Ламан*

Юрин, В. М.
Ю72 Биомедиаторы в растениях : учеб. пособие / В. М. Юрин. —
Минск : БГУ, 2013. — 199 с.
ISBN 978-985-518-902-3.

В пособии представлены накопленные к настоящему времени сведения о результатах реакции растений на действие нейротрансмиттеров — ацетилхолина и биогенных аминов.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по биологическим специальностям.

УДК 581.192.7(075.8)
ББК 28.57я73

ISBN 978-985-518-902-3

© Юрин В. М., 2013
© БГУ, 2013

ОСНОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

АБК – абсцизовая кислота	ПКн – протеинкиназа неактивная
АДФ – аденозиндифосфат	ПФФ – протеинфосфатаза
АО – альдегидоксидаза	ПМ – плазматическая мембрана
АТФ – аденозинтрифосфат	ПП – потенциал покоя
АЦ – аденилатциклаза	рАЦ – растворимый АЦ
АХ – ацетилхолин	РЭП – разность электрических потенциалов
АХТ – ацетилхолинтрансфераза	сПз – сантипуаз
АХЭ – ацетилхолинэстераза	СР – саркоплазматический ретикулум
БЭР – биоэлектрическая реакция	тмАЦ – трансмембранный АЦ
ВП – переменный потенциал	ТМТ – триптофанметилтрансфераза
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота	УФ – ультрафиолетовый свет
ГДФ – гуаназиндифосфат	Ф _n – фосфор неорганический
ГК – глутаровая кислота	ФАВ – физиологически активные вещества
ГМТ – гистамин-N-метилтрансфераза	ФГАМК – фенилгаммааминомасляная кислота
ГТФ – гуаназинтрифосфат	ФДЭ – фосфодиэстераза
ГЦ – гуанилатциклаза	ФИФ ₂ – фосфоинозитолдифосфат
ДАГ – диацилглицерол	ФОП – фосфорорганические пестициды
ДКС – дальний красный свет	ФОС – фосфорорганические соединения
ДО – диоксидаза	ФПФ – фосфопротеинфосфатаза
ДОФА – диоксифенилаланин	ФС – фосфосоединение
ИМТ – имидазол-N-метилтрансфераза	ХОП – хлорорганические пестициды
ИУК – индолилуксусная кислота	ХЭ – холинэстераза
ИФ ₁ – инозитолмонофосфат	цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
ИФ ₂ – инозитолдифосфат	цГМФ – циклический гуаназинмонофосфат
ИФ ₃ – инозитолтрифосфат	ЭБР – эпибрассинолид
кДа – килодальтон	ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
КМ – кальмодулин	ЭПР – эндоплазматический ретикулум
КО – ксантиноксидаза	ЭРФ – эпидермальноростзависимая фосфатаза
КОМТ – катехоламин-о-метилтрансфераза	ЭТЦ – электронтранспортная цепь
КС – красный свет	СаСБ – Ca ²⁺ -связывающие белки
МАО – моноаминоксидаза	G-белки – ГТФ-зависимые белки
ММ – молекулярная масса	K _M – константа Михаэлиса
МТ – мультивезикулярные тельца	P _K – проницаемость мембраны к ионам калия
МЭ – микроэлектрод	P _{Na} – проницаемость мембраны к ионам натрия
НАД – никотинамидадениндинуклеотид	ΔV – изменение скорости движения цитоплазмы
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат	ΔΨ – изменение ПП
НУК – нафтилуксусная кислота	
ПААГ – полиакриламидный гель	
ПД – потенциал действия	
ПК – протеинкиназа	
ПКа – протеинкиназа активная	

ВВЕДЕНИЕ

Известный физиолог животных К. Бернар, изучая процессы раздражимости и рассматривая их как одно из главных свойств живых систем, еще в середине XIX в. высказал мысль об общих механизмах восприятия и быстрой ответной реакции организмов на внешние воздействия. Он писал: «Способность, составляющая существенное условие всех явлений жизни у растений, как и животного, существует в самой простейшей степени. Эта способность есть раздражимость»¹.

Данное заключение было сделано на основании опытов по влиянию анестетиков на быстрое закрывание листьев мимозы при механическом раздражении. К. Бернар установил, что у растений происходит такая же блокада анестетиками проведения волны возбуждения, как и у животных.

Во второй половине XIX в. Ч. Дарвин подтвердил, что все живые организмы реагируют на изменение внешней и внутренней сред, что способствует их жизнедеятельности. Ч. Дарвин, изучая поведение насекомыхоядных растений, также сделал вывод о том, что растения обладают раздражимостью – возможностью быстро и скоординированно реагировать на определенное внешнее воздействие, причем эта реакция может передаваться от места раздражения к удаленным от него органам. Ответная реакция организма на влияние фактора определяется порогом действия, т. е. наблюдаемые изменения происходят при определенной силе раздражителя.

Исследуя подвижность органов насекомоядных и вьющихся растений, Ч. Дарвин выявил высокую чувствительность их органов. Например, под действием нити весом 0,00025 мг отмечался изгиб усика росянки, а щупальце реагировало на вес 0,00082 мг. По этому поводу Ч. Дарвин писал: «Чрезвычайно сомнительно, чтобы какой-нибудь нерв человеческого тела, даже в состоянии возбуждения, мог быть раздражен таким легким телом, погруженным в плотную жидкость и лишь постепенно при-

¹ *Бернар К.* Курс общей физиологии: жизненные явления, общие животным и растениям. СПб., 1878.

веденным в соприкосновение с нервом. Но клетки железки росянки в таких условиях в состоянии передавать двигательный импульс от них на определенные расстояния. Вряд ли был когда-либо наблюдаемым в растительном царстве более замечательный факт»¹.

На основании экспериментов с механическими и химическими раздражителями Ч. Дарвин установил еще один факт: растения имеют специализированные клетки, воспринимающие определенный тип внешних воздействий (по аналогии со сходными клетками органов чувств у животных их следует называть рецепторными). Все закономерности, которые установил Ч. Дарвин, указывали на принципиальное сходство механизмов передачи раздражения у животных и растений.

В 1887 г. Дж. С. Бердон-Сандерсон показал, что при раздражении в листе венозной мухоловки наблюдаются электрические явления, аналогичные тем, которые происходят при распространении возбуждения в нервно-мышечных волокнах животных.

Большой вклад в изучение раздражимости растений внес индийский ученый Дж. Бос, работавший с мимозой в конце XIX – начале XX в. К. А. Тимирязев отмечал, что имя Дж. Боса «знаменует новую эпоху в развитии мировой науки»².

Как физик Дж. Бос не только использовал в своих физиологических исследованиях физические методы, но и подходил к интерпретации изучаемых явлений с физических позиций. Он показал, что при раздражении в растениях возникают ПД (ранее их называли токами действия), распространяющиеся по специальному каналу – проводящим пучкам. При частом раздражении наступает утомление – ответ растения становится более вялым, происходит неполное опускание листа; таким же образом ведет себя и мышца животного, например лягушки. На характер движения сильно влияют наркотические вещества, причудливым образом изменяя кривую опускания – подъема листа.

Молекулярный механизм раздражимости, включающий восприятие внешнего стимула, передачу информации о нем и ответные реакции, начали изучать лишь в XX в. В 1926 г. была высказана гипотеза о существовании аналога нервной системы у растений. Выяснилось, что в основе проведения импульса возбуждения у животных и растений лежат электрические явления в виде изменений электрического потенциала.

Электрическое управление движением органов отмечено у многих растений, а ПД как средство управления различными физиологическими функциями присущ всем растениям. Наиболее полное доказатель-

¹ Дарвин Ч. Происхождение видов путем естественного отбора. СПб., 1939.

² Тимирязев К. А. Жизнь растений: десять общедоступных чтений. М., 1938.

ство этого положения было получено в 60–70-е гг. XX в. И. И. Гунаром и его учениками.

Потребности медицины, связанные с необходимостью поиска обезболивающих и успокаивающих лекарственных средств, дали толчок к дальнейшим научным исследованиям, что привело к открытию механизма химической передачи возбуждения от клетки к клетке с помощью низкомолекулярных посредников — АХ и биогенных аминов (дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин, гистамин и др.). В нервной клетке эти соединения содержатся в специальных секреторных пузырьках и освобождаются при возбуждении в очень узкое пространство (1 нм) между контактирующими клетками — синаптическую щель. Свободный медиатор связывается с белками-рецепторами соседней клетки, в результате чего в плазматической мембране открываются ионные каналы, ионы устремляются по градиенту концентрации и возникает изменение электрического потенциала клетки. При этом химическая информация преобразуется в электрическую. Взаимодействие медиатора с рецептором может реализоваться и по другому механизму — через включение систем внутриклеточных вторичных посредников, которые регулируют активность ферментов в клетке. Помимо специализированной медиаторной функции в организмах, обладающих нервной системой, АХ и биогенным аминам свойственна и другая роль.

Некоторые ученые пытаются найти сходство в наличии определенных органов и их функций в растительном и животном организмах. Например, венозная часть питающей системы у растений — по их мнению, аналога сердечно-сосудистой системы — находится в земле и представлена корневой системой. Распределительная (артериальная) система — это наземные части растения, включающие ствол, ветви и листья. Таким образом, бионическая модель растения может быть представлена двумя разнонаправленными камертонами — всасывающим и раздающим.

Растение имеет свою «иммунную» систему. При механическом повреждении происходят сложнейшие перестроенные явления. Например, когда у дерева пересыхает одна из ветвей (гангрена), чтобы не допустить разрушения стволовой части, именно к загнивающей ветке усиливается приток питательных веществ. Гнилой участок затягивается полностью паренхиматозными (подкорковыми и корковыми) клетками, происходит полная герметизация пораженного участка, при которой не поступают кислород и наружная влага, процесс гниения прекращается, а его остатки как бы консервируются для заживления раны. Для этого растения выделяют массу собственных «антибиотиков» — терпеноиды, смолянистые вещества.

Известный специалист по эволюционной физиологии животных профессор Х. С. Коштыянец в 60-е гг. XX в. обосновал положение о том, что

физиологические и биохимические регуляторные процессы сходны у всех представителей зоомира, от одноклеточных и примитивных многоклеточных до высших позвоночных. Экспериментальное обоснование данная гипотеза получила позже в работах профессора Г. А. Бузника и его сотрудников в Институте биологии развития им. Н. К. Кольцова АН СССР, которые показали, что медиаторы синтезируются и выполняют важные функции регуляторов развития у зародышей и организмов, не обладающих нервной системой.

В начале XX в. АХ был найден в грибах спорыньи, а затем и у высших растений. Позднее в 40-х гг. XX в. у высших растений обнаружили и биогенные амины — гистамин, дофамин и норадреналин, серотонин. Общебиологическая роль веществ, являющихся химическими передатчиками возбуждения у высших животных, становится очевидной к концу XX в.

В 70-е гг. XX в. в ряде мировых лабораторий (М. Джаффе и Р. Флак в США, Е. Хартман в ФРГ и др.) были начаты систематические исследования роли АХ в растительных объектах. Вначале основное внимание АХ уделялось в связи с предполагаемой регуляцией им роста и фотоморфогенеза. Затем ученые обратили внимание на методические вопросы обнаружения и идентификации АХ, ферментов его синтеза и распада. На этом этапе исследований заметный вклад внесли сотрудники лабораторий М. Кутачека в Чехии, Р. Кастури и Р. Гупта в Индии, А. Третина и Р. Беднарски в Польше, Б. Смолмен в Великобритании, С. Мадхавана в США, Ю. Моноки в Японии. В России роль медиаторов в растениях изучали в Институте биофизики клетки РАН (В. В. Рощина) и Институте физиологии растений РАН (В. Н. Жолкевич).

Одной из трудностей данной области, по мнению специалистов, является терминология. Название «медиаторы», или «нейромедиаторы», возникло и применяется лишь в физиологии высшей нервной деятельности. Термин «регуляторы» очень широк и не ограничивается только веществами, входящими в данную классификацию. Поэтому некоторые фитофизиологи считали возможным использовать условный термин «биомедиаторы», подчеркивая тем самым общебиологическое значение этих соединений и возможную их роль как сигнальных веществ и посредников.

Некоторые трудности возникают при проведении аналогии животных тканей, имеющих синаптические контакты между нервными клетками, с растительными, в которых подобные структуры отсутствуют. В последнее время предлагается использовать термин «синапс» в более широком смысле и трактовать его как область, через которую передача информации обеспечивается локальным визикулярным рециркулированием. В таком случае места соприкосновения растительных клеток рассматривают как «растительный синапс», электрическую связь через который

обеспечивают плазмодесмы. Кроме того, в этих местах идентифицированы сигнальные белки. Считают, что введение концепции «растительного синапса» будет способствовать прогрессу современной биологии растительной клетки.

Биомедиаторы (АХ, норадреналин, адреналин, серотонин) не только являются трансдукторами сигнала между клетками в синапсах, но и регулируют метаболические и энергетические процессы, способствуя адаптации организма к изменениям окружающей среды. Адреналин, норадреналин и серотонин могут выступать в качестве гормонов и активных компонентов азотного обмена. Интерес к этим соединениям у фитофизиологов возник после их обнаружения в растениях, а также в связи с предположением о существовании в растительных мембранах мест связывания, напоминающих рецепторы животных.

Настоятельным требованием времени является установление функциональной роли биомедиаторов в растениях. Результаты мировых исследований по данной проблеме обобщены в монографии «Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и биогенные амины» и учебном пособии «Нейротрансмиттеры – биомедиаторы и регуляторы растений» В. В. Рошиной, изданных в 1991 и 2010 гг. соответственно, на основе которых написано настоящее учебное пособие.

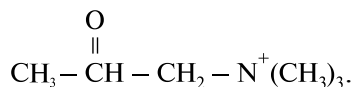
Глава 1

СОДЕРЖАНИЕ, СИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ БИМЕДИАТОРОВ

Как отмечалось, биомедиаторы (АХ, норадреналин, адреналин, серотонин) являются трансдукторами сигнала между клетками в синапсах. Эти соединения также регулируют метаболические и энергетические процессы, способствуя адаптации организма к изменениям окружающей среды. Адреналин, норадреналин и серотонин могут выступать в качестве гормонов и активных компонентов азотного обмена.

1.1. АЦЕТИЛХОЛИН

Ацетилхолин — четвертичный амин уксусной кислоты и холина:



Аммонийный азот АХ положительно заряжен в широких пределах рН. Все соли АХ легко растворимы в воде. Растворимость солей АХ снижается с уменьшением полярности растворителя; в неполярных растворителях АХ не растворим.

Положительный заряд аммонийного азота АХ, кроме влияния на растворимость, придает ему свойства одновалентного катиона. Более того, присутствие положительного заряда и незаряженной углеводородной цепи способствует проявлению у молекул АХ свойств детергента. В биологических системах эти свойства проявляются при концентрациях АХ 10^{-3} М и выше.

Вначале АХ был идентифицирован и выделен в препаратах гриба спорыньи *Claviceps purpurea*. Позднее медиатор был обнаружен в животных тканях. Интерес к нему возник в связи с изучением нервной системы у

животных. В 20-е гг. XX в. О. Леви открыл АХ и гидролизующий его фермент в тканях сердца амфибии.

Через три десятилетия после открытия П. Р. Эвансом АХ начали появляться работы по изучению его содержания в растениях. Было обнаружено, что большое количество АХ содержится в волосках и тканях крапивы. Это соединение было идентифицировано в составе консервированной капусты и силоса, а также в бактериях, которые способны аккумулировать большое количество АХ.

Как предполагают, около 600 млн лет назад растения переселились из океана на континент. Сегодня установлено, что АХ содержится во многих растениях, в том числе во мхе семейства *Fumariaceae* и *Equisetum robustum*, т. е. в примитивнейших растениях, появившихся в эволюционном плане весьма давно. Так, *Equisetum robustum* произрастала в Девонском периоде (300–400 млн лет назад).

К настоящему времени АХ обнаружен в более чем 78 видах из 42 семейств многоклеточных растений, некоторых видов мхов и цианобактериях.

Количество АХ в органах и тканях значительно варьирует в зависимости от вида растений. В корнях, стебле *Urtica dioica* и секреторных тканях жгучих волосков крапивы содержится АХ 10^{-2} моль/л, или 120–180 нмоль/г сырой массы. В составе секрета был обнаружен и гистамин. АХ вместе с присутствующим гистамином может вызывать болевую реакцию и образование волдырей на коже человека при контакте. Жгучие волоски австралийского вида лапортеи являются причиной особенно сильных ожогов. В XIX в. ожоги, вызванные этим растением, стали причиной тяжелых заболеваний лошадей и рабочих, занятых на строительстве железной дороги.

Для видов лапортеи, растущих в Новой Гвинее, характерно еще большее поражающее действие: были отмечены даже смертельные случаи. Тем не менее австралийские аборигены использовали надземные побеги и плоды лапортеи как наружное средство от ревматизма. Действующее вещество, вызывающее болевую реакцию, может сохранять активность в течение 40 лет.

В составе секрета жгучих волосков обнаружено 0,01–0,025 мкг АХ, 0,025–0,05 мкг гистамина и 0,001 мкг серотонина в расчете на 1 волосок.

В разных частях растений концентрация АХ резко колеблется. У ряда видов растений наиболее высокое содержание его характерно для стеблей, в листьях оно в 3, а в корнях – в 70 раз меньше. По другим данным количество АХ в листьях может превышать его содержание в корневых системах в 5–10 и в стеблях – в 10–50 раз. Некоторые примеры содержания АХ приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Содержание ацетилхолина в растениях
(В. В. Рощина, 1991)

Вид	Орган	Количество, мкг/г сырой массы
<i>Betula pendula</i>	Листья	11,4
<i>Phaseolus aureus</i>	Листья	0,3–50,0
	Корни	0,4–0,7
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Листья	2,0
	Стебли	7,4
<i>Pisum sativum</i>	Листья	2,2
	Стебли	8,2
	Корни	1,4
<i>Artocarpus integra</i>	Семена	55–3800
	Листья	
<i>Laportea moroides</i>	Листья Волоски	0,07–0,175 на 1 волосок
<i>Urtica urens</i>	Листья Волоски Стебли Корни	120–180

В табл. 1.2 сравнивается содержание АХ у животных и растений. Так, в мозге крысы и жалящих клетках пчелы АХ присутствует в количествах, вполне сравнимых с его содержанием в клетках некоторых растений.

Таблица 1.2

Содержание ацетилхолина в растениях и животных
(В. В. Рощина, 2010)

Объект	АХ (нмоль г ⁻¹ сырой массы)
Растение в целом	0,5–3000
Жгучие волоски крапивы и лапортеи	120–180
Мозг крысы	3,4–3400
Жалящие клетки пчелы	до 300

Нижний предел содержания АХ в тканях животных сопоставим с величинами, полученными для растений, а верхний – в 100 и даже 1000 раз выше. Локализация АХ в растительной клетке не известна. У животных он хранится в секреторных пузырьках, отделяемых от аппарата Гольджи.

Иногда пузырьки покрыты особым белком – клатрином. Аналогичные покрытые клатрином визикулы найдены также у растений. Предполагают, что местом синтеза и первоначальной локализации АХ в растительных клетках являются мембраны ЭПР, а у некоторых видов бобовых, так же как и у животных, АХ синтезируется в цитозоле.

У животных значительное количество АХ найдено во фракциях митохондрий. Такие исследования на растениях не проводились, но была сделана попытка обнаружить АХ в хлоропластах листьев растений. Однако не у всех исследованных растений удалось обнаружить в пластидах АХ (табл. 1.3).

Таблица 1.3

**Содержание холиновых эфиров в хлоропластах
(нмоль/г сырой массы листьев)
(В. В. Рошина, 1991)**

Растение	АХ	Бутирилхолин
<i>Pisum sativum</i>	0,069–8,2	0–731
<i>Phaseolus aureus</i>	0,1–49	3,8–100
<i>Zea mays</i>	0–2,3	0
<i>Urtica dioica</i>	2,0	0
<i>Robinia pseudoacacia</i>	0	260

Следует отметить, что существует ряд трудностей количественного определения холиновых эфиров. Так, АХ и бутирилхолин растворимы в воде и могут легко вымываться из пластид при их выделении и т. д. Содержание АХ и бутирилхолина зависит от возраста, фазы развития, условий выращивания и других факторов.

Синтез холиновых эфиров. Предшественниками АХ в растениях, как и у животных, являются ацетил-КоА и холин.

Синтез ацетил-КоА происходит из ацетата с участием ацетил-КоА-синтетазы или из пирувата с помощью пируватдегидрогеназного комплекса. Синтез самого АХ осуществляется с участием фермента АХТ.

Холин образуется двумя путями: из аминокислоты серина или фосфатидилхолина мембран. Реакции синтеза протекают по схеме, представленной на рис. 1.1.

Фермент АХТ был обнаружен в листьях крапивы *Urtica dioica* и даже в ее отдельном жгулке волоске.

Установлено, что скорость образования АХ была максимальной у крапивы *Urtica dioica* и вполне сравнима с той, что наблюдается у домашней мухи *Musca domestica*.

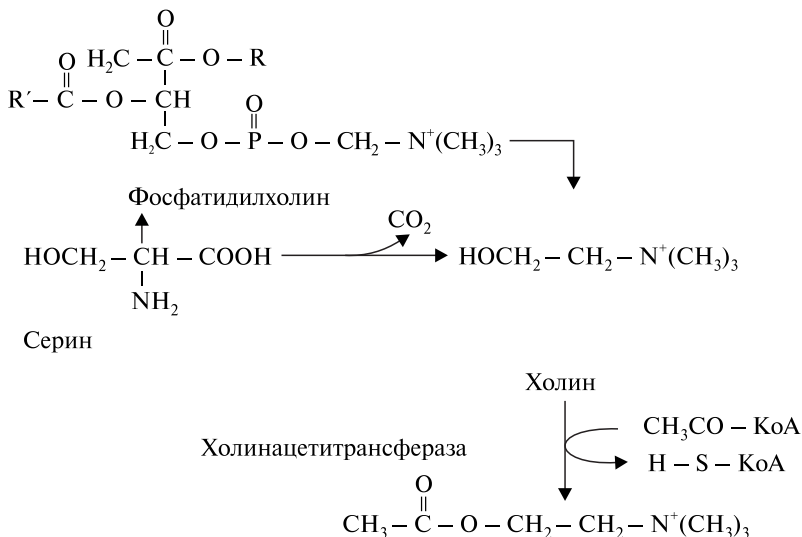


Рис. 1.1. Синтез ацетилхолина
(В. В. Рощина, 1991)

В целом же активность АХТ, как и содержание АХ, значительно выше в тканях животных. Однако у некоторых групп растений, например у крапивы, активность фермента достаточна велика. Наличие фермента у цианобактерии *Oscillatoria agardhii* указывает на то, что АХ, возможно, синтезировался даже у древних форм растений.

Содержание холина в растениях в 100–1000 раз превышает содержание АХ (табл. 1.4).

Результаты табл. 1.4 показывают, что синтез АХ (содержание) в листьях стимулируется светом. Содержание АХ и холина в листьях на свету более чем в 2 раза выше, чем в темноте. Поэтому можно полагать, что синтез этих соединений связан с процессами фотосинтеза.

Таблица 1.4

Содержание ацетилхолина и холина
в семидневных проростках *Phaseolus aureus*, выращенных при
непрерывном освещении или в темноте (нмоль/г сырой массы)
(В. В. Рощина, 1991)

Органы	АХ	Холин
На свету		
Листья	53,0 ± 6,6	3740 ± 200
Стебли	0,77 ± 0,09	1440 ± 73
Корни	4,7 ± 2,6	2160 ± 218

Органы	АХ	Холин
В темноте		
Листья	21,0 ± 7,6	6800 ± 170
Стебли	2,4 ± 0,7	1080 ± 35
Корни	4,6 ± 2,5	2270 ± 278

Метаболизм ацетилхолина. Гидролиз АХ до холина и уксусной кислоты осуществляется ферментом ХЭ. Холинэстеразная активность у растений была обнаружена в 1962 г. у одноклеточной водоросли *Nitella*, затем у лишайников и высших растений. Кроме специализированного фермента способностью гидролизовать АХ, но с более низкими скоростями (в 1000 раз), могут другие эстеразы растения – пектинэстеразы, аллилэстеразы, синапинэстеразы.

В растениях холин является субстратом для синтеза и других холиновых эфиров: пропионилхолина, бутирилхолина, синапинхолина.

Схема метаболизма АХ в растениях представлена на рис. 1.2.

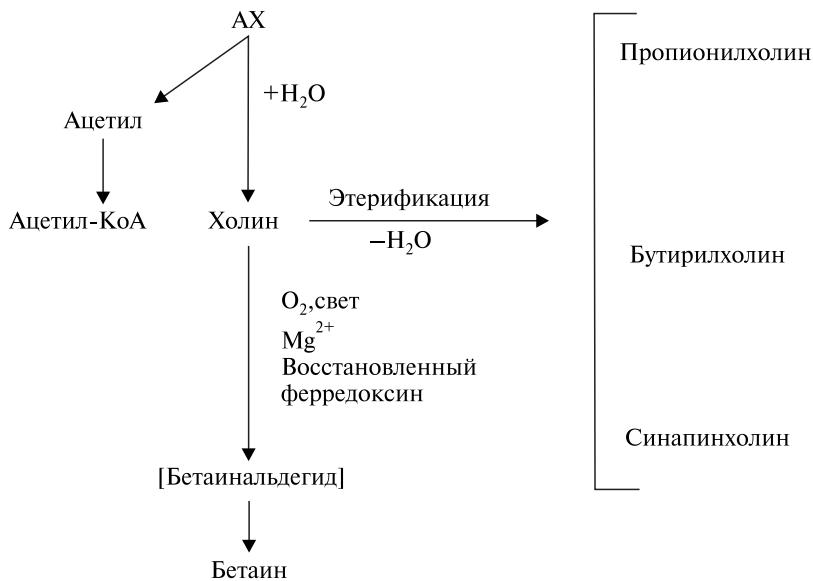


Рис. 1.2. Метаболизм ацетилхолина в растениях
(В. В. Рошина, 1991)

Условия образования этих эфиров не изучены. Пропионилхолин в количестве 0,11–0,23 нмоль/г сырой массы найден в листьях фасоли, тополя, березы и платана, а бутирилхолин в значительно больших количествах (4,6–260 нмоль/г сырой массы) обнаружен в листьях гороха, фасоли и акации белой. Синапинхолин найден только у растений семейства крестоцветных, причем в зеленых тканях содержание выше, чем в этиолированных. Он образуется из синаповой кислоты и холина.

Синаповая кислота синтезируется из коричной кислоты при участии гидроксимирующих и метилирующих ферментов. Реакцию синтеза синапинхолина катализирует фермент холинсинапинтрансфераза.

Гидролиз синапинхолина осуществляется так же, как и АХ, ХЭ.

Холин является источником бетаина (или глицинбетаина), предохраняющего растения от солевого стресса. Образование бетаина происходит в хлоропластах ряда растений, произрастающих в районах с засушливым климатом (например, ячмень, свекла, шпинат). Реакции проходят при участии фермента – бетаинальдегиддегидрогеназы. Активация этого фермента вызывается увеличением засоления, причем для синтеза бетаина необходим свет и O_2 , а также восстановленный ферредоксин.

Утилизация АХ в растениях ведет к повышению пула холина, легко переходящего в бетаин или этирифицирующего в другие эфиры. Уксусная кислота, по-видимому, легко метаболизируется в ацетил-КоА, активно участвующий в разнообразных синтезах от органических кислот в цикле Кальвина до терпеноидов. Производные холина также являются биологически активными.

Изучение активности 17 синтезированных холиновых производных показало, что среди них есть вещества, обладающие свойствами ингибиторов, ретардантов и стимуляторов роста.

Большое влияние на метаболизм АХ оказывают экзогенные физико-химические факторы.

1. *Свет* значительно влияет на уровень ацетилхолина в тканях (см. табл. 1.3). Его действие связано с регулированием активности ферментов синтеза и распада. Роль света подтверждается также в опытах с этиолированными проростками овса. Показано, что уровень эндогенного АХ повышается в 2-3 раза по мере их зеленения как на белом, так и красном свету.

Стимуляция светом синтеза АХ отмечена не для всех растений, что, по-видимому, связано с метаболическими особенностями и путями превращения углерода при фотосинтезе.

Есть сведения, что накопление АХ в тканях зависит от длины волны света. ДКС ($\lambda \geq 730$ нм) вызывает уменьшение уровня АХ. КС ($\lambda \approx 660$ нм),

наоборот, увеличивает синтез АХ путем стимуляции активности холинацетилтрансферазы в присутствии холина и ацетил-КоА.

По некоторым данным, КС эффективнее, чем белый. При действии белого света содержание АХ в каллусе мха *Funaria hygrometrica* составляло 27 % (35 нмоль/г сырой массы) от его количества на КС (124,1 нмоль/г сырой массы). Последовательное облучение каллуса КС и ДКС резко подавляло синтез холинового эфира (2,2 нмоль/г сырой массы).

В везикулах шероховатого ЭПР из клеток корней на КС синтез АХ увеличивался по сравнению с темнотой в 2–20 раз, тогда как на ДКС или не наблюдалось изменений, или скорость синтеза даже снижалась в 5 раз. Полагают, что синтез АХ управляется фитохромом, который существует в двух формах, чувствительных либо к ДКС, либо к КС.

В последнее время появились данные о том, что фитохром принимает участие в эффекте Эмерсона при фотосинтезе. Р. Эмерсон показал, что при одновременном освещении коротковолновым (650 нм) и длинноволновым (700 нм) КС интенсивность фотосинтеза выше, чем при действии каждого в отдельности. На основании выявленной закономерности было сделано предположение о наличии двух фотосистем фотосинтеза.

С этой точки зрения высокая эффективность синтеза АХ на КС определяется работой обеих фотосистем, тогда как снижение процесса на ДКС объясняется низкой активностью фотосинтеза, связанной с работой только фотосистемы I. Отмечено также, что накопление АХ под действием света связано с фотопериодизмом. Так, у некоторых растений в условиях короткого дня накапливалось АХ больше по сравнению с теми, что росли в условиях длинного дня или непрерывного освещения.

2. *Температура* влияет на метаболические процессы и в первую очередь на активность ферментов синтеза (АХТ) и катаболизма (ХЭ) АХ. Оптимумы температуры для АХТ и ХЭ находятся в пределах 25–30 °С. ХЭ многих животных имеют более высокий температурный оптимум – 37 °С.

3. *Влияние рН*. Оптимум рН для выделенных из растений ХЭ составляет 7,0–7,8 и совпадает с таковым для животных. При изменении рН от 7,6 до 8,0 скорость неферментативного гидролиза АХ значительно повышается.

Стабильность растворов АХ зависит от рН и температуры. Максимальная устойчивость этого соединения наблюдается при рН 4,0 и сохраняется при стерилизации высокими температурами. Устойчивость солей АХ уменьшается с повышением рН: в щелочных растворах происходит быстрый гидролиз АХ до уксусной кислоты и холина. При 25 °С период полураспада АХ в 0,1 М растворе при рН 7,0 около 20 дней, тогда как при рН 12,0 – только 12 с.

4. *Ионная сила.* Двухвалентные ионы Mn^{2+} и Ca^{2+} (1–10 мМ) снижают активность АХТ в 2–3 раза, тогда как ион Mg^{2+} на нее не влияет.

5. *Кислород.* Концентрация O_2 в тканях, вероятно, определяет скорость синтеза холиновых эфиров, хотя этот вопрос изучен недостаточно. У некоторых видов исследуемых растений АХ найден только в аэрируемых тканях.

Средства защиты растений. В первую очередь к этим соединениями следует отнести пестициды. Пестициды подразделяются на две большие группы – ХОП и ФОП. Их негативное влияние на физиологические функции растений достаточно известно. Так, широко используемые ФОП (хлорофос, фталофос и др.) достаточно ингибируют холинэстеразную активность растений. Это подтверждает гипотезу об ингибировании прорастания злаковых культур инсектицидами вследствие угнетения активности холинэстераз. Именно в основе токсического действия ФОП лежит их взаимодействие с ХЭ, ведущее к торможению ее активности. Ингибирование холинэстеразной активности с последующим быстрым нарушением метаболизма АХ привело к тому, что ФОП рассматривают как синаптические яды, поскольку они подавляют передачу нервного импульса в холинреактивных системах. Некоторые ретартанты также оказывают ингибирующее действие на ХЭ растений.

ФОП повреждают мембраны, например стимулируя перекисное окисление липидов, изменяя свойства транспортных систем. ХОП представляют большую опасность для водных экосистем. Они также вызывают сдвиги в функционировании систем транспорта ионов через плазматическую мембрану растительных клеток.

1.2. БИОГЕННЫЕ АМИНЫ

Биогенные амины по многим признакам выделяются в ряду прочих биорегуляторов. Малый размер молекул этих соединений говорит о том, что соответствующие рецепторные структуры являются небольшими и просто организованными. Поэтому наиболее существенные успехи в изучении молекулярных механизмов взаимодействия биорегуляторов с рецепторами достигнуты как раз в работах по исследованию биогенных аминов.

Под названием «биогенные амины» обычно объединяют продукты декарбоксилирования аминокислот, входящих в состав белков, и некоторые их производные; точного определения границ этого класса соединений, по-видимому, не существует.

Так, наряду с производными аминокислот «магического» набора к биогенным аминам относят также соединения, получающиеся декарбоксилированием «небелковых» аминокислот орнитина (путресцин) или цистеиновой кислоты (таурин).

Биогенные моноамины, являющиеся биорегуляторами, и их важнейшие синтетические производные подразделяют на четыре группы:

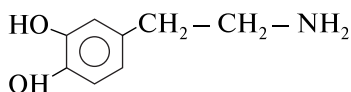
- 1) катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин);
- 2) группа гистамина;
- 3) группа серотонина;
- 4) группа ГАМК.

Содержание биогенных аминов в тканях высших растений и водорослях колеблется от 30–700 нмоль · г⁻¹ сырой массы в норме до 3000 нмоль · г⁻¹ сырой массы и выше в стрессовых условиях.

Катехоламины. Физиологически активные вещества, выполняющие роль химических посредников и «управляющих» молекул (медиаторы и нейрогормоны) в межклеточных взаимодействиях у животных и человека называются *катехоламинами*. Амины играют значительную роль в азотном обмене растений и животных.

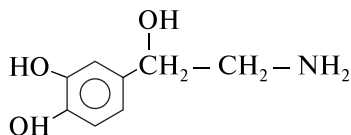
Катехоламины в растениях были найдены в 1958 г. в плодах банана. В настоящее время катехоламины идентифицированы в 28 видах растений из 18 семейств.

Дофамин



найден у 18 видов высших растений и зеленой водоросли *Monostroma fustum*. Отмечено увеличение дофамина в 1,5 раза в местах ранения у кактуса *Carnegica gigantea*. Дофамин присутствует в растениях не только в свободной, но и в глюкозидированной форме, например у семян *Entada pursaetha*.

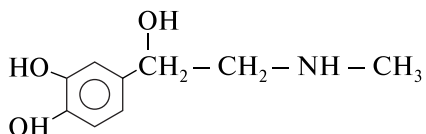
Норадреналин



идентифицирован в 17 видах растений из 8 семейств. У растений, обладающих двигательной способностью отдельных органов в ответ на раздражение, в частности у *Mimosa pudica*, норадреналин находится в подушечках и осях листьев. При стрессовых воздействиях также отмечается

накопление норадреналина в листьях некоторых растений. Содержание норадреналина в плодах банана связано с окислительными процессами при созревании.

Адреналин



обнаружен только в 5 видах из 4 семейств. Особенно много адреналина накапливается в листьях кукурузы. Некоторые данные по содержанию катехоламинов в растениях приведены в табл. 1.5.

Таблица 1.5

Содержание катехоламинов в растениях
(В. В. Рощина, 1991)

Вид	Орган	Содержание, мкг · г ⁻¹ сырой массы
Дофамин		
<i>Carnegieia gigantea</i>	Надземная часть	3000–4000
<i>Musa</i>	Плод (кожура)	700
	Плод (мякоть)	8
Норадреналин		
<i>Phaseolus aureus</i>	Листья	0,49–1234
<i>Pisum sativum</i>	Усики	1,8
	Стебли	0,8
	Листья	1,0
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Листья	0–6760
<i>Mimosa pudica</i>	Первичные подушечки	3,5
	Черешки	0,6
<i>Musa</i>	Плод (кожура)	122,0
	Плод (мякоть)	2,0
<i>Portulaca oleracea</i>		2500
Адреналин		
<i>Pisum sativum</i>	Листья	0–34,2
<i>Phaseolus aureus</i>	Листья	0,22–284,0
<i>Zea mays</i>	Листья	3833,0

Недавно норадреналин и адреналин были идентифицированы в изолированных хлоропластах растений из семейства *Leguminosae* и *Urticaceae* (табл. 1.6).

Таблица 1.6

Содержание катехоламинов в изолированных хлоропластах
(нмоль/г сырой массы листьев)
(В. В. Рощина, 1991)

Растение	Норадреналин	Адреналин
<i>Phaseolus aureus</i>	5	700
<i>Pisum sativum</i>	120	87
<i>Robinia pseudoacacia</i>	0–4000	0
<i>Urtica dioica</i>	3120	3930

У животных значительное количество норадреналина и дофамина найдено во фракциях митохондрий.

Метаболизм катехоламинов. Путь биосинтеза моноаминов (дофамин, норадреналин и адреналин) включает реакции декарбоксилирования и гидроксирования соответствующих аминокислот. Схема образования моноаминов из фенилаланина представлена на рис. 1.3.

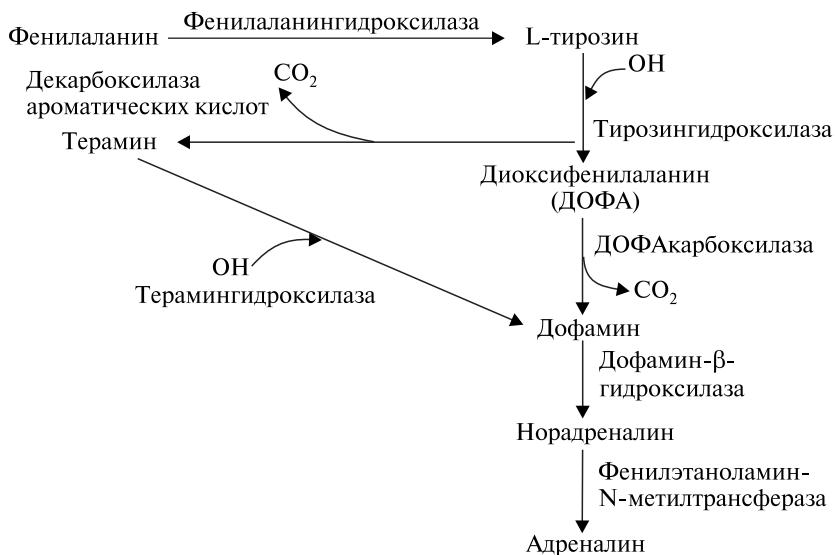


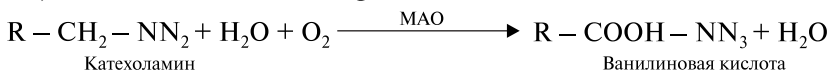
Рис. 1.3. Синтез моноаминов из фенилаланина
(В. В. Рощина, 1991)

Эти процессы катализируются ферментом фенилаланингидроксилазой, или фенилаланинмонооксидазой, и тирозингидроксилазой, или тирозин-3-монооксидазой. Дофамин — непосредственный предшественник норадреналина и адреналина, образуется путем декарбоксилирования ДОФА с помощью фермента декарбоксилазы ароматических кислот. Возможен и другой путь превращения тирозина в дофамин последовательным декарбоксилированием с помощью декарбоксилазы ароматических кислот до тирамина, а затем в катехоламин с помощью тирамингидроксилазы. Далее дофамин окисляется до норадреналина с помощью фермента дофамин-β-монооксидазы в присутствии кислорода. Затем из норадреналина при участии фенилэтанол-аминметилтрансферазы происходит образование адреналина.

Места синтеза катехоламинов в растительной клетке точно не установлены. Предполагается, что, как и у животных, образование этих веществ идет в цистернах аппарата Гольджи. Существуют только сведения о том, что дофамин найден в вакуолях клеток отдельных видов мака.

Катаболизм катехоламинов. Распад и превращение катехоламинов в растениях в общих чертах имеет сходство с распадом этих соединений в животных тканях и проходит по двум путям:

1) окислительное дезаминирование:



2) о-метилирование:

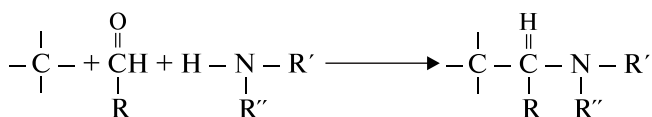


Пути катаболизма катехоламинов показаны на рис. 1.4.

В основе этого процесса лежат реакции окисления, дезаминирования и метилирования с участием MAO и КОМТ. Катехоламины превращаются в физиологически неактивные вещества (норметанефрин, метанефрин и др.) и в конечном счете образуется ванилиновая кислота. Диоксиминдальная и ванилиновая кислоты — продукты метаболизма растений, поэтому можно предположить, что аналогичная схема применима к растениям.

В отличие от животных моноаминооксидазы, хотя и присутствуют в растениях, но играют меньшую роль в окислительном дезаминировании катехоламинов, чем диаминооксидазы.

Катехоламины способны также превращаться в алкалоиды (часто видоспецифичные). В основе образования алкалоидов лежит реакция Манниха:



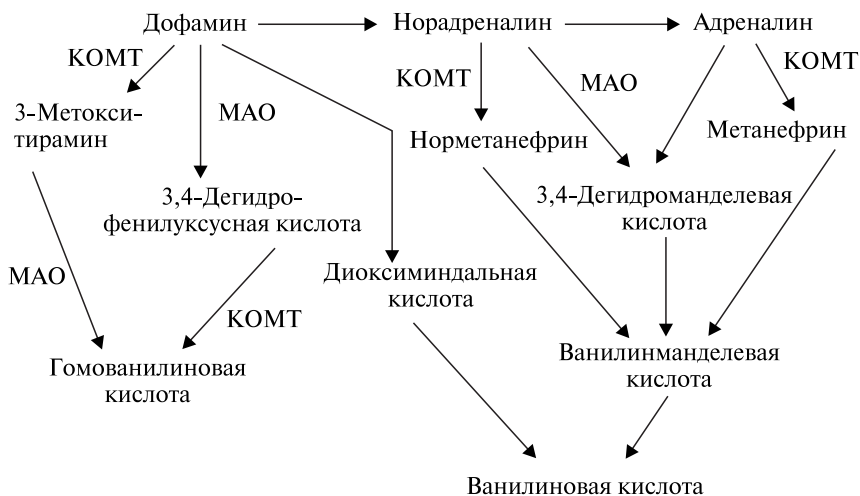


Рис. 1.4. Катаболизм катехоламинов до ванилиновой кислоты (В. В. Рошина, 1991)

Источником субстратов для этой реакции, в одном случае, являются катехоламины и продукты их метаболизма — альдегиды (деоксibenзальдегид, ванилиновый альдегид и т. д.). Другим путем образования алкалоидов может быть метилирование катехоламинов.

Образование алкалоидов и продукта дезаминирования ДОФА в млечниках мака *Papaver somniferum* и *Papaver bracteatum* происходит по схеме, представленной на рис. 1.5.

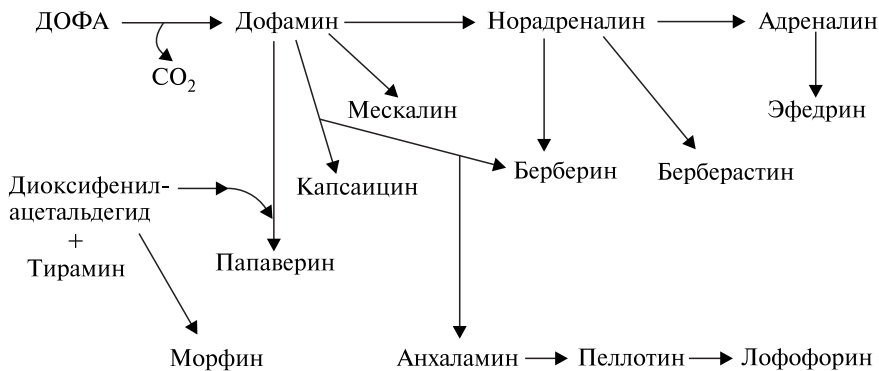


Рис. 1.5. Образование алкалоидов из катехоламинов (В. В. Рошина, 1991)

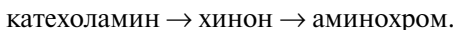
Другая группа алкалоидов типа берберина и берберастина образуется из катехоламинов у растения желтокорень *Hydrastis canadensis* и часто встречается в семействах *Berberidaceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae* и др.

При метилировании дофамина в мексиканских кактусах образуются такие алкалоиды, как мескалин, ангаламин, пеллотин, лофофорин.

Мескалин является галлюциногенным ядом, так как связывается с адренорецептором в постсинаптической мембране и тем самым препятствует действию норадреналина и адреналина. Агонист адреналина алкалоид эфедрин образуется в растениях рода *Ephedra* также путем метилирования этого катехоламина.

Из других продуктов катаболизма катехоламинов ванилина и ванилиновой кислоты образуются алкалоиды капсацин, *d*-тубокурарин и, возможно, атропин. *d*-Тубокурарин и атропин являются блокаторами никотиновых и мускариновых холинорецепторов мембран животных клеток соответственно и оказывают антимедиаторное действие на постсинаптическую мембрану.

При окислении катехоламинов кислородом воздуха образуются окисленные продукты – красные (аминохромы) и бурые пигменты (меланины). Это окисление может происходить либо без участия ферментов либо с их участием (полифенолаксидазы и др.):

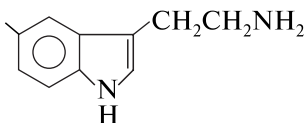


Перенос электронов на кислород воздуха вызывает образование перекиси водорода и супероксидрадикала – активного кислорода O_2^{2-} . Аминохром на воздухе превращается в меланины. Ферментативное окисление катехоламинов в меланины полифенолоксидазой выявлено в плодах банана.

Серотонин. Древнейшим из всех гормонов на земле является **серотонин**. Он участвовал в фотосинтезе первых растений и управлял нервными центрами хордат и аммонитов. В процессе развития человеческого эмбриона он формируется как первая гормональная система. Человеческий церебральный серотонин – самое действенное вещество в природе. Серотонин является высокоактивным биогенным амином, выполняющим у животных и человека много важных функций: регулирует кровяное давление, приток крови через почки, дыхание, температуру тела, является нейротрансмиттером и т. д.

Установлено, что плоды и листья облепихи, содержащие танин, витамин С и серотонин, обладают полезными свойствами. Именно поэтому чай из листьев облепихи считается хорошим лекарственным средством.

Серотонин



обнаружен в 37 видах растений из 17 семейств. Отдельные примеры содержания серотонина в растениях приведены в табл. 1.7.

Таблица 1.7

Содержание серотонина в растениях (мкг·г⁻¹ сырой массы)

(В. В. Рощина, 1991)

Вид	Орган	Содержание
<i>Mucuna pruriens</i>	Жгучие волоски плодов	150
<i>Phaseolus multiflorum</i>	Листья	0,6–1,0
<i>Pisum sativum</i>	Листья, стебли	0,9–1,0
<i>Peganum harmala</i>	Листья (культура ткани)	18 200
<i>Musa sapientum</i>	Плод (кожура)	1–41
	Плод (мякоть)	40–150
<i>Urtica dioica</i>	Жгучие волоски	3,5

Количество серотонина варьирует в зависимости от таксономического положения растения. Для многих растений оно приблизительно такое же, как и у млекопитающих, а у некоторых плодов и семян высокая концентрация его коррелирует с содержанием у некоторых видов моллюска *Ostorus*.

Наблюдается неравномерное распределение серотонина между органами растений: в плодах и семенах растений содержится в 100 и более раз больше серотонина, чем в вегетативных органах. Серотонин, который накапливается в жгучих волосках крапивы или бархатных бобов *Mucuna pruriens*, предохраняет от поедания растений травоядными животными.

Содержание серотонина зависит от фазы развития растений. Например, у африканского бобового растения *Griffonia simplicifolia* в вегетативный период накапливается до 1,3 мкмоль/г сырой массы, а в репродуктивный — до 0,3 мкмоль/г сырой массы.

Серотонин присутствует в различных овощах и фруктах. Так, в томатах — 12 мг/кг серотонина, в сливах — до 10 мг/кг. В случае употребления большого количества томатов в организм может попасть фармакологически активная доза серотонина.

Полагают, что такие соединения, как серотонин, синтезируются (например, в семенах ореха *Juglans regia*), чтобы снизить концентрацию ионов аммония.

Внутриклеточная локализация серотонина у растений точно неизвестна. Предполагают, что серотонин запасается в белковых тельцах семядолей развивающихся зародышей семян, в которых нет еще вакуолей, и, наоборот, в клетках стрекательных волосков у рода *Urtica* серотонин локализуется в вакуолях.

В нейронах серотонин локализован в клатриновых секреторных пузырьках. Поскольку аналогичные структуры встречаются у растений, то допускают в них нахождение серотонина.

Метаболизм серотонина. Синтез серотонина осуществляется из триптофана, образованного в шикиматном пути и локализованного в пластидах (рис. 1.6).

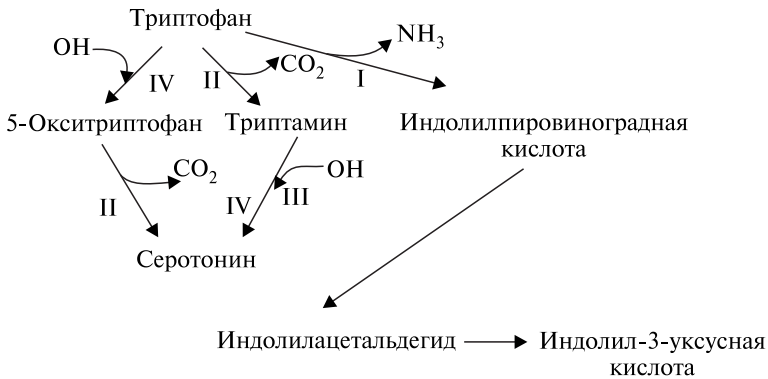


Рис. 1.6. Образование серотонина и индолиуксусной кислоты из триптофана: I – триптофандекарбоксилаза;

II – декарбоксилаза ароматических кислот;

III – триптамин-5-гидроксилаза; IV – L-триптофан-5-гидроксилаза
(В. В. Рощина, 1991)

На первой стадии биосинтеза в растениях происходит декарбоксилирование триптофана с образованием триптамина при участии фермента триптофандекарбоксилазы или декарбоксилазы ароматических кислот. Затем триптамин превращается в серотонин путем гидроксилирования с помощью триптамин-5-гидроксилазы или L-гидроксилазы. Фермент найден в листьях, черешках, лепестках, корнях и семенах *Griffonia simplicifolia*. Реакция протекает в присутствии O₂.

Для животных в большей мере характерен другой путь, хотя он также имеет место и у растений, а именно: гидроксилирование (IV) триптофана приводит к образованию 5-окситриптофана при участии триптофан-5-гидроксилазы. Затем 5-окситриптофан декарбоксилируется декарбоксилазой ароматических кислот (II), превращаясь в серотонин.

ИУК у растений образуется из аминокислоты триптофана через такие промежуточные продукты, как индолилпируват и индолилацетальдегид. Полагают, что метаболизм триптофана, неспособного аккумулироваться в клетке, направлен на образование серотонина и ИУК для детоксикации аммония.

Место синтеза серотонина в растительной клетке точно не установлено (у животных – аппарат Гольджи).

Катаболизм серотонина в растениях направлен либо на метилирование с помощью ТМТ, либо на окислительное дезаминирование с участием MAO (рис. 1.7).

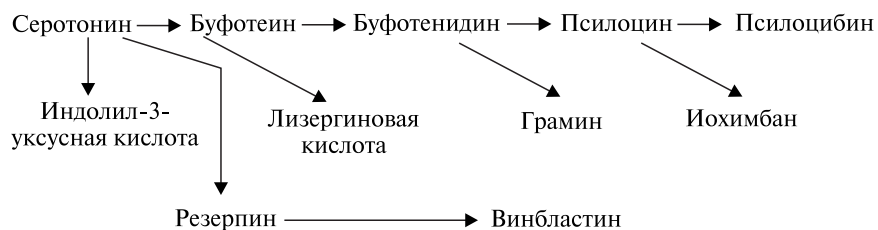


Рис. 1.7. Метаболизм серотонина в растениях
(В. В. Рощина, 1991)

Метилированные производные серотонина (буфотеин, буфотенидин, псилоцин, псилоцибин) найдены у амфибий, грибов и растений. Буфотеин обнаружен у гриба поганки *Amanita mappa*, в семенах растений рода *Piptadenia*. Серотонин является предшественником буфотенина у дерева *Piptadenia peregrina*, богатого индоламинами и растущего на Карибских островах и в Южной Америке.

Псилоцин и псилоцибин образуются непосредственно из серотонина в грибах *Psilocybe aztecorum*. Все эти алкалоиды вызывают у человека галлюцинации. Предполагают, что у человека они образуются эндогенно, что является возможной причиной психических расстройств.

У ячменя, кроме указанных алкалоидов, найдено производное серотонина – алкалоид грамин, хотя прямой синтез его из серотонина не доказан. Грамин очень токсичен для пастбищных животных и может быть природным регулятором роста при конкуренции в фитоценозах.

Помимо метилирования и окислительного дезаминирования конденсация изопентильной группы с индольным ядром серотонина может приводить к синтезу алкалоидов группы – резерпина, иохимбана, иохимбина и винбластина. Этот путь лишь предполагается.

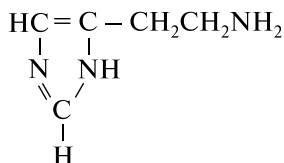
Резерпин из индийского растения *Rauwolfia serpentina* применяется при укусе змей, он понижает кровяное давление, освобождая ткани животных от избытка серотонина, дофамина и норадреналина.

Иохимбин и иохимбан найдены в коре африканского дерева *Corynanthe yohimbe* и использовались первоначально как средство, возбуждающее сексуальную активность.

Винбластин выделен из *Catharanthus roseus* и применяется как противовирусный и противоопухолевый агент.

Гистамин. В конце XIX в. химики А. Виндаус и В. Фогт обнаружили *гистамин*, который был синтезирован в 1907 г. Впоследствии его выделили также из гриба спорыньи *Claviceps purpurea* и тканей животных. В природе гистамин встречается в значительном количестве во многих растениях и животных тканях, освобождается при повреждениях тканей.

Гистамин



найден у 48 видов из 26 семейств, начиная от базидиомицетов до покрытосеменных растений (табл. 1.8).

Таблица 1.8

Содержание гистамина в растениях (мкг/г сырой массы)
(В. В. Рощина, 1991)

Семейство и вид	Орган	Содержание
<i>Mimosa</i>	Листья	2,7–13,3
<i>Citrus vulgaris</i>	Листья	17,3
<i>Laportea</i>	Листья, плоды	2,2-50
<i>Urtica dioica</i>	Листья	11,3–43,6
<i>Urtica urens</i>	Листья	20–143,5

Гистамин в стрекательных волосках служит для отпугивания животных, у которых он вызывает ожоги, боль и аллергические реакции. В среднем количество гистамина в растениях достаточно для сильного болевого ощущения.

В клетках животных содержание гистамина значительно выше: у лошади – 110 мкг/г сырой массы, в печени собак – 8 мкг/г, в молоке млекопитающих – 0,5 мкг/г. При стрессах оно повышается.

У растений резкое возрастание гистамина наблюдается при засухе, например у подсолнечника.

Биосинтез и катаболизм гистамина. В тканях животных гистамин образуется непосредственно при внутриклеточном декарбоксилировании гистидина декарбоксилазой. Вероятно, такой же путь синтеза и у растений, где обнаружена заметная активность фермента (рис. 1.8).

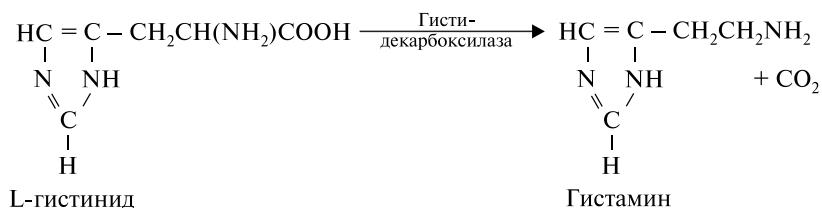


Рис. 1.8. Образование гистамина
(В. В. Рошина, 1991)

Для образования гистамина достаточно только декарбоксилирования.

Пути ферментативной инактивации гистамина чаще всего связаны с окислительным дезаминированием с образованием имидазолуксусной кислоты. Еще один из путей обмена гистамина — метилирование азота в имидазольном кольце гистамина с последующим окислением его до метилимидазолуксусной кислоты. Третий путь катаболизма состоит в ацетилировании аминогруппы боковой цепи гистамина в ацетилгистамин. Наконец, возможно метилирование аминогруппы боковой цепи гистамина до диметилгистамина.

Вероятный путь катаболизма гистамина у растений — дезаминирование с участием моноамино- и диаминооксидаз, поскольку у них присутствуют указанные ферменты. МАО обычно находятся в митохондриях, а диаминооксидаза — в пузырьках из аппарата Гольджи и ЭПР. МАО участвует в катаболизме первичных, вторичных и третичных аминов, а ДО — чаще всего инактивирует гистамин и диамины (путресцин, спермидин, кадаверин).

В молекуле гистамина имеются две реактивные группировки — иминогруппа ядра (NH-) и аминогруппа боковой цепи (NH₂-). Эти группы участвуют в образовании производных гистамина (рис. 1.9).

Иминоазот кольца может подвергаться метилированию с образованием 3-метилгистамина или конъюгироваться с рибозой с образованием рибозида и гистаминдинуклеотида. Аминогруппа боковой цепи может подвергаться метилированию с образованием N-метилгистамина и N'-диметилгистамина. Гистамин является предшественником в синтезе имидазольного алкалоида долихотелина, который образуется кон-

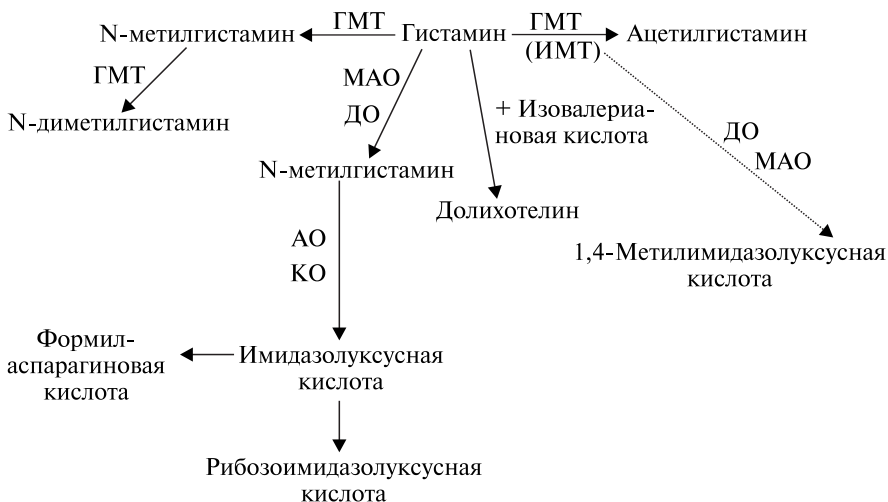
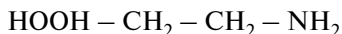


Рис. 1.9. Схема катаболизма гистамина
(В. В. Рощина, 1991)

денсацией биогенного амина и изовалериановой кислоты или изовалерил-КоА у кактуса *Dolichothele sphaerica*.

Гамма-аминомасляная кислота. ГАМК



является продуктом метаболизма нервных клеток; наиболее значительно ее содержание в клетках центральной нервной системы. Важнейшая физиологическая функция – роль медиатора торможения. Предполагается, что молекула ГАМК, связываясь со специфическими рецепторами постсинаптической мембраны, активизирует хлорные каналы, вызывая гиперполяризацию мембраны. Выделенный рецептор ГАМК оказался отличным от рецептора АХ.

ГАМК выполняет и ряд других регуляторных функций, прежде всего в мозговой ткани: оказывает влияние на транспорт и утилизацию глюкозы, процессы дыхания, окислительного фосфорилирования. Важную роль ГАМК играет в развитии реакции организма на различные неблагоприятные воздействия – гипоксию, физические нагрузки, ионизирующие излучения и др.

ГАМК образуется из глутаминовой кислоты путем ее декарбоксилирования ферментом глутаматдекарбоксилазой (рис. 1.10).

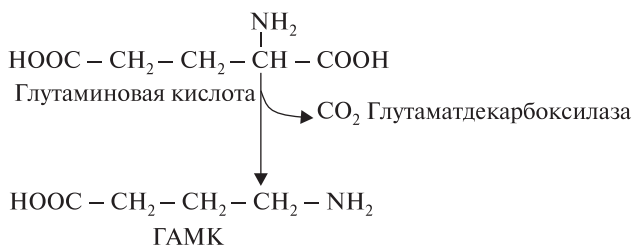


Рис. 1.10. Схема синтеза гамма-аминомасляной кислоты
(В. Л. Кретович, 1980)

Эта аминокислота обнаружена в свободном виде во всех растениях. Однако в доступной нам литературе не удалось найти сведений по ее локализации, содержанию, физиологическому значению в растениях.

Глава 2

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ У РАСТЕНИЙ

Способность генерировать электрические потенциалы – одно из универсальных свойств живых систем, которое играет важную роль в их жизнедеятельности. Роль биомедиаторов в животных тканях тесно связана с их участием в передаче внутриклеточных и межклеточных электрических импульсов. Рассмотрим электрические явления, происходящие в живых системах как при состоянии покоя, так и при возбуждении.

2.1. ПОТЕНЦИАЛ ПОКОЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Потенциал покоя является основной электрической характеристикой растительной клетки и соответствует ее состоянию во время физиологического покоя, когда обмен веществ находится в равновесном состоянии. Нарушение нормального физиологического состояния клетки неизбежно ведет к изменению величины ПП.

Существует множество типов растительных клеток. При упрощенном описании их строения постараемся сохранить лишь те детали, которые существенны для дальнейшего изложения.

Снаружи растительная клетка окружена оболочкой, чаще всего, состоящей из молекул целлюлозы и гемицеллюлозы. Клеточная оболочка заключает протопласт. Последний имеет цитоплазму (цитозоль) и вакуоль. Цитоплазма содержит сложно организованные включения, ответственные за важнейшие процессы жизнедеятельности – фотосинтез (хлоропласты), дыхание (митохондрии) и размножение (ядро). Обычно слой цитоплазмы со всеми включениями прилегает к клеточной стенке, а внутри протопласта большой или меньший объем занимает вакуоль – водный раствор различных солей и органических веществ. Иногда клетка имеет несколько вакуолей. Цитоплазма с прилегающей к клеточной стенке сто-

роны окружена плазматической мембраной (плазмалемма), а со стороны вакуоли – вакуолярной (тонопласт).

Измерение электрических параметров клетки и ее структурных элементов выполнить тем легче, чем крупнее ее размеры. Поэтому большинство измерений на первых этапах было проведено на клетках водорослей, имеющих большие размеры.

Для измерения РЭП чаще всего используются микроэлектроды, которые представляют собой тонкие стеклянные капилляры с открытым кончиком диаметром 1 мкм. Микроэлектрод заполняется раствором электролита (чаще всего 3 М КСl) и присоединяется со входом электрометрического усилителя с большим входным сопротивлением через хлор-серебряный или каломельный электроды. Второй электрод (электрод сравнения), находящийся в окружающем клетку растворе, также соединяется со входом усилителя (рис. 2.1).

Микроэлектрод можно вводить как в вакуоль, так и цитоплазму клеток. Чаще всего электрод попадает в вакуоль, поскольку слой цитоплазмы очень тонок. Микроэлектродная техника в последнее время с успехом используется при измерении потенциалов растительных клеток (водоросли, корневые волоски, колеоптилей, клетки запасующих тканей, листа и т. д.).

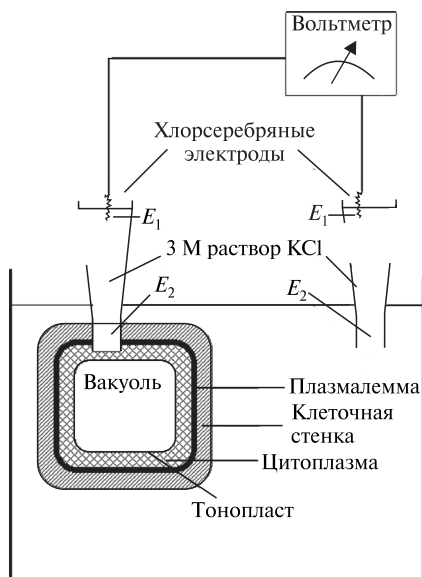


Рис. 2.1. Электрическая схема, применяемая для измерения мембранных потенциалов растительных клеток (Д. Кларксон, 1978)

Для понимания сути возникновения потенциала покоя возьмем сосуд, разделим его мембраной и в оба отсека нальем раствор электролита, например KCl разной концентрации – слева больше, справа меньше. Мембрана пропускает ионы калия, т. е. проницаема для калия и непроницаема для аниона (рис. 2.2).

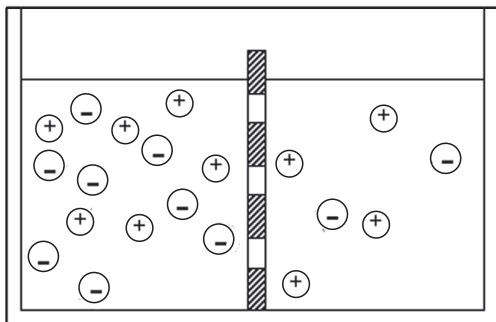


Рис. 2.2. Возникновение разности электрических потенциалов на избирательно проницаемой мембране

Допустим, что это регулируется диаметром отверстий в мембране, через которые ионы K^+ проходят, а анионы Cl^- – нет. В этой системе ионы калия будут стремиться покинуть левое отделение – их поток слева направо будет большим, чем в обратном направлении. Концентрация ионов Cl^- никаким перераспределением подвергаться не будет. Но именно поэтому по мере выхода ионов калия из левого отделения между обеими сторонами мембраны будет возрастать РЭП – слева окажется больше анионов, справа – катионов. А это значит, что возникшая сила начнет препятствовать поступлению K^+ в правое отделение (сила будет действовать справа налево со стороны раствора меньшей концентрации). Чем больше нарушается электронейтральность, тем больше эта сила. И, в конце концов, наступает некоторое равновесие – количество ионов калия, покидающих в единицу времени левое отделение из-за существующей разности концентраций, уравнивается с числом ионов, пересекающих мембрану в обратном направлении под действием возникшей РЭП.

Некоторые примеры величин мембранного потенциала растительных клеток приведены в табл. 2.1.

В любой живой системе существует РЭП, и было бы удивительно, если бы ее не было. Это означало бы абсолютное равенство концентраций электролита во всех клетках, органах, наружных растворах либо полное совпадение величин проницаемости мембран по всем катионам и анионам.

Мембранный потенциал растительных клеток
(Д. Кларксон, 1978)

Вид	Ткань	Величина РЭП, мВ
<i>Pisum sativum</i>	Кора корня	-110
	Эпикотиль	-119
<i>Avena sativa</i>	Калеоптиль	-102...-109
	Корни	-71...-84
<i>Zea mays</i>	Корни	-76...-104
<i>Vicia sativa</i>	Корни	-130
<i>Nitella</i>	Интернодальная клетка	-120...-150
<i>Nitellopsis obtusa</i>	Интернодальная клетка	-200...-250
<i>Halicystis</i>	Клетка	-80
<i>Valonia</i>	Клетка	+17

Учитывая сложное анатомическое строение растительной клетки, обусловленное наличием таких структурных элементов, как клеточная стенка, плазмалемма, тонопласт и т. д., кратко рассмотрим их электрические характеристики в покое.

При введении микроэлектрода в вакуоль растительной клетки регистрируются три скачка потенциала: на клеточной стенке, плазмалемме и тонопласте.

Потенциал покоя клеточной стенки. Клеточная стенка (оболочка) имеет отрицательный поверхностный заряд. Наличие этого заряда придает клеточной стенке отчетливо выраженные катионообменные свойства. Клеточная стенка характеризуется преимущественной избирательностью к ионам Ca^{2+} , который играет важную роль в регуляции проницаемости мембран по отношению к ионам K^+ и Na^+ .

Измеренный с помощью МЭ потенциал клеточной стенки харовых водорослей составлял $-40...-70$ мВ. У высших растений его величина, возможно, несколько ниже и равна $-20...-30$ мВ. Эти результаты указывают на то, что клеточная стенка вносит вклад в общую величину ПП растительной клетки.

Потенциал плазмалеммы. Измеренный с помощью микроэлектродной техники потенциал плазмалеммы клеток харовых водорослей составлял $-80...-100$ мВ, что заметно превышает величину потенциала клеточной стенки у этих же объектов.

Величина потенциала плазмалеммы у растительных клеток высших растений оказывается также весьма значительной (около -100 мВ и более) и часто совпадает с величиной ПП клетки.

Потенциал тонопласта. Величина потенциала тонопласта может быть обнаружена как на интактных клетках при введении одного МЭ в вакуоль, другого в цитоплазму, так и на изолированных вакуолях. Для изолированных вакуолей эта величина составляет 5–20 мВ, для интактных клеток 20–40 мВ, причем вакуоль электроположительна по отношению к цитоплазме.

Потенциал митохондрий и хлоропластов. Пока попытки измерения потенциала на митохондриальных мембранах с помощью МЭ остаются безуспешными. Оценки величины потенциала митохондрий у высших растений спектрофотометрическим методом дали величины 120–140 мВ.

Некоторым исследователям удалось осуществить измерение потенциала мембраны крупных хлоропластов ряда растительных объектов. Его величина в опытах на интактных клетках (измеренная по отношению к цитоплазме) и на изолированных хлоропластах (измеренная по отношению к среде) варьирует от 10 до 60 мВ.

Потенциал ядра. Среди прочих структур, которые могут иметь РЭП, следует рассмотреть мембрану ядра. Измерения проводились на изолированных ядрах *Acetabularia*, имеющих размер 80–150 мкм, с помощью МЭ. Измеренная разность потенциалов между МЭ, введенным в ядро, и электродом в культуральной среде, составляла 40–80 мВ.

Если рассматривать РЭП растительной клетки между вакуолью и наружной средой, то она определяется, главным образом, потенциалом плазмалеммы; это подтверждается результатами измерения на клетках харовых водорослей, корневых волосков и других тканей высших растений.

Различия в величине РЭП обнаруживают не только клетки разных органов, но также неодинаковые по функциональному назначению тканей одного и того же органа высшего растения. Например, среди тканей стебля наиболее высокие ПП имеют обычные клетки пучковой паренхимы. Для тыквы они достигают –200 мВ, в то время как величины ПП клеток основной паренхимы и эпидермиса стебля лежат в пределах –130...–160 мВ.

Тонопласт вносит значительно меньший вклад в электрогенез клетки высшего растения, чем плазмалемма. Тем не менее его способность к генерации РЭП, вероятно, весьма существенна для обмена веществ с вакуолью.

2.2. ВОЗБУДИМОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Все растения отвечают на действие ряда раздражителей приспособительными реакциями в виде ростовых движений, у некоторых растений наблюдается изменение тургора и т. д.

В данном случае нас интересуют раздражения, связанные с возникновением ПД. ПД могут возникать под влиянием различных видов раздражителей.

При действии раздражителей (свет, температура, химические агенты, механическое воздействие и т. д.) у растений возникает ПД, представляющий собой временное изменение РЭП между возбужденным участком и участком, находящимся в состоянии покоя. Он возникает вслед за раздражением и распространяется в виде волны возбуждения.

ПД, как и другие типы электрофизиологической реакции клетки, формируется на основе ПП. ПД возникает на определенную силу раздражения. ПД растения можно разделить на распространяющиеся, т. е. передающиеся от клетки к клетке в пределах органа или ткани, и местные, распространяющиеся в пределах только раздражаемой клетки.

Разработка соответствующей техники и интерес исследователей к электрическим процессам в растениях позволили уже в начале XX в. зарегистрировать ПД при их раздражении. Было установлено, что мембранный потенциал многих растительных клеток аналогично клеткам животного происхождения при раздражении сдвигается в сторону деполаризации. При определенной величине сдвига мембранного потенциала в положительную сторону до некоторого критического уровня и наблюдается ПД. Величину сдвига мембранного потенциала от исходного уровня до критического принято называть *пороговым потенциалом*. Чем меньше пороговый потенциал, тем выше возбудимость клетки.

По сравнению с ПД животных объектов ПД растительных клеток развивается медленно (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Сравнение характеристик потенциалов действия у животных и растительных объектов
(В. А. Опритов, С. С. Пятыгин, В. Г. Ретивин, 1991)

Объект	Продолжительность восходящей фазы, с	Скорость распространения, мм/с	Продолжительность рефрактерного периода	
			абсолютная	относительная
Клетки харовых водорослей	1	10–20	4–40	60–150 с
Черешки листьев мимозы	0,5	20–30	70–90	несколько мин
Лопасты ловушки <i>Dionaea</i>	0,1–0,2	60–170	0,6	< 30 с
Стебель тыквы	~ 6	7	5	26–40 мин
Люпин	—	—	12 мин	60–90 мин

Объект	Продолжительность восходящей фазы, с	Скорость распространения, мм/с	Продолжительность рефрактерного периода	
			абсолютная	относительная
Нервный тяж пресноводных, моллюсков	0,1	45	—	—
Нервные волокна млекопитающих	0,0004	100 000	0,0005	0,001–0,1 с

Другой отличительной особенностью является то, что ПД растительных клеток формируется на двух мембранах — плазмалемме и тонопласте. В свою очередь ПД на тонопласте развивается медленнее по сравнению с плазмалеммой. ПД на плазмалемме предшествует ПД на тонопласте.

Проводимость мембраны во время генерации ПД увеличивается, достигая своего максимума в пике ПД, затем возвращается к первоначальному уровню. Плазмалемма и тонопласт ведут себя аналогично, но для первой характерны большие изменения потенциала и проводимости.

В зависимости от внешних условий (состав среды, температура, свет и т. д.), а также от физиологического состояния клеток ПД имеет различную амплитуду и длительность. Как и в случае нервного волокна ПД может превысить нулевое значение потенциала, т. е. будет наблюдаться овершут.

В зависимости от условий среды, физиологического состояния и т. д. клетки способны генерировать различные по форме и величине ПД.

Для объяснения механизма генерации ПД растительной клеткой следует вспомнить общепринятую в настоящее время концепцию существования в мембранах ионных каналов, образованных макромолекулами специализированных белков. При возбуждении происходит изменение проводимости мембраны для соответствующих ионов в результате скачкообразных конформационных переходов отдельных каналов между закрытым и открытым состояниями. Для аксолемы считается доказанным, что эти «воротные» процессы могут обеспечиваться непосредственно электрическим полем в мембране, а каналы синаптических мембран активируются медиаторами.

Интерпретация механизмов электрогенеза в возбудимых клетках растений проводится на основе существующих представлений о потенциал-зависимых (управляемых полем) и хемоактивируемых (т. е. открываемых какими-либо молекулами) ионных каналах.

При изучении механизма генерации ПД клеток растений, в частности возбудимости клеток харовых водорослей, с помощью меченых атомов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Cl^-) было показано, что проводимость мембраны во время ПД возрастает в сотни раз к иону хлора.

Впоследствии было обнаружено существование еще одной не всегда четко проявляющейся компоненты входящего тока, как оказалось, связанной с потоком ионов кальция (Na^+/Ca^{2+} -канал).

Схема генерации ПД клеткой представлена на рис. 2.3.

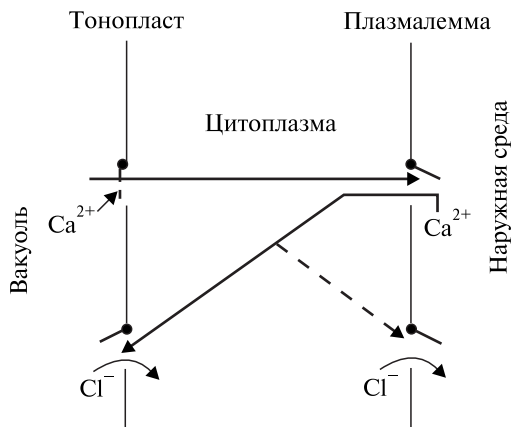


Рис. 2.3. Механизм возбуждения плазмалеммы и тонопласта харовой водоросли

При деполяризации мембраны ниже порогового уровня происходит активация электрическим полем Na^+/Ca^{2+} -каналов. Кальций, входя в цитоплазму (вероятно, независимо, откуда поступил кальций) активирует хлорные каналы плазмалеммы и тонопласта. Следовательно, фазу деполяризации обеспечивают возбудимые потенциалзависимые Na^+/Ca^{2+} -каналы и активируемые кальцием Cl^- -каналы. Фаза реполяризации ПД у харофитов обеспечивается нетто-потоками K^+ через K^+ -каналы.

Если мембрана клетки одинаково поляризована (заряжена), то можно ожидать реакцию по закону «все или ничего» и проведение возбуждения без декремента.

После прохождения ПД наблюдаются рефрактерные периоды: абсолютный и относительный. В первый период ПД невозможно вызвать никакой силой раздражителя. Во время относительного рефрактерного периода вызвать ПД возможно, но он будет отличаться и по форме, и по амплитуде.

Исходя из представлений ионной теории генерации ПД, абсолютный рефрактерный период представляет собой время, в течение которого мембрана лишена своей обычной избирательной проницаемости. При этом в клетку поступает Ca^{2+} , а калий выходит наружу, и клетка становится невозбудимой. Первоначальное состояние поляризации восстанавливается во время относительного рефрактерного периода. Периоды повышенной и пониженной возбудимости обусловлены тем, что ионы не перераспределились и их внутриклеточное содержание не соответствует состоянию покоя. Следовательно, в таком случае ответная реакция может быть вызвана, но для этого требуется более сильная стимуляция.

Процесс распространения ПД связан с тем, что от невозбужденных положительно заряженных участков мембраны по направлению к раздраженному деполяризованному и отрицательно заряженному участку протекают местные токи, и по мере того, как все новые участки мембраны деполяризуются и приобретают отрицательный заряд, начинают вести себя подобно «стоку», к которому течет электрический ток от соседних участков. По этой причине распространяющаяся деполяризация направлена от точки раздражения наружу. Перед распространяющейся волной ПД (рис. 2.4) будет перемещаться область деполяризации мембранного потенциала клетки.

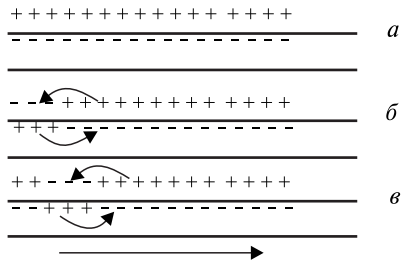


Рис. 2.4. Схема распространения потенциала действия:

a – невозбужденная мембрана;

б – мембрана, возбужденная на одном конце;

в – распространение тока с последующим восстановлением

(А. Гизе, 1989)

Было установлено, что ток обусловлен потоком ионов хлора. В этом заключается так называемая теория местных токов, предложенная для объяснения распространения ПД.

Если речь идет о впервые возникшем очаге возбуждения, например в месте раздражения, то волна ПД распространяется в обе стороны. Если волна движущаяся, то возбуждаются участки только перед ней, так как остающиеся позади находятся в состоянии рефрактерности.

Реполяризация поверхности возбужденной мембраны наступает вслед за окончанием рефрактерного периода и протекает с такой скоростью, что за данный промежуток времени деполяризуется лишь небольшой участок мембраны.

2.3. ТИПЫ И ПРИРОДА РАСПРОСТРАНЯЮЩИХСЯ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Как уже отмечалось, растения обладают раздражимостью — способностью быстро и скоординированно реагировать на определенное внешнее воздействие, причем эта реакция может передаваться от места раздражения к различным органам, более или менее от него удаленным.

Раздражимость и возбудимость живых систем разных уровней организаций зависят во многих случаях от возникновения и передачи электрического сигнала. Рассмотрим более подробно явления, связанные с возникновением и передачей электрического возбуждения в высших растениях. В основу положены результаты, опубликованные в работах В. А. Опритова с сотрудниками.

Многочисленные электрофизиологические данные, полученные к настоящему времени, показали, что у высших растений существуют два типа биоэлектрической реакции.

Одним из способов распространения возбуждения считают волну, имеющую форму ПД. Она возникает в ответ на неповреждающие стимулы: умеренное охлаждение, электрический разряд, слабое механическое воздействие с правилом «все или ничего».

Многие растения в определенных условиях способны генерировать ПД. Например, зарегистрировано распространение волны ПД в стебле винограда (рис. 2.5).

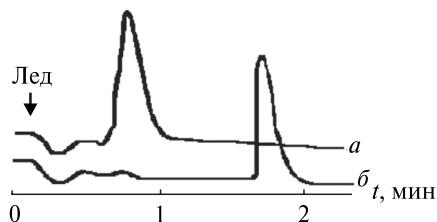


Рис. 2.5. Биоэлектрическая реакция вдоль сегмента стебля винограда: вид ПД вблизи (a) и на некотором расстоянии (b) от места раздражения (В. G. Pickard, 1973)

Однако, по мнению некоторых ученых, хотя эти явления и распространены в растительном мире, они могут отсутствовать у определенных видов. ПД зарегистрированы у тыквы, фасоли, подорожника, липы, кукурузы, гороха, подсолнечника, свеклы, у растений – представителей семейства бобовых, вьюнковых, молочайных, посленовых, гречишных и др.

В экспериментах на черешке мимозы ПД возникает (при раздражении электрическим током) по правилу «все или ничего». Другие стимулы также вызывают распространяющуюся электрическую реакцию, если не являются повреждающими. ПД распространяется вдоль стебля или черешка мимозы со скоростью 1–3 см/с длительностью несколько секунд.

Возникновение ПД вызывает стимул определенной силы, величина и характер ПД не меняются под воздействием большего по величине раздражителя.

Итак, можно считать, что электрические импульсы, возникающие у высших растений, могут обладать всеми или почти всеми характеристиками типичного ПД.

2.4. ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПЕРИОДА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Что касается рефрактерности, то у растений просматривается аналогия с нервным импульсом. Как уже отмечалось, рефрактерность, или пониженная способность реагировать генерацией электрических импульсов на повторные внешние воздействия, характерна для возбудимых систем. В период абсолютной рефрактерности генерация и распространение ПД отсутствуют, а в период относительной рефрактерности способность к их осуществлению понижена.

Длительность абсолютного и относительного периодов для возбудимых клеток и тканей некоторых локомоторных высших растений установлена сравнительно давно. У венериной мухоловки такие периоды составляют 0,6 и 30 с соответственно, у биофитума – 20–30 и 30–70 с, у мимозы – 75–90 с и несколько минут. Видно, что особенностью высших растений на этом заключительном этапе цикла возбуждения, как и на этапе генерации самого ПД, является значительная длительность временных характеристик процесса; и чем продолжительнее пик ПД у данного растения, тем дольше длится рефрактерное состояние после его генерации.

Для обычных высших растений (рассмотрим люпин) обнаружено, что после прохождения первого ПД в стебле при повторной стимуляции любой силы зарегистрировать распространяющийся ПД на расстоянии от зоны раздражения 1–1,5 см не удается в течение ~12 мин – абсолютный

рефрактерный период. Затем в течение еще более значительного интервала времени (80–90 мин) отмечается постепенное восстановление исходной способности проводить ПД. Время от 12 до 90 мин обозначено как относительный рефрактерный период. Различны начальная и конечная фазы этого периода. Сначала наблюдаются импульсы, исчезающие на расстоянии нескольких сантиметров от места стимуляции. Через ~80–90 мин способность ПД распространяться вдоль всего стебля восстанавливается.

Характеристика периода рефрактерности у высших растений исчерпывается только оценкой порога возбуждения в месте раздражения, амплитудой при удалении от этого места и временем до начала возможного раздражения. Скорость распространения повторного импульса оказывается значительно меньше, чем предыдущего. Так, для стебля тыквы она составляет 7,5; 4,3 и 2,1 мм/с для первого, второго и третьего импульсов соответственно (интервал между воздействиями – 18 мин).

Это говорит о том, что если для генерации ПД в месте раздражения рефрактерный период уже закончился, то для распространения импульсов по проводящим тканям он еще имеет место. Продолжительность последнего импульса равны 26–40 мин.

Основываясь на полученных данных, было сделано заключение, что по крайней мере у некоторых высших растений для характеристики рефрактерности проводящих тканей целесообразно указывать не один, а два периода рефрактерности: период рефрактерности для генерации фронта ПД в ответ на надпороговое раздражение (5–12 мин для стебля тыквы) и период рефрактерности для распространения ПД (26–40 мин для тыквы и ~90 мин для стебля люпина).

Возникает вопрос о причинах существования различных рефрактерных состояний высших растений.

Генерация фронта ПД в зоне раздражения в первую очередь связана с инактивацией ионных каналов в абсолютный рефрактерный период. Начальная фаза относительной рефрактерности обусловлена возвращением каналов в покоящееся, готовое к активации состояние. Последующую роль в окончательном восстановлении способности генерировать фронт ПД в клетках проводящих тканей, как предполагают, должен играть активный ионный транспорт, восстанавливающий после генерации ПД исходный ионный гомеостаз. Что касается рефрактерного периода, то на разных этапах, по-видимому, действуют разные причины. В абсолютный рефрактерный период возникающее местное возбуждение из-за низкой величины и скорости нарастания деполяризации в зоне раздражения не может переходить на соседние нераздражаемые внешним воздействием клетки, поскольку локальные токи, замыкающиеся в них, вероятно, не обеспечивают пороговую деполяризацию.

В период относительной рефрактерности на способность к передаче возбуждения влияет пониженная способность клеток пучка к быстрой деполяризации, т. е. их собственная низкая возбудимость.

Заключительный период относительной рефрактерности может быть связан с состоянием плазмодесм (закрывание) и выходом участвующих в генерации ПД ионов (K^+ и Cl^-) из цитоплазмы.

Отмечая универсальность ПД, необходимо, тем не менее, указать на своеобразный характер проявления ПД у высших растений. Они имеют более растянутые временные параметры, по сравнению, например, с хара-выми водорослями. В одних случаях высшие растения распространяются на значительные расстояния по тканям растений, в других распро-странение ограничено пределами раздражаемых клеток.

2.5. ПУТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ И МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Органом, в котором происходит преимущественное распростране-ние ПД у высших растений, является стебель. По данным, корни и ли-стья не обладают этой способностью. Мнения о том, что ПД могут рас-пространяться и по листу, носят единичный характер и не получили пока уверенного подтверждения. В то же время генерация ПД происходит при нанесении раздражения не только на стебель, но и на корень, лист и дру-гие части растения.

В вопросе о том, по каким тканям осуществляется распространение ПД, можно выделить две точки зрения. Согласно одной, в распростране-нии ПД могут участвовать все ткани стебля. Этот взгляд основывается на том, что электрические ответы типа ПД регистрируются в месте раз-дражения во всех клетках стебля. В ряде случаев удается зарегистрировать ПД небольшой амплитуды в непучковых клетках стебля и на расстоянии от раздражаемого участка.

Согласно второй точке зрения, каналом распространения ПД в сте-бле высших растений являются проводящие ткани (пучки).

Для подтверждения важной роли проводящих пучков в распростране-нии ПД использовалось несколько подходов: препарирование проводящих тканей, в разной степени затрагивающее их целостность; наложение на стебель механического блока, позволяющего дозированно нарушать основную паренхиму и проводящие ткани. Наиболее интересны работы, в которых роль проводящих пучков в распространении ПД выяснялась с помощью электрофизиологических приемов при введении зонда.

Рассмотрим подробнее наиболее интересный случай – проведение электрического импульса в стебле или листовом черешке. Основные результаты здесь были получены Дж. Босом еще в начале XX в. Работая с листовым черешком мимозы, Дж. Бос применил метод зонда. Его зонд представлял собой стальную иглу, погружение которой в ткань черешка регулировалось микрометричным винтом. Игла зонда вводилась все глубже и глубже во все ткани черешка; при каждом ее погружении черешок возбуждал и регистрировал электрический сигнал. На начальных стадиях погружения иглы в ткань ответа либо не было вовсе, либо возникал электрический импульс незначительной силы, однако при более глубоком погружении регистрировалась волна ПД. Сопоставляя данные о глубине погружения зонда с результатами микроскопического анализа среза черешка, Дж. Бос установил, что проведение ПД осуществляется через ткань главного сосудистого пучка.

Более поздние исследования, выполненные в СССР И. И. Гунаром и Японии Т. Сибаккой, позволили значительно детализировать картину, установленную Дж. Босом. Сосудистые пучки состоят, по крайней мере, из двух групп клеток: крупных ситовидных трубок и более мелких продолговатых паренхимных клеток. Как оказалось, основную роль в проведении электрического сигнала играют как раз паренхимные клетки. Напомним теперь описание механизма возникновения ПД, приведенное ранее. Для того чтобы клетка могла генерировать ПД, она должна быть заряжена отрицательно по отношению к окружающей ее ткани. Оказалось, что ПП чувствительных проводящих возбуждение клеток существенно больше (по абсолютной величине) потенциала окружающих клеток, и эта величина составляет около -160 мВ. При прохождении волны ПД в его пике величина резко снижается (у мимозы – до 29 мВ), что в точности напоминает картину, наблюдаемую на аксоне или клетке харовой водоросли.

При удалении на значительном расстоянии ткани, окружающей проводящие пучки, электрическая волна свободно распространялась через отпрепарированный участок, но при повреждении самих пучков проводимость полностью или почти полностью исчезает.

Все проведенные исследования приводят к заключению о важной роли проводящих пучков в распространении ПД. В связи с этим встает вопрос о том, как следует отнестись к данным, указывающим на участие в этом процессе и других тканей стебля.

Не вдаваясь в подробности, отметим, что на основании анализа экспериментальных данных с учетом кабельных свойств тканей стебля тыквы, В. А. Опритовым с сотрудниками были сделаны следующие выводы. Бездекрементное распространение ПД в стебле осуществляется в проводящих пучках. Внепучковые клетки основной паренхимы и эпидермиса,

по-видимому, принимают активное участие в восприятии раздражения, возбуждаясь и генерируя фронт ПД, но в отличие от пучковых клеток сами способностью к бездекрементному распространению ПД не обладают. Это, очевидно, связано с более высокой электропроводностью симпласта внутри пучков.

У высших растений имеется специальный канал, обеспечивающий быстрое перемещение волны возбуждения. Как уже отмечалось, он представлен удлинненными паренхимными клетками внешней флоэмы и протоксилемы (внутренней флоэмы). Вполне возможно, что сюда следует отнести также и некоторые клетки метаксилемы, хотя этот вопрос ждет окончательного решения.

В последнее время появился ряд доказательств аналогичности механизмов генерации ПД в клетках проводящих тканей высших растений и клетках харовых водорослей. Так, механизм генерации ПД у высших растений связан с резким увеличением хлорной (анионной) проницаемости, возникновением значительного деполяризирующего хлорного и реполяризирующего калиевого потоков, направленных из возбудимых паренхимных клеток пучков в апопласт и ситовидные трубки.

Ионы Ca^{2+} входят по градиенту в возбудимые паренхимные клетки проводящих тканей из апопласта и необходимы для возникновения ПД.

Вместе с тем ионные механизмы ПД у высших растений имеют различия с харофитами. У высших растений значительная часть потенциалопределяющих ионов выходит при распространении электрического импульса из возбудимых клеток проводящих тканей в апопласт и прилегающие ситовидные трубки, вызывая существенное нарушение ионного гомеостаза в проводящих тканях в целом.

Это объясняется тем, что мелкие клетки проводящих тканей имеют десятки раз большую площадь поверхности возбудимой мембраны, приходящуюся на единицу объема ионной среды по сравнению с клетками водорослей.

Такая отличительная особенность возбудимых структур высших растений находит свое отражение в больших ионных сдвигах, наблюдаемых при распространении ПД. Эти сдвиги прослеживались в экссудате ситовидных трубок стебля тыквы, в пасоке, вытекающей из сосудов ксилемы декапированных стеблей подсолнечника, в межклетниках, сосудах ксилемы и ситовидных трубках листового черешка мимозы. Пока не удалось зарегистрировать ионные сдвиги, возникающие при генерации ПД непосредственно в возбудимых клетках. Однако анализ электрохимических градиентов показывает, что в основе всех перечисленных выше сдвигов лежат пассивные ионные потоки, берущие свое начало из паренхимных клеток проводящих тканей.

Возникновение значительных ионных сдвигов при генерации одиночного ПД в проводящих тканях высших растений должно сопровождаться обязательным восстановлением исходного ионного гомеостаза, нарушенного при возбуждении. Пока это восстановление не произойдет, следующий ПД нормально генерироваться не может (рефрактерный период).

По своим электрохимическим характеристикам паренхимные клетки стебля наиболее приспособлены для генерации и распространения возбуждения. Они имеют наиболее высокие значения РЭП (табл. 2.3), большая часть которых создается электрогенной H^+ -АТФазной помпой, и обладают наиболее высоким, направленным наружу электрохимическим градиентом для иона Cl^- – основного деполяризующего иона.

Таблица 2.3

Мембранные потенциалы клеток различных тканей стебля тыквы

(В. А. Опритов, С. С. Пятыгин, В. Г. Ретивин, 1991)

Вид ткани	Значения мембранного потенциала, мВ	Средние размеры клеток, мкм
Эпидермис	$-161 \pm 2,5$	$130 \cdot 17$
Основная паренхима	$-66...-138$	$(200 \cdot 80)-(80 \cdot 50)$
Паренхима ксилемы	$-162 \pm 2,9$	$90 \cdot 11$
Ситовидные трубки	$-100 \pm 1,9$	$450 \cdot 30$
Паренхима флоэмы	$-189 \pm 1,6$	$120 \cdot 11$

В процессе возбуждения пучковых клеток стебля способностью к распространению электрического возбуждения в форме ПД обладают только клетки проводящих тканей стебля, хотя местный ответ на надпороговое внешнее воздействие генерируется и во внепучковых клетках.

Накопленные результаты позволили В. А. Опритову с сотрудниками выдвинуть концепцию о сопряжении генерации ПД у высших растений с работой электрогенной H^+ -АТФазной помпы возбудимой плазматической мембраны. Особенность ионного механизма генерации ПД в возбудимых клетках высших растений иллюстрирует схема на рис. 2.6.

Она заключается в том, что одиночный цикл возбуждения включает обязательный этап активного восстановления нарушенного ионного равновесия, идущий с затратой метаболической энергии, т. е. связан с функционированием H^+ -помпы.

Второй тип распространения возбуждения – специфические биоэлектрические реакции высших растений – «медленная волна». Она возникает в ответ на повреждения (механическое, ожог) и имеет изменчивую форму. Эту БЭР называют *вариабильным потенциалом* (ВП). При слабых

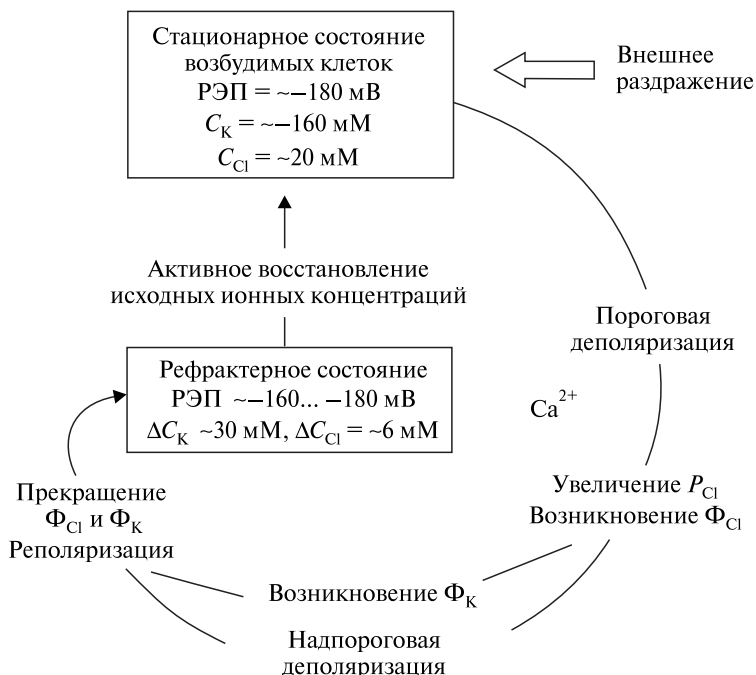


Рис. 2.6. Электрохимические процессы при одиночном цикле возбуждения в возбудимых клетках проводящих тканей (В. Г. Ретивин, 1988)

повреждениях ВП имеет амплитуду десятков милливольт длительностью порядка 10 мин. При более сильных воздействиях амплитуда ВП градуально увеличивается до $\sim 200 \text{ мВ}$ и может длиться более часа.

ВП имеет две компоненты: спайковую и нерегулярной формы (рис. 2.7). ПД отличается от ВП большей скоростью распространения. ВП часто сам вызывает ПД. Физиологический эффект, инициируемый ВП и ПД, одинаковый, например у мимозы – складывание листиков, но ВП вызывает движение не только того листа, на которое нанесено раздражение, но и нескольких последующих листьев. Более того, ВП может возникать в период абсолютного рефрактерного периода.

Наиболее характерное качество ВП – способность проходить через убитые ткани. Таким образом, распространяющееся возбуждение у высших растений может иметь химическую природу связанного с движением раневого вещества, названного впоследствии фактором Рикка.

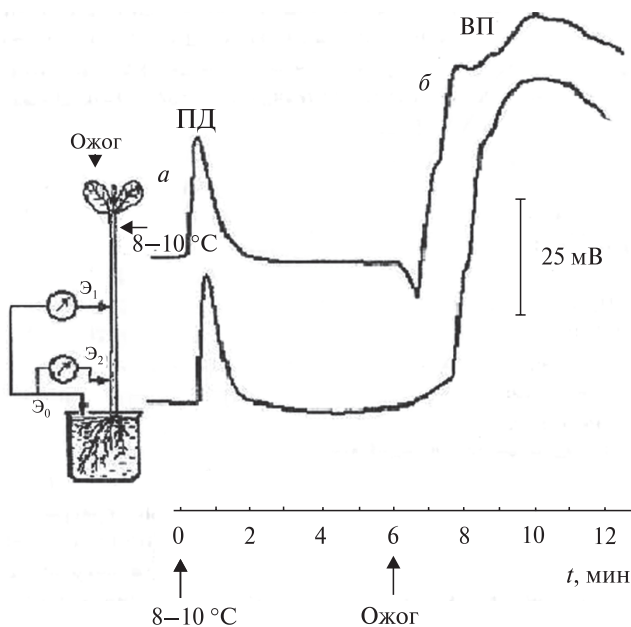


Рис. 2.7. Электрические реакции проростков тыквы на охлаждение и последующий ожог, регистрируемые двумя электродами (\mathcal{E}_1 и \mathcal{E}_2): *a* – спайковая компонента; *б* – компонента нерегулярной формы (В. А. Опритов, С. С. Пятыгин, В. Г. Ретивин, 1991)

С другой стороны, существует альтернативная гипотеза о чисто электрическом механизме распространения ВП. Такой вывод был сделан из данных, полученных на стебле традесканции; скорость распространения ВП хорошо совпадала с теоретическими величинами, рассчитанными из частного решения кабельного уравнения.

Б. Пиккард с соавторами не отрицает гипотезы химического индуктора: повреждение вызывает высвобождение раневого вещества, которое движется по сосудам проводящих тканей и, диффундируя по апопласту и окружающим живым клеткам, деполяризует их в соответствии с масштабами повреждения, т. е. пропорционально концентрации раневого вещества в русле дальнего транспорта. Таким образом, генерируется ВП. Когда раневое вещество попадает в электровозбудимые ткани, оно вызывает (если такие ткани есть) ПД, распространяющийся впереди ВП или сливающийся иногда так, что различим лишь передний фронт ПД. Отличительные черты ВП от ПД приведены в табл. 2.4.

**Основные отличия между потенциалом действия
и переменным потенциалом**
(В. А. Воденев [и др.], 2007)

Параметр	ВП	ПД
Индукция	Гидравлический сигнал или раневое вещество	Деполаризация до уровня порога возбуждения
Стимулы	Повреждающие (ожог, механическое повреждение и др.)	Неповреждающие (умеренное изменение температуры, изменение освещенности, механическое раздражение, электростимуляция)
Длительность	Длительность фазы реполяризации может достигать нескольких десятков минут	От долей секунды до нескольких десятков секунд
Амплитуда	Амплитуда пропорциональна степени повреждения; снижается по мере удаления от зоны повреждения	Постоянная, в соответствии с законом «все или ничего»; не изменяется по мере распространения
Скорость распространения	Уменьшается с увеличением расстояния до зоны повреждения	Постоянная

Если основываться на такой модели ВП, то можно заключить, что электрическая реакция на повреждение, очевидно, никогда не является химически индуцированным ВП в чистом виде, а всегда представляет собой комбинацию электрического возбуждения. В тех растениях, органах или тканях, которые не могут в силу слабой межклеточной электрической связи передавать ПД из клетки в клетку, импульсы ПД тем не менее могут возникать в отдельных клетках за счет деполаризирующего раздражающего действия первых порций диффундирующего раневого вещества.

Поэтому местные ПД или локальные ответы в тех случаях, когда масштабы повреждения невелики, должны определять формирование спайковой компоненты ВП. Эта компонента генерируется раньше компоненты нерегулярной формы, т. е. опережает ВП, вызываемый химическим

воздействием, но она не может «оторваться» и уйти вперед, поскольку не способна к самостоятельному распространению на далекие расстояния. Аналогичная ситуация наблюдается и у способных к межклеточной передаче ПД растительных объектов, но находящихся в рефрактерном состоянии.

Что касается природы вещества (вещества, вызывающего ВП), то это соединение не идентифицировано.

На роль медиатора в химическом механизме распространения возбуждения у высших растений претендует ряд соединений. Кроме того, как уже отмечалось, существует и альтернативная гипотеза об электрическом механизме распространения ВП.

Передача электрического сигнала у высших растений между отдельными клетками обеспечивается специализированными структурами — плазмодесмами.

Следует еще учесть, что у вытянутых клеток плазмодесмы сосредоточены главным образом у торцов так, что предпочтительная передача сигнала должна осуществляться в продольном направлении.

В тканях высших растений значительное количество плазмодесм обнаружено там, где выполнение специфических функций требует осуществления надежной связи, например в тканях железок между отдельными клетками, а также между железистыми клетками и окружающей паренхимой. Наоборот, там, где функция клеток требует изоляции от окружающей ткани, плазмодесм мало или вообще нет.

Это подтверждается наличием электрической связи между клетками растений. Ее можно продемонстрировать сравнительно простым способом. Если ввести в отдельную клетку ткани токовый электрод, а микроэлектроды для измерения РЭП — в эту же и соседнюю клетки, то, подавая импульс тока, можно обнаружить изменения потенциала не только в этой клетке, но и в соседней. Результаты свидетельствуют о том, что между клетками существует определенная электрическая связь.

Для характеристики электрической связи между клетками вводится такое понятие, как *коэффициент электрической связи*:

$$K = \Delta\psi_i / \Delta\psi_g.$$

Как показывает анализ литературных данных, электрическая связь для разных видов тканей и клеток растений различна. В одном случае коэффициент электрической связи для соседних клеток листа элодеи оказался равным 0,2, в другом — 0,7, а для клеток паренхимы колеоптиля *Avena* он либо вообще не был обнаружен, либо равнялся 0,2 (табл. 2.5).

Таблица 2.5

Электрическая связь растительных клеток
(У. Люттге, Н. Хигинботам, 1984)

Объект	Коэффициент электрической связи
<i>Chara braunii</i>	Высокий
<i>Chara australis</i>	Высокий
<i>Nitella translucens</i>	Высокий
<i>Elodea canadensis</i>	$0,2 \pm 0,04^*$
<i>Elodea canadensis</i>	0,72 ^{**}
<i>Avena</i>	$0,13 \pm 0,02$
<i>Avena</i>	Отсутствует
Корень <i>Zea</i>	$0,24 \pm 0,05$
Лист <i>Oenothera</i>	Высокий
Лист <i>Elodea canadensis</i>	0,70
Верхушка <i>Cucurbita pepo</i>	Высокий
Каллус <i>Lycopersicon esculentum</i>	Отсутствует

* Связь между возбудимой и соседней клетками.

** Связь между двумя соседними клетками по отношению к возбудимой.

Примером доказательства возможности передачи электрической информации растительными клетками могут служить опыты с перистыми растениями, в частности с мутантами *Oenothera*. Индуцируемые светом изменения РЭП наблюдались в этом случае, как и ожидалось, только при введении МЭ в зеленые клетки листа. Изменения потенциала отсутствовали при введении МЭ в обесцвеченные клетки листа. Передачу можно было зарегистрировать в случае контакта обесцвеченной клетки с зеленой тканью. Сигнал в этом случае передавался без заметной лаг-фазы на значительное расстояние — до 0,9 мм.

Подобное явление удалось зарегистрировать молдавским исследователям на такой сельскохозяйственной культуре, как кукуруза, на пестром

(«полосатом») листе которой при действии света наблюдался переход волны ПД с зеленого участка на белый.

Приведенные факты достаточно убедительно указывают на наличие электрической связи между клетками как низших, так и высших растений.

В заключение подчеркнем еще раз, что у растений отсутствуют такие высокоспециализированные рецепторные образования, которые имеются у животных (механорецепторы, фоторецепторы и т. д.). Следует говорить лишь о некоторой специализации ряда клеток, направленной на восприятие высшего раздражения.

Тем не менее волна возбуждения в растениях способна распространяться на значительные расстояния и выполнять сигнальную роль.

Глава 3

ДВИЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Проблема подвижности является одной из ключевых в современной биологии. Разнообразные типы подвижности присущи живым организмам на всех уровнях организации: от отдельных клеточных органелл до высокоорганизованной подвижности организмов в целом. При всей широте ее проявлений в основе любого движения в биологической системе лежит фундаментальный процесс преобразования энергии химических связей макроэргических молекул в механическую работу.

Двигательные реакции в животных и растительных клетках — довольно распространенное явление, которое играет важную роль в осуществлении обмена и распределения веществ внутри клетки, а также характеризует уровень жизнедеятельности клетки. Существенное значение этих процессов и участие биомедиаторов в двигательных реакциях животных требуют отдельного рассмотрения данного явления.

Действительно, у растений нет нервной и мышечной систем, растения, как правило, являются прикрепленными формами, но все они обладают способностью к движению. Однако растениям присущи разнообразные способы движений, в основе которых лежат как функционирование сократительных белков, подобно тому, как это происходит у животных, так и свойственные только растениям движения на основе роста растяжением и изменений гидростатического давления в клетках. Свойственные только растениям движения обычно не удастся увидеть непосредственно, так как происходят они очень медленно. При внимательном наблюдении можно заметить, что верхушки побегов совершают круговые движения (нутации), растущие побеги и листовые пластинки поворачиваются в направлении односторонне падающего света (тропизмы), при смене дня и ночи открываются и закрываются цветки (настии). Некоторые растения обладают быстрыми двигательными реакциями (сеймонастии), сходными по скорости с движениями животных: захлопывание листа-ловушки

у мухоловки, складывание листьев при ударе у мимозы стыдливой, движение тычинок василька и барбариса. Близки по скоростям у растений и животных внутриклеточные движения (движения цитоплазмы и органоидов), а также локомоторные движения одноклеточных растений (таксисы), которые осуществляются с помощью жгутиков.

Существующие способы движения у растений можно классифицировать следующим образом:

1) внутриклеточные движения (движение цитоплазмы и органоидов);
2) локомоторные движения (жгутиковые, мимоза, насекомоядные растения);

3) ростовые движения на основе роста клеток растяжением (удлинение осевых органов-побегов и корней, рост листьев, круговые нутации, тропизмы, ростовые настии);

4) верхушечный рост (рост пыльцевых трубок, корневых волосков, протонемы мхов);

5) обратимые тургорные движения: движения устьиц, настии, сейсмонастии.

Очевидно, что лишь внутриклеточное движение и локомоторные движения являются общими для растительных и животных клеток. Остальные типы движений свойственны только растениям. Рассмотрим кратко механизмы основных типов этих движений у растений.

3.1. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ДВИЖЕНИЯ

К ним относятся движения цитоплазмы (циклоз) и органоидов.

Циклоз. Впервые движение цитоплазмы растительных клеток, получившее впоследствии название циклоза, наблюдал Б. Корти в 1774 г. Вначале многие ученые рассматривали циклоз как явление, связанное с повреждением клетки или изменением условий окружающей среды. Однако по мере накопления фактов сделали заключение, что движение цитоплазмы происходит во многих интактных клетках, причем характер движения весьма разнообразен. Это явление (особенно непрерывное круговое движение цитоплазмы, называемое *циклозом*) часто наблюдается в харовых водорослях, у высших растений в листьях элодеи и чешуе лука, а также в прорастающих пыльцевых трубках разных видов растений.

Выделяют следующие типы движения цитоплазмы: колебательное, циркуляционное, ротационное, фонтанирующее и др.

Колебательное движение характеризуется определенной беспорядочностью: некоторые частицы находятся в покое, другие скользят по направлению к периферии, а некоторые — по направлению к центру клетки. Движение имеет неустойчивый и случайный характер. Однако оно

не является совершенно беспорядочным, как, например, броуновское движение. Основное отличие колебательного движения цитоплазмы от броуновского в том, что последнее вызывается тепловым колебанием молекул, тогда как в основе первого лежит потребление энергии. При колебательном движении маленькие частицы плавно скользят в одном направлении дальше, чем при броуновском движении.

Циркуляционное движение характерно для клеток, имеющих протоплазматические тяжи, пересекающие центральную вакуоль. Оно обнаружено в крупных клетках растительных волосков, в клетках паренхимы многих однодольных (например, *Allium cepa*) и т. д. При циркуляционном движении тяжи, проходящие через вакуоль, непрерывно изменяют свой вид: они могут перемещаться, исчезать и возникать заново, разделяться на несколько более тонких тяжей, сливаться и т. п. Циркуляционное движение, по мнению ряда авторов, является «периодическим» в том смысле, что направление его попеременно меняется, однако расстояние пробега частиц в том и другом направлениях не остается постоянным.

Фонтанирующее движение цитоплазмы представляет собой промежуточный тип между циркуляционным и ротационным движениями. Фонтанирующее движение характеризуется тем, что цитоплазма в толстом центральном тяже стремится к вершине клетки, а пристенный слой ее — в обратном направлении. Фонтанирующее движение можно наблюдать в корневых волосках *Trianea bogotensis* и пыльцевых трубках многих растений.

Различают также обратно фонтанирующее движение, характеризующееся тем, что цитоплазма движется к вершине в слое, прилегающем к стенке клетки, а по центральному тяжу — к основанию.

Ротационным движением называется движение, при котором цитоплазма находится только на периферии клетки и движется подобно приводному ремню. При ротационном движении, в отличие от циркуляционного, очертания протоплазмы остаются почти неизменными, так как движение в этом случае имеет более или менее постоянный характер. Таким образом, ротационное движение представляет собой наиболее упорядоченный тип движения цитоплазмы.

Этот тип движения встречается в клетках листьев водных растений (*Elodea*, *Valisneria* и др.), в клетках корневых волосков и клетках пыльцевых трубок многих растений, камбиальных клетках; наиболее выражен этот тип движения в клетках харовых водорослей.

Движение цитоплазмы в них отличается от циклоза во многих других клетках тем, что большинство хлоропластов не передвигается по всей клетке, а находится в неподвижном слое цитоплазмы, прилегающем к плазмалемме. Направление движения в клетках *Chara* и *Nitella* остается

постоянным: восходящий ток цитоплазмы проходит по внешней стороне клетки, а нисходящий — по внутренней. В месте соприкосновения восходящего и нисходящего токов видна индифферентная (прозрачная) зона, в которой отсутствуют хлоропласты. Цитоплазма движется по спирали, наклон которой совпадает с наклоном индифферентной зоны и направлением расположения хлоропластов в неподвижном слое.

Говоря о различных типах движения цитоплазмы, следует отметить, что мы используем довольно условные термины, поскольку четко разграничить типы движения в ряде случаев довольно сложно. В одной и той же клетке можно наблюдать переход, например, от колебательного к ротационному движению или наоборот, как в нормальных условиях, так и при искусственных воздействиях. Так, в пыльцевых зернах *Lilium auratum* при прорастании возникает сначала колебательное движение, но затем оно переходит в ротационное. Аналогично в клетках листа *Elodea* можно наблюдать переход от колебательного к ротационному движению через циркуляционное; при определенных условиях изменение типа движения может происходить и в обратном направлении, т. е. от ротационного к колебательному. Обратимый переход одних типов движения цитоплазмы в другие — широко распространенное явление в растительных клетках.

Скорость движения цитоплазмы очень варьирует. Она изменяется в значительной степени в соответствии с эндо- и экзогенными факторами. Поэтому сравнение скоростей движения цитоплазмы разных объектов не претендует на большую точность; однако оно может дать все же основные представления об их величинах (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Скорость циклоза в различных растительных объектах
(Н. Камия, 1962)

Объект	Орган	Скорость, мкм/с	Температура, °С
<i>Caulerpa prolifera</i>	Лист	2–3	12–30
<i>Acetabularia</i>	Стебель	2–5	25
<i>Nitella flexilis</i>	Междоузлие	52–78	20–28
	Ризоид	21	23
<i>Chara braunii</i>	Междоузлие	75	27
<i>Elodea</i>	Лист	6–10	20
<i>Valisneria spiralis</i>	Лист	10–15	18
<i>Cucurbita maxima</i>	Волосок черешка	4	20
<i>Allium cepa</i>	Внутренний эпидермис	4,3	—
<i>Avena sativa</i>	Корневой волосок	5,4	20

Объект	Орган	Скорость, мкм/с	Температура, °С
<i>Trianea bogotensis</i>	Корневой волосок	9,5	18
<i>Zea mays</i>	Корневой волосок	5,7	20
<i>Lilium longiflorum</i>	Пыльцевая трубка	5,5	28
<i>Vicia faba</i>	Пыльцевая трубка	2,9	20
<i>Pisum sativum</i>	Пыльцевая трубка	2,3	24

Скорость движения цитоплазмы является функцией двух параметров: движущей силы и вязкости цитоплазмы. Величина вязкости вакуолярного сока составляет ~ 1 сПз и близка к значению вязкости воды при комнатной температуре. Что касается цитоплазмы, то разброс аналогичных данных весьма большой: например для клеток харовых водорослей приводятся значения от 250 до 6 сПз, что, вероятно, связано с несовершенством приемов измерения.

Движение цитоплазмы, как уже отмечалось, способствует переносу веществ как внутри клетки, так и от одной части растения к другой. Установлено наличие межклеточного движения цитоплазмы по плазмодесмам, в частности в клетках паренхимы разных органов *Allium sativum*. Полагают, что при этом переносятся вместе с током цитоплазмы такие низкомолекулярные вещества, как сахара, аминокислоты, неорганические соли и т. д.

Существует зависимость между ростом и направлением движения цитоплазмы. Наиболее сильный рост гифы гриба отмечался, когда цитоплазма двигалась по направлению к кончику. Вероятно, движущая цитоплазма переносит вещества, необходимые для роста гиф. Если движение останавливалось, рост практически прекращался.

Полагают также, что перемещение генеративных и вегетативных ядер по пыльцевым трубкам покрытосемянных растений происходит благодаря движению цитоплазмы. Ясно, что в этом случае циклоз имеет важное значение для оплодотворения.

Особый тип движения цитоплазмы существует у некоторых видов диатомовых водорослей, который и определяет их поступательное движение.

В ряде опытов усиление движения цитоплазмы служит показателем особого состояния клетки или предшествует переходу клетки в такое состояние. Наблюдалось активирование циклоза в клетках некоторых растений после внедрения паразитного гриба из класса *Phycomycetes*.

Примером взаимосвязи интенсивности движения цитоплазмы с физиологическим состоянием в естественных условиях могут служить замыкающие клетки устьиц. При закрытом устьице в замыкающих клетках ли-

ствев *Vicia* наблюдалось интенсивное движение, а при открытом устье цитоплазма либо совсем не двигалась, либо обнаруживалось только колебательное движение в отдельных участках.

Согласно работам ряда исследователей, клетки и ткани различных растений обладают разными физиологическими и физико-химическими характеристиками в зависимости от возраста и близости к апикальному и базальному концам растения. Это наводит на мысль о различиях в скорости циклоза у этих клеток. Действительно, измерения скорости циклоза показали, что наибольшие величины скорости движения цитоплазмы характерны для верхних растущих клеток (около 40 мкм/с) харовой водоросли *Nitella*, наименьшие — для нижних клеток; разница в величинах между первой и четвертой клетками составляла порядка 10 мкм/с, причем тенденция уменьшения скорости циклоза по направлению сверху вниз выражалась довольно четко. Эти результаты, по-видимому, можно интерпретировать как следствие различного уровня метаболизма в клетках разного возраста, а наибольшую величину скорости циклоза у молодых клеток — как отражение большей активности метаболических процессов.

Следовательно, скорость движения цитоплазмы связана с физиологическим состоянием клеток и происходящими в них метаболическими процессами.

Влияние физико-химических факторов на циклоз. Во многих растительных клетках (например, клетках *Eloдея*, *Vallisneria*) движение цитоплазмы может происходить под влиянием внешних воздействий. Установлено, что индуцированное движение цитоплазмы вызывают изменения освещения, температуры, химические вещества и т. д. От момента приложения раздражителя до начала движения всегда проходит определенный промежуток времени. Так, например, после отделения листа *Eloдея* от стебля движения не наблюдается; оно начинается позднее у основания листа и постепенно распространяется дальше.

Свет играет существенную роль в регулировании процессов движения цитоплазмы. Индуцированное под действием света движение называют *фотодинезом*. В одних случаях свет вызывает замедление или ускорение, а в других — вообще остановку движения цитоплазмы. Как мы уже отмечали, скорость движения зависит от вязкости цитоплазмы. Вязкость цитоплазмы оказалась весьма чувствительной к свету; большое значение в этих случаях имеют длина волны, интенсивность и время освещения. Так, было установлено, что пороговая величина светового раздражения для изменения вязкости равна 0,001–1,0 лк и зависит от физиологического состояния клетки, времени года и т. д.

Интересны эффекты, вызываемые ультрафиолетовым светом. Сильный импульс УФ приводил к остановке циклоза в поверхностных сло-

ях эндоплазмы, тогда как движение в более глубоких слоях сохранялось. При снижении силы вспышки наблюдалось замедление скорости движения цитоплазмы.

Химические агенты в значительной мере определяют интенсивность движения цитоплазмы. Сюда можно отнести АТФ, добавка которого, как в наружную среду, так и внутрь клетки, вызывает увеличение скорости циклоза. Заметное влияние на скорость движения цитоплазмы оказывают соединения, подавляющие обмен веществ у растений (цианид, динитрофенол, CO_2 и др.). Индуцируемый химическими агентами циклоз получил название *хемотинеза*.

Для понимания механизма движения цитоплазмы особое значение приобретает изучение действия агентов, специфически влияющих на определенные физиолого-биохимические процессы (табл. 3.2).

Можно сделать заключение, что механизм движения цитоплазмы связан с наличием SH-групп в молекулах соединений и микрофиламентов, составляющих основу цитоплазматического матрикса.

Таблица 3.2

Влияние химических соединений на циклоз клеток харовых водорослей
(Д. А. Ониани, 1997)

Соединение	Концентрация, М	Изменение скорости циклоза	Характер действия
Пара-хлормеркурибензоат	10^{-4} 10^{-3}	Подавляет Подавляет	Реагирует с SH-группами
N-этиламид	10^{-4}	Подавляет	Реагирует с SH-группами
$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$	10^{-3}	Подавляет	Реагирует с SH-группами
CdCl_2	10^{-3}	Нет эффекта	—
CN^-	10^{-3}	Нет эффекта	Ингибирует поглощение O_2 на 60 %
N_3^-	10^{-2}	Подавляет	Влияет на транспорт электронов
Колхицин	10^{-3}	Нет эффекта	Деполимеризует микротрубочки
Цитохолозин В	10^{-6} – 10^{-4}	Подавляет	Вызывает разборку микрофиламентов

Температура в значительной мере влияет на скорость движения цитоплазмы растительных клеток. Как правило, зависимость скорости циклоза от температуры для клеток харовых водорослей имеет линейный характер.

Существует верхняя температурная граница (оптимум), при которой скорость движения еще сохраняет постоянную величину. Такой оптимальной для клеток *Nitella mucronata* оказалась температура 34 °С, выше которой скорость движения уже зависела от времени нагревания, для клеток *Chara* – температура 40 °С.

При резком снижении или повышении температур для клеток *Chara* и *Nitella* во многих случаях наблюдалась остановка движения цитоплазмы, причем перепад температур должен был быть не менее 10 °С; остановка движения зависела не от достижения определенной температуры, а, скорее, от скорости ее изменения.

Температура влияет на скорость циклоза, изменяя либо вязкость цитоплазмы, либо величину движущей силы. Однако на клетках *Chara corallina* показано, что в интервале температур 5–25 °С величина движущей силы остается постоянной, т. е. в указанном интервале сдвиги в скорости движения цитоплазмы обусловлены изменением вязкости. Скорость циклоза в одном и том же растении может изменяться в течение сезона. Так, скорость движения цитоплазмы в клетках колеоптиля *Avena* в ноябре равнялась 12,4 мкм/с, а в августе – 17,6 мкм/с; в тычиночных нитях *Tradescantia* скорость циклоза оказалась наименьшей в середине зимы, а максимальной – осенью и весной. Определенные различия в скорости движения цитоплазмы обнаружены для клеток *Nitella* летом и зимой. Таким образом, скорость движения цитоплазмы, вероятно, зависит не только от температуры среды, но и от протекающих в клетке процессов жизнедеятельности.

Электрические поля. В скорости циклоза электрические поля вызывают изменения. В конце XVIII в. было отмечено, что при пропускании слабого электрического тока происходит остановка движения цитоплазмы в клетках харовых водорослей. Действие тока сильно зависит от его интенсивности, продолжительности и т. д.

При действии значительного по величине внешнего электрического тока и возникновении ПД также наступает остановка циклоза; впервые это явление было обнаружено на клетках *Nitella*. Взаимосвязь ПД и остановки движения цитоплазмы была установлена для разных видов харовых водорослей. Остановка движения цитоплазмы происходит через 1–2 с после возникновения ПД или через 1 с после пика ПД. Полное восстановление скорости циклоза происходит через 5–10 мин. Это время зависит от вида объекта и внешних условий. Например, в осенних клетках ско-

рость движения при возбуждении клетки резко снижалась, полностью не прекращаясь, а затем возвращалась к исходному уровню. Следует отметить, что появление ПД всегда сопровождается остановкой или резким замедлением циклоза, но резкая остановка движения вовсе не обязательно вызывает ПД. Как уже отмечалось, ПД в клетках харовых водорослей генерируют плазмалеммы и тонопласт, однако достаточно возбуждения плазмалеммы, чтобы вызвать остановку циклоза.

Скорость движения цитоплазмы зависит от содержания АТФ и ингибируется внутриклеточным Ca^{2+} . Остановка циклоза, приходящаяся на пик ПД, связана с изменением концентрации кальция в цитоплазме. Так, концентрация свободного Ca^{2+} менялась от 10^{-7} – $2 \cdot 10^{-7}$ до $6,7 \cdot 10^{-6}$ М в пике ПД для клеток *Chara*, а для клеток *Nitella* – от $4,4 \cdot 10^{-7}$ – $1,1 \cdot 10^{-6}$ до $4,3 \cdot 10^{-5}$ М. Восстановление движения происходило медленнее (75–360 с) по сравнению с установлением исходного уровня (40–60 с); на основании этого высказывается предположение об опосредованном механизме регуляции скорости циклоза ионами кальция. Было также показано, что комплекс, ответственный за остановку движения, диффундирует от плазмалеммы к месту генерации движущей силы со скоростью 15 мкм/с.

Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} от 10^{-7} до 10^{-6} М при отсутствии тонопласта заметно замедляло циклоз в клетках *Nitella*; прекращение движения наступало при 10^{-3} М Ca^{2+} . Для аналогичных фрагментов клеток *Chara* критической концентрацией, ингибирующей движение, была $5 \cdot 10^{-4}$ М; при удалении кальция наблюдалось частичное восстановление скорости движения.

Указанные выше данные дают возможность предположить, что фактором, вызывающим остановку движения цитоплазмы при возбуждении мембраны, является Ca^{2+} .

Действительно, во фрагментах клеток, лишенных тонопласта, при введении комплексона ЭДТА, связывающего Ca^{2+} , не наблюдалось замедления движения цитоплазмы при возбуждении клетки.

На циклоз возможно, таким образом, двоякое действие ионов кальция. Во-первых, обратимое ингибирование Ca^{2+} -чувствительного механизма; во-вторых, ингибирование через его действие на миозиновые филаменты. По аналогии с аксоплазмой считают, что и в клетках харовых водорослей места прикрепления филаментов к возбудимой мембране являются белковыми молекулами с высоким сродством к ионам Ca^{2+} . В результате входа ионов кальция и их связывания с активным центром ослабляется связь между протомерами актиновых филаментов, происходит их открепление от мембраны, что и приводит к остановке циклоза.

Так, ранее указывалось на то, что ПД или калиевая деполяризация в аксоне вызывали открепление мембраносвязанных филаментов цитоскелета. Последующее удаление ионов Ca^{2+} приводит к прикреплению актиновых филаментов.

С другой стороны, обработка фрагмента клетки цитохалозином В (10^{-5} М) приводила к остановке движения только на этом участке и влияние его было обратимо, т. е. он не разносился, а действовал на регуляторные белки сократительных филаментов. Цитохалозин вызывал и потерю возбудимости. Удаление сократительных филаментов, связанных с аксолемой, действительно приводило к потере возбудимости.

Полученные результаты по влиянию ионов Ca^{2+} на циклоз согласуются с механизмом возбуждения плазматических мембран растительных клеток, который мы рассмотрели ранее.

В последнее время появились материалы, касающиеся связи скорости циклоза с РЭП клетки. Изменения величины РЭП, как установлено, влекут за собой сдвиги скорости движения цитоплазмы (рис. 3.1).

Для выявления количественного характера этой зависимости в качестве влияющего фактора на РЭП был избран ион K^+ . Известно, что в физиологических условиях содержание этого иона в цитоплазме (100–150 мМ) растительных клеток на 2–3 порядка выше, чем в окружающей среде. Поэтому небольшие изменения его концентрации в наружном растворе (от 0,1 до 10,0 мМ) не повлияют существенно на концентрацию в цитоплазме, а тем самым не окажут непосредственного действия на структуры, ответственные за процесс циклоза.

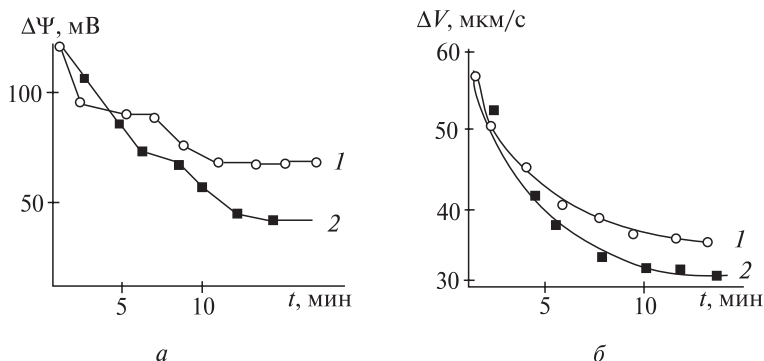


Рис. 3.1. Кинетика деполяризации (а) и сдвигов движения протоплазмы (б) под действием 3,0 мМ (1) и 10 мМ (2) КСl (Д. А. Ониани, 1997)

Рассматривая наступивший в этих условиях сдвиг РЭП ($\Delta\Psi$) как единственный фактор, вызывающий изменения скорости циклоза (ΔV), можно предположить в первом приближении, что скорость индуцируемого $\Delta\Psi$ изменения V будет ему пропорциональна. Однако следует считаться с наличием противоположной, адаптационной тенденции, пропорциональной текущему сдвигу ΔV :

$$dV / dt = k_1 \Delta\Psi(t) - k_2 \Delta V(t)$$

или после интегрирования

$$\Delta V(t) = (k_1 / k_2) \exp(k_2 t) \int_0^t \Delta\Psi(\tau) \exp(k_2 \tau) d\tau.$$

Кинетика изменений РЭП и скорости движения цитоплазмы аппроксимировалась приведенным выше уравнением.

Как видно из рис. 3.1, это уравнение хорошо описывает экспериментальные зависимости, что позволяет использовать его для оценки потенциалзависимости сдвигов скорости циклоза, наступающих под действием различных факторов. Развивая эти представления, предложили модель, на основании которой оказалось возможным проводить оценку степени потенциалзависимости сдвигов V , наступающих под действием того или иного соединения.

В рамках этой модели в случае, когда экспериментальные точки на диаграмме (ΔV , $\Delta\Psi$) ложатся на прямую, проходящую через начало координат, реакция является строго потенциалзависимой (рис. 3.2).

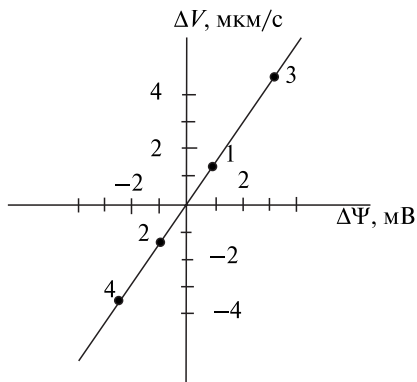


Рис. 3.2. Связь между значениями сдвигов ΔV в экстремумах и соответствующими им величинами сдвигов $\Delta\Psi$ (Д. А. Ониани, 1997)

Если положение анализируемой совокупности точек существенным образом уклоняется от описанной зависимости, это означает, что в рассматриваемом случае имеют место эффекты, обусловленные взаимодействием фактора со структурами, непосредственно регулирующими скорость циклоза.

Представляется возможным в каждом отдельном случае установить, в какой мере наблюдаемые эффекты осуществляются перерегуляцией мембранного потенциала, т. е. в конечном счете, через изменения ионных проницаемостей мембраны, а в какой — благодаря наличию иных путей воздействия (например, через влияние на различные внутриклеточные процессы).

Механизм движения цитоплазмы. Вспомним строение растительной клетки, в частности харовой водоросли, с точки зрения последующего рассуждения о механизмах движущей силы циклоза (рис. 3.3).

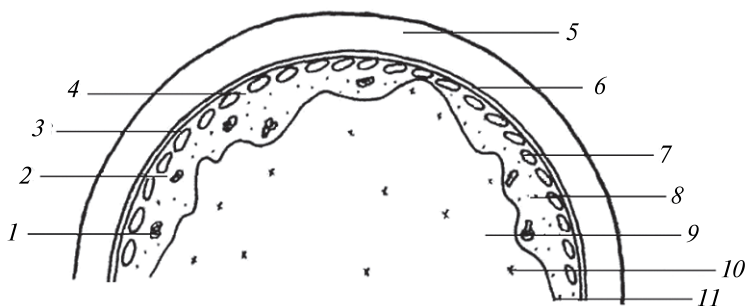


Рис. 3.3. Схема строения интернодальной клетки харовых водорослей:

- 1 — ядро; 2 — эндоплазма; 3 — плазмалемма; 4 — эктоплазма;
- 5 — клеточная стенка; 6 — хлоропласты; 7 — митохондрии;
- 8 — цитоплазматические включения;
- 9 — вакуоль; 10 — кристаллы; 11 — тонопласт

Дифференцированное строение клетки харовой водоросли Н. Камия и К. Курода (1956) позволило получить картину распределения скоростей движения цитоплазмы и вакуолярного сока при ротационном движении. Кривая зависимости распределения скорости движения цитоплазмы и вакуолярного сока от расстояния имела сигмообразный характер (рис. 3.4).

Как видно из рис. 3.4, скорость движения вакуолярного сока уменьшается по направлению к центральной оси, где она падает до нуля, а эндоплазма движется приблизительно с одинаковой скоростью. Наиболее высокая скорость наблюдается вблизи неподвижного коркового слоя. Подтверждением этого заключения явились данные по движению ци-

топлазмы в заполненном целиком эндоплазмой фрагменте клетки харовой водоросли, полученном путем центрифугирования и последующей перевязки. В этом случае наблюдается весьма энергичный циклоз, причем наибольшая скорость, как и на интактной клетке, отмечается в непосредственной близости от неподвижного коркового слоя. Кривая распределения скоростей движения во фрагменте клетки, заполненной эндоплазмой, имеет также сигмоидный вид, т. е. скорость возрастает от оси фрагмента к периферии.

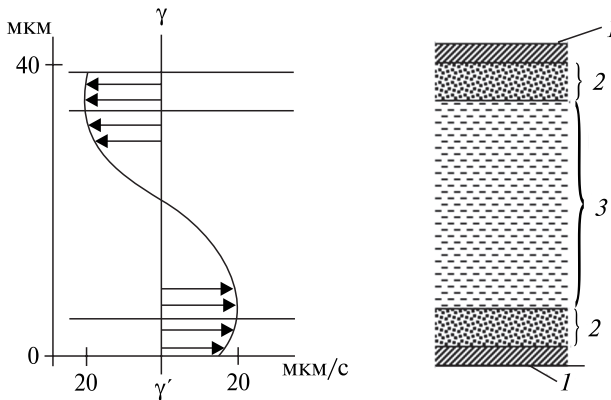


Рис. 3.4. Распределение скоростей движения цитоплазмы и вакуолярного сока в клетке:
1 — оболочка; 2 — цитоплазма; 3 — вакуоль
(Н. Камя, 1962)

На основании анализа полученных результатов было сделано заключение об активной роли поверхности раздела между корковым слоем и эндоплазмой в процессах циклоза. Поверхность раздела между вакуолью и цитоплазмой, как и сама вакуоль, не играет никакой роли в процессах циклоза. Было также установлено, что скорость движения эндоплазмы остается постоянной по всей длине клетки. Этот факт говорит о том, что элементы, управляющие движением, располагаются по всей длине клетки.

Еще в начале XX в. (1838) французские ученые, ничего не зная о хлоропластах, связывали механизм движения цитоплазмы с зелеными глобулами. Было высказано предположение о наличии структур, удерживающих эти глобулы в рядах, причем каждый ряд обладает самостоятельной подвижностью. Однако факты оставались неизвестными, пока Р. Ярош не обнаружил эти материалы (1956 и последующие годы) и не повторил ряд экспериментов, сосредоточив внимание на роли этих структур в процес-

сах движения цитоплазмы. На основании проведенных экспериментов было сделано предположение, что движущая сила в клетках харофитов образуется при неспецифическом взаимодействии текущей эндоплазмы и неподвижного коркового слоя. Действительно, в месте локального повреждения коркового слоя отсутствует движение цитоплазмы и движущая эндоплазма обходит поврежденное место. Этот факт говорит также о том, что для движения цитоплазмы необходима определенная организация коркового слоя.

Подтверждением сказанного вывода служат данные о наличии подкорковых фибрилл. Фибриллы, как установлено, прикрепляются к поверхности хлоропластов со стороны цитоплазмы. Подкорковые фибриллы располагаются параллельно направлению движения эндоплазмы вдоль одного ряда хлоропластов. Фибрилла состоит из 50–100 микрофиламентов. Обнаружены также эндоплазматические филаменты, которые, вероятно, являются ответвлениями подкорковых фибрилл.

С филаментами связаны микросомальные частицы (сферосомы). Они представляют собой сферические органеллы, обладающие одним или несколькими выростами, с помощью которых они закрепляются и передвигаются по филаментам. Средний диаметр выроста составляет 50 нм, длина сильно варьирует. Внешняя сторона выроста покрыта глобулами диаметром 20–30 нм на расстоянии 100–130 нм друг от друга. Диаметр самих сферосом изменяется, по данным разных авторов, в пределах 0,2–2,0 мкм. Предполагают, что наряду с другими структурами сферосомы ответственны за генерацию движущей силы.

Считают, что генерация движущей силы течения происходит на поверхности эндоплазматических филаментов и субкортикальных фибрилл, о чем свидетельствует наличие линейных и циклических фибрилл в каплях цитоплазмы, изолированных из клеток *Chara*. В каплях цитоплазмы, помещенных в клеточный сок этих клеток, наблюдались фибриллярные структуры, как линейные, так и образующие многогранники. Линейные фибриллы проявляли бурные волнообразные движения наряду с продольным перемещением, а замкнутые – вращались с изменением формы.

С целью проверки предположения о присутствии этих фибриллярных структур внутри клетки были проведены аналогичные наблюдения на частично центрифугированных клетках *Nitella* и *Chara*. В свободной от хлоропластов зоне центрифугированной клетки обнаружены разные типы свободно движущихся фибрилл. Их свойства оказались в основном теми же, что у фибрилл, наблюдавшихся в каплях изолированной цитоплазмы. Они принимают различные формы: от круговых и полукруговых до многоугольников.

Время поддержания подвижности фибрилл — несколько часов, иногда более 10 ч. Многие фибриллы были покрыты частицами, подобными сферосомам.

С другой стороны, неоднократно высказывалось мнение, что движение цитоплазмы в растительных клетках связано с функционированием сократительных белков. Это подтвердилось после обнаружения актина в высшем растении *Amaryllis*.

В дальнейшем из клеток *Nitella* был выделен миозин, способный агрегироваться в характерные биполярные филаменты длиной 0,2 мкм с чистой центральной зоной и глобулярными головками на концах при низкой ионной силе. Филаменты могли быть полностью диссоциированы при высокой ионной силе. Добавлением мышечного актина к раствору выделенного миозина и последовательным центрифугированием было доказано, что этот миозин способен связываться с мышечным актином. Таким образом, в клетках *Nitella* содержится миозиноподобный и актиноподобный белки.

В последнее время миозин идентифицирован в клетках высших растений.

Однако приведенные выше данные ничего не говорят о распределении сократительных белков в клетке. А особенно важным является вопрос о расположении сократительных белков, непосредственно связанных с подвижностью цитоплазмы.

Для определения локализации миозина, ответственного за циклоз, была проведена обработка клеток N-этилmaleимидом, действующим на АТФазу миозина. Поочередно воздействовали на ближний и дальний концы центрифугированной клетки *Nitella*. Если препарат действовал на тот конец клетки, откуда эндоплазма была «выжата», т. е. практически на один кортекс, то после возвращения клетки к исходному состоянию течение цитоплазмы в ней возобновлялось. Если же этим агентом обрабатывали тот конец клетки, где собралась эндоплазма, то последующего восстановления течения не происходило. Полученные данные указывают на то, что, по-видимому, связанный с механизмом генерации движущей силы циклоза миозин находится в эндоплазме в растворенном состоянии, т. е. в виде комплексов из небольшого числа молекул (в виде олигомеров), а актин — в корковом слое.

С помощью соответствующих методов доказано, что рассмотренные выше субкортикальные фибриллы и филаменты имеют актиновую природу, т. е. актин находится в корковом слое.

Приведенные выше данные о локализации связанных с течением цитоплазмы сократительных белков позволяют предположить, что наиболее вероятный процесс, обеспечивающий генерацию движущей силы, — взаи-

действие ориентированных в направлении движения поляризованных актиновых филаментов с эндоплазматическими олигомерами миозина. Источником энергии движения цитоплазмы является преобразование химической энергии гидролиза АТФ актомиозиновым комплексом в конформационные изменения в олигомерах миозина. Действительно, тщательный анализ существующих экспериментальных данных в рамках реальных физических моделей с привлечением соответствующего математического аппарата показал, что молекулярный механизм возникновения движущей силы, скорее всего, происходит за счет «гребковых» движений олигомеров миозина, прикрепленных к актиновым филаментам; последние служат для увеличения площади и равномерного распределения силы по объему цитоплазмы.

Следует также отметить, что выявленная структура выростов сферосом свидетельствует о том, что они представляют собой агрегаты миозиновых молекул, которые обеспечивают передвижение сферосом при взаимодействии с актиновыми филаментами.

Движение органоидов. Эволюционируя, растения выработали механизмы регуляции, которые, во-первых, обеспечивают оптимальное использование света, необходимого для фотосинтеза, и, во-вторых, защищают фотосинтезирующий аппарат от слишком сильного освещения. Этой цели, в частности, служат так называемые ориентировочные движения хлоропластов, обнаруживающиеся у водорослей, мхов, папоротников и семенных растений. В листочках мхов и заростках (геметофиты) папоротников при слабом освещении хлоропласты располагаются у физически верхних и нижних стенок клеточных оболочек, где можно абсорбировать больше света (рис. 3.5). При сильном освещении хлоропласты отходят к боковым стенкам и тем самым оказываются «защищенными». В связи с этим говорят о позитивной и негативной ориентировках хлоропластов. Что же касается механики движений, то она может быть двоякой. Если, как, например, у рдеста (*Potamogeton*), направление движения хлоропластов не совпадает с направлением движения других компонентов протоплазмы, то можно сделать вывод о том, что их перемещение активно. Напротив, результаты исследования водоросли вошерии (*Vaucheria*), у которой как хлоропласты, так и другие компоненты протоплазмы перемещаются в одном и том же направлении, свидетельствуют о пассивном их движении. При исследовании влияния света на перемещение хлоропластов прежде всего следует попытаться выявить соответствующий фоторецептор. За исключением водорослей класса конъюгат, или сцеплянок (*Conjugatophyceae*), у которых КС вызывает позитивные ориентировочные движения хлоропластов, а синий — негативные, у всех прочих исследованных объектов перемещение хлоропластов обуславливает коротковол-

новая часть спектра видимого света. Поэтому только желтые пигменты считают фоторецепторами. При этом с очень большой степенью вероятности здесь можно говорить об одном из флавинов, вернее, флавопротеидов, — рибофлавине. Но в пластидах флавины не обнаруживаются. Сравнение спектра поглощения этого пигмента со спектрами проявления как позитивных и негативных ориентировочных движений хлоропластов, так и движения цитоплазмы, а также ее вязкости показывает, что все спектры имеют очень большое сходство. По-видимому, этот рецептор способен вызывать не одну, а много ответных реакций.

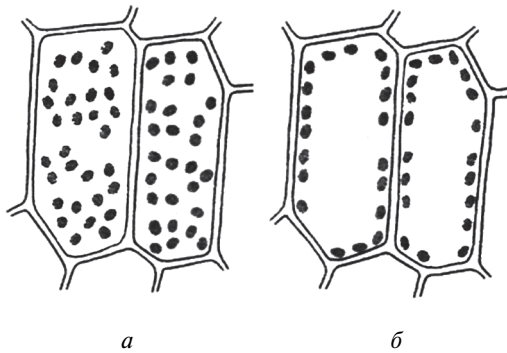


Рис. 3.5. Движение хлоропластов у *Funaria hygrometrica*:
 а — положение хлоропластов при слабой освещенности (около 50 лк);
 б — их положение при сильной освещенности (около 1000 лк)
 (Р. Вайнар, 1987)

До сих пор еще не удалось уверенно выявить фоторецептор синего света, а упомянутое действие КС на водоросли-сцеплянки мужоцию (*Mougeotia*) и мезотениум (*Mesotaenium*) свидетельствует о том, что в роли фоторецептора здесь выступает фитохром.

Что же касается локализации рецепторов, то опыты, проведенные как на ряске (*Lemna*), плаунке (*Selaginella*), валлиснерии (*Vallisneria*), так и на водоросли-сцеплянке *Mesotaenium*, показали, что оба фоторецептора — флаavin и фитохром — сосредоточены в эктоплазме, находящейся в состоянии, подобном гелю. Согласно исследованиям, проведенным с применением поляризованного света, молекулы фитохрома 660 расположены вдоль поверхности в виде спирали под углом 45° , а молекулы фитохрома 730 — перпендикулярно поверхности.

Наряду с механизмом восприятия световых сигналов и связанных с ним вопросов большой интерес представляет также проблема ориентирования хлоропластов при сильном и слабом освещении. Посредством мно-

гочисленных экспериментов удалось показать, что управление движением хлоропластов зависит от градиентов поглощения. При этом речь идет о различиях в яркости света, которые возникают по-разному. Например, при прохождении света сквозь клетку наблюдается его ослабление (принцип затенения). Но клетки могут вести себя и как собирающие линзы, причем «сзади» света оказывается больше, чем «спереди». Затем к появлению градиентов поглощения может привести специфическое расположение молекул фоторецептора. У зеленой водоросли *Hormidium* обнаружен эффект действия линзы, тогда как у ссеплянок *Mougeotia* и *Mesotaenium* градиент поглощения обусловлен положением фоторецепторов. Между движением хлоропластов и фотодинамиками существуют тесные связи.

О возможности проявления пассивных и активных движений хлоропластов мы уже говорили. И в тех, и в других движениях, вероятно, участвуют белковые фибриллы типа актомиозина. При пассивных перемещениях сократительные белки находятся между экто- и эндоплазмой. Таким образом, цитоплазма перемещается вдоль фибрилл. Напротив, активное движение хлоропластов происходит в результате сокращения фибриллярных структур, контактирующих с поверхностью каждого из них. Для наглядности объяснения иногда используют действие весла, которое может вызвать как скольжение гребной шлюпки вперед, так и движение окружающую шлюпку воды.

Движение хлоропластов, как и движение цитоплазмы, связано с реакциями, освобождающими энергию. Исходя из результатов опытов с *Lemna* и *Mougeotia*, можно заключить, что АТФ в первую очередь образуется при процессах дыхания, соответственно окислительного фосфорилирования. Происходящее во время фотосинтеза фотофосфорилирование также может влиять на освобождение энергии.

В растительных клетках, как и в клетках животных, функционирует еще одна система белков, обеспечивающая перемещение органоидов и секреторных везикул по микротрубочкам к плазмалемме и от нее, — это кинезины и цитоплазматический динеин.

Движения ядер. Подобно хлоропластам, ядра могут перемещаться, во-первых, вместе с движущейся цитоплазмой и, во-вторых, осуществляя собственные движения. Среди последних необходимо различать амебодные движения, связанные с заметными изменениями их формы, и вращения. Амебодные движения ядер встречаются, например, в клетках волосков тыквы *Cucurbita pepo*, а вращения — в так называемых пряжках мицелия базидиального гриба *Polystictus versicolor*. Ядра двигаются обычно к местам, где происходит быстрый рост. В качестве примеров можно привести кончики пыльцевых трубок и корневых волосков. Движения часто проявляются после ранения близ участка клеточной оболочки, окружа-

ющего рану. Вероятно, приближение ядра облегчает управление определенными процессами обмена веществ.

К внешним факторам, оказывающим влияние на движение, относятся прежде всего свет, химические вещества, сила тяжести и ранение. Механика движений ядер, по-видимому, подобна механике движений хлоропластов. Предполагают, что к поверхности ядра тоже прикреплены сократительные фибриллы. Движения бесцветных ядер обнаружить под микроскопом труднее, чем перемещения зеленых хлоропластов.

3.2. ЛОКОМОТОРНЫЕ ДВИЖЕНИЯ

Жгутиковые (жгутиконосцы) – класс типа простейших, имеющих жгутики. Объединяет свыше 7 тыс. видов, среди которых и растительные организмы. Число жгутиков – от одного до нескольких тысяч (покрывают все тело), длина – от нескольких до десятков микрометров. Жгутиконосцы свободно живут в воде (например, зеленая водоросль эвглена, вызывающая ее «цветение») и частично в почве. Многие жгутиковые – биологические индикаторы загрязненности вод.

Локомоторный тип движений присущ клеткам, перемещающимся с помощью жгутиков (таксисы). Он характерен для одноклеточных и колониальных форм многих классов зеленых водорослей, зооспор и гамет, для зооспор бурых водорослей, а также для сперматозоидов мхов, плаунов, хвощей и папоротников. Таким образом, движение цитоплазмы и локомоторные движения у растений принципиально не отличаются от животных организмов.

Механизм движения. Для объяснения внутренней механики движения жгутиков, т. е. волнообразно распространяющихся по ним укорочений и удлинений, предложены две взаимоисключающие гипотезы. Согласно первой, сами микротрубочки должны укорачиваться и удлиняться. В соответствии со второй микротрубочки скользят одна вдоль другой. Последнее объяснение более вероятно. Энергия, необходимая для движения жгутиков, предоставляется клетками в форме АТФ.

В основе локомоторных движений лежит функционирование системы сократительных белков, тубулина и динеина, входящих в состав микротрубочек жгутиков. Скользящее движение периферических микротрубочек (9 пар) относительно центральной пары происходит с затратой энергии АТФ.

Движения органов растений. Наиболее изученным локомоторным растением является мимоза (лат. *Mimosa*) – род цветковых растений, принадлежащий к семейству мимозовые.

Самый известный вид — стыдливая мимоза (*Mimosa pudica* L.). Травянистое растение высотой 30–60 см; двоякоперистые листья его особенно чувствительны, складываясь и опускаясь в темноте от самого легкого прикосновения и других раздражающих факторов. Растет в Бразилии. Часто разводится в наших теплицах ради украшения и физиологических опытов. Подобной же раздражительностью обладают и другие виды мимоз. Как мы уже упоминали, для их листьев характерны быстрые двигательные реакции. При легком встряхивании или внешнем механическом воздействии (ударе) черешок у мимозы опускается вниз, четыре подчерешка спадают попарно назад, противоположные доли складываются вместе и вытягиваются вверх (рис. 3.6).

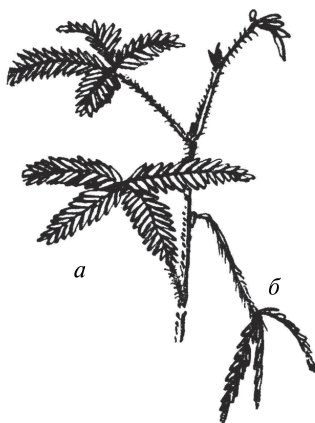


Рис. 3.6. Ветка мимозы:
а — в обычном состоянии; б — при раздражении

Оставленная в покое мимоза снова принимает нормальный вид. Чувствительность мимозы поразительна. Чтобы заставить ее реагировать, достаточно прикоснуться к одному листочку или обжечь его с помощью увеличительного стекла. От одного листочка с чувствительными волосками раздражение быстро распространится по всему растению.

Данное явление напоминает рефлекс у животных. Сходство увеличивается еще тем, что мимозу можно «усыпить» эфиром или хлороформом, и она на некоторое время теряет чувствительность. В поведении мимозы нет ничего таинственного. Двигательная реакция ее на раздражение происходит вследствие изменения тургора в клетках особых подвижных сочленений.

Опускание листьев мимозы обусловлено сокращением сочленовой подушечки, поддерживающей листовую черешок. Такого же типа подушечки, но поменьше, расположены в местах прикрепления к главному черешку четырех подчерешков и совсем мелкие у каждой листовой доли (см. рис. 3.6).

Самой большой чувствительностью обладают так называемые «осязательные волоски», расположенные в ряд поперек сокращающейся сочленовой подушечки.

Опадение листа происходит вследствие сокращения в объеме сочленовой подушечки листа, т. е. в результате потери тургора. Период пребывания листа в движении составляет около 3 с. После непродолжительного покоя в опущенном состоянии лист начинает подниматься. Скорость подъема листа в исходное положение равна десяткам минут.

Если последовательные раздражения происходят очень часто, наступает утомление, ответ растения на раздражение становится более вялым, происходит неполное опускание листа. Интересно, что именно таким образом ведут себя и мышцы животного, например лягушки (рис. 3.7).

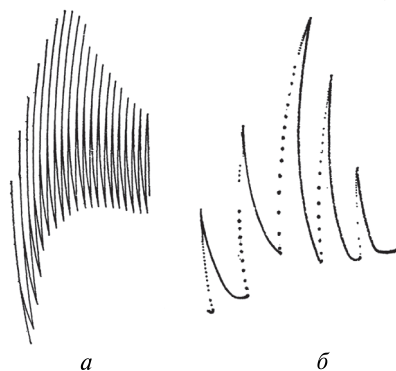


Рис. 3.7. Реакция утомления:
а — мышца лягушки; *б* — черешок мимозы
(Дж. Ч. Бос, 1964)

Механический удар (встряхивание) вызывает в листе возникновение ПД с амплитудой 50–100 мВ, который распространяется по черешку со скоростью 0,5–4 см/с. В месте перехода черешка в подушечку первоначальный ПД индуцирует в подушечке другой ПД. Через 0,05–0,1 с после возникновения ПД в подушечке начинается выход K^+ и Cl^- и вслед за ними воды, что приводит к снижению тургора в них. В результате сложный лист быстро опускается, а маленькие листочки поднимаются и складываются вверх (экстензоры сверху).

Помимо волны ПД в проводящих путях мимозы может распространяться другой тип возбуждения – медленная волна (ВП), которая может проходить через поврежденные ткани.

Основная цель движений у мимозы – спасение от травоядных животных. При малейшем прикосновении они опадают, прижимаясь к колючему стеблю.

Имеется также достаточно много примеров движения тычинок и пестиков цветков разных видов растений. Явление движения тычинок у подсолнуха было описано еще в 1600 г. Очень хорошо видны такие движения и у артишока: при легком встряхивании цветка пыльники склоняются сначала друг к другу, затем в противоположные стороны; после этого тычиночная нить быстро укорачивается и наружу выделяется капля жидкости, содержащая пыльцу. Поскольку причиной сотрясения цветка чаще всего оказывается насекомое, то пробираясь между движущихся тычинок, оно обязательно покрывается этой жидкостью и будет способствовать процессу оплодотворения. После оплодотворения тычиночные нити полностью утрачивают подвижность, хотя сам цветок продолжает нормально развиваться.

Довольно быстро происходят движения тычинок у барбариса. В спокойном состоянии тычинки расправлены в радиальном направлении, они прилегают к лепесткам цветка и образуют с пестиком прямой угол (рис. 3.8, а).

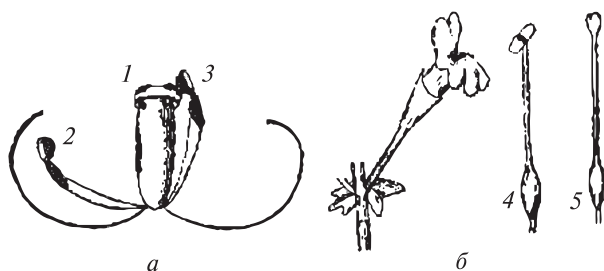


Рис. 3.8. Движение тычинок и пестиков:

а – цветок барбариса: 1 – пестик; 2 – тычинка до раздражения;

3 – тычинка, поднявшаяся после раздражения;

б – цветок мимулуса: 4 – лопасти пестика открыты;

5 – лопасти пестика закрыты после раздражения

Если осторожно прикоснуться к какой-либо из тычинок, то она быстро согнется внутрь, а затем возвратится назад.

Процесс описанных движений тычинок, как установлено, связан с генерацией ПД.

У некоторых растений способностью к движению обладают и пестики, например у мимулуса (рис 3.8, б). Поскольку чаще всего закрытие лопастей этих пестиков вызывается насекомыми — переносчиками пыльцы, то закрытие рыльца лопастями ограждает пыльцу от механических воздействий и создает благоприятный режим для ее прорастания. Эти движения довольно быстрые — полное соприкосновение лопастей происходит в среднем за одну минуту. Сигналом для закрытия служит, как установлено, ПД.

Механизм электрического управления движением изучали А. М. Синюхин и Е. А. Бритиков на двухлопастном рыльце цветка инкарвиллии. Наблюдаемая при этом картина сильно напоминает реакции листа мимозы.

Если кончик одной из лопастей механически раздражается, примерно через 0,2 с возникает ПД, распространяющийся к основанию лопасти со скоростью 1,8 см/с. Спустя 0,8–1,0 с он достигает клеток, расположенных в месте сочленения лопастей, и вызывает их реакцию. Лопасты начинают двигаться через 0,1 с после прихода электрического сигнала; закрытие длится 6–10 с. Примерно через 20 мин лопасты опять полностью раскрываются.

На примере цветка инкарвиллии показано, что электрические сигналы в виде ПД используются растением для управления не только механическими движениями органов, но и другими процессами. А. М. Синюхин и Е. А. Бритиков обнаружили, что лопасты закрываются и после очень осторожного (не вызывающего механического раздражения) нанесения на лопасти пыльцы. Известно, что пыльца оказывает сильное биохимическое воздействие на ткани рыльца пестика. Через несколько минут после нанесения пыльцы наблюдали закрытие лопастей; при этом возник ПД, распространяющийся по столбику к завязи со скоростью около 3 см/с. В завязи этот сигнал вызывал резкое усиление дыхания — начался процесс оплодотворения.

Аналогичные с инкарвиллией опыты были проделаны на пестиках кукурузы. Для определения возбудимых клеток микроэлектрод вводили в клетки, расположенные на различной глубине от его поверхности. На поперечном срезе пестичная нить кукурузы имеет вид асимметричной восьмерки. В центре каждой половины находится проводящий пучок, который заканчивается с одной стороны в разветвленной части рыльца, а с другой — в завязи. Проводящий пучок состоит из 3–6 сосудов и окружен клетками паренхимы, вдоль которых растут пыльцевые трубки.

По мере погружения микроэлектрода через каждые 10–25 мкм проводили регистрацию ПП и реакцию на электрическое раздражение верхушечной части рыльца. Способностью к передаче возбуждения в виде ПД обладали клетки проводящих пучков пестика, у которых абсолютная величина РЭП на 35–40 мВ выше, чем у остальных.

Перед генерацией ПД отмечалось увеличение РЭП возбудимых клеток. ПД распространялся только к основанию пестичной нити, что, вероятно, связано с необходимостью передачи информации от растущих пыльцевых трубок к завязи и далее к листу, корню и т. д.

Каждому этапу опыления соответствует определенный тип биоэлектрической реакции возбудимых клеток нити и завязи (табл. 3.3).

Таблица 3.3

Биоэлектрическая реакция пестика кукурузы при опылении
(А. И. Духовный, 1989)

Время от момента нанесения пыльцы, мин	Этап опыления	Биоэлектрическая реакция	
		Пестичная нить	Завязь
0–0,1	Нанесение пыльцы	Первая группа колебаний ПП (3–5 колебаний РЭП с амплитудой до 8 мВ)	–
2–4	Начало прорастания пыльцы	Вторая группа колебаний ПП (периодичность измерения РЭП с быстрым затуханием)	–
3–18	Появление пыльцевых трубок	Первый ПД	Первый ПД
66–89	Внедрение пыльцевых трубок в ткани рыльца	Второй и третий ПД	Местная реакция: колебание ПП
97–100	Рост пыльцевых трубок вдоль пестичной нити	Участок длительной активности: генерация одиночного ПД	Ритмическая генерация ПД
190 и далее	– // –	Одиночные ПД	Одиночные ПД

Как и у инкарвиллии (второй ПД), у кукурузы первый ПД является начальным сигналом, сообщающим в завязь о попадании пыльцы на рыльце и ее прорастание.

В течение полутора часов, следующих за первым ПД, у кукурузы происходит образование пыльцевых трубок, которые активно внедряются в ткани рыльца. Биоэлектрическая реакция включает в этот период генерацию еще двух импульсов ПД. Их основные характеристики почти не

отличаются друг от друга и от характеристик первого ПД. Каждому импульсу также предшествует увеличение РЭП возбудимых клеток.

Одна из особенностей второго и третьего ПД по отношению к первому состоит в том, что они, достигая завязи, вызывают там не ПД, а местную реакцию – колебания РЭП с малой амплитудой – наподобие тех, которые возникают в клетках рыльца при нанесении пыльцы. Следовательно, у основания пестичной нити происходит трансформация ПД.

Другая особенность вторичного ПД и всех последующих – большая скорость распространения по сравнению с первым ПД. Это происходит вследствие изменения возбудимости клеток после генерации ими одного-двух ПД.

После описанного выше «подготовительного периода» по мере усиления обменных процессов между пыльцевыми трубками и тканями пестика наблюдается этап высокой электрической активности. В это время происходит генерация большого количества ПД. Восстановление РЭП в пестичной нити и завязи после периода длительной активности происходит синхронно.

Еще одна интереснейшая реакция многих цветков на механические раздражения, не связанная с видимыми движениями органов, – выделение нектара. Например, цветок липы, по которому ползает насекомое, начинает интенсивнее выделять нектар. В опыте, поставленном с целью обнаружения сопутствующих этому процессу электрических эффектов, один микроэлектрод вводился в ткань нектарника, другой – в проводящие пучки, обслуживающие нектарник. Оказалось, что при механическом раздражении некоторых частей цветка возникают электрические импульсы, распространяющиеся по железистым клеткам в проводящие пучки, и, достигая нектарника, стимулируют его деятельность.

Интересно отметить, что при этом усиливается не только отделение нектара, но и его образование в нектарнике. Реакция нектарника очень быстрая; выделение нектара начинается практически сразу после того, как насекомое садится на цветок.

Механический же стимул может инициировать возникновение ПД. Так, умеренное механическое воздействие на эпикотиль гороха приводит к возникновению ПД, которые могли служить стимулом для выделения этилена, контролирующего рост органа в толщину. Данная реакция, вероятно, происходит в почве под влиянием механического давления частиц на растущий эпикотиль.

При действии света на гаметофиты папоротников возникали распространяющиеся ПД, которые вызывали гуттацию, необходимую для процесса оплодотворения.

Складывание листочков, связанное с возникновением и распространением волны ПД, у разных видов растений уменьшает общую поверхность

растения, т. е. вызывает ограничение транспирации. Особенно при сильном иссушающем ветре это может защищать от излишней потери воды.

Круг примеров явлений жизнедеятельности растений, в основе которых лежит электрическая передача возбуждения, значительно расширился. Очевидно, что среди представителей растительного царства такие явления не считаются исключительными, уникальными. И совершенно естественным образом возникает вопрос: возможно, именно механизмы характерны также для многих других процессов, течение которых недоступно непосредственному наблюдению? Да, существуют очень многие физиологические процессы, регулируемые с помощью электрических сигналов. С другой стороны, необходимо определить масштабы распространенности этого механизма регулирования, степень его важности для отдельных функций растительного организма. Современное состояние этих вопросов недостаточно ясно; тем не менее в качестве иллюстрации основных направлений развития исследований напомним о некоторых наиболее интересных результатах.

И. И. Гунаром и А. М. Синюхиным получены данные, свидетельствующие, что интенсивность одного из важнейших жизненных процессов растения — фотосинтеза — может регулироваться с помощью ПД определенного типа. В опыте с растениями тыквы они раздражали корневую систему и регистрировали распространение ПД в стебле и черешке листа. Одновременно измерялась скорость поглощения листом углекислого газа.

Оказалось, что волна ПД распространялась из корня по стеблю и листовым черешкам к листьям, вызывая усиление или ослабление интенсивности процесса фотосинтеза. Характер реакции определялся видом раздражения. В том, что причиной реакции листа являлись именно электрические сигналы, можно убедиться, блокируя распространение ПД вдоль стебля. Обработка участка стебля физиологически активными веществами и сильное охлаждение приводили к исчезновению всякой реакции фотосинтетического аппарата растения на раздражение корневой системы. С другой стороны, известно, что такого рода обработка создает непреодолимый барьер для ПД на пути его распространения в стебле, но не препятствует нормальному движению восходящих токов веществ и воды по проводящим путям.

Похожие исследования описаны в ряде работ В. А. Опритова, изучавшего влияние раздражения надземных частей растения на другую важнейшую функцию растительного организма — поступление в корневую систему минеральных веществ из почвы. В одном из опытов верхушки проростков гороха раздражались различными способами — тепловым воздействием, раствором хлорида калия, гербицидом 2,4-Д (дихлорфеноксиуксусная кислота) и т. д. В стебле после каждого раздражения возникал и

распространялся ПД. Достигая корневой системы проростка, он вызывал изменение ПП и усиленное поглощение фосфора из питательного раствора. Важно отметить, что изменение поглотительной активности корня наступало примерно через одну минуту после раздражения верхушки; столь быстрая передача информации возможна только с помощью электрических сигналов (следует еще учесть запаздывание реакции корня и некоторое минимальное время, после которого оказывается возможным экспериментально обнаружить начало интенсивного поглощения).

Другими опытами В. А. Опритова с сотрудниками установлено, что биоэлектрические потенциалы играют важную роль в регуляции не только поступления, но и перемещения ряда веществ в растениях. Это показано в отношении кальция, фосфатов, а также глюкозы.

Как известно, газообмен листа осуществляется в основном через устьица, открытие и закрытие которых регулируются в зависимости от температуры, влажности и физиологического состояния листа. Исследования К. Умрата показали, что закрытие устьиц листа фасоли может быть вызвано волной ПД, возникающего при электрическом раздражении листа. Правда, более поздние попытки обнаружить электрическую возбудимость у замыкающих клеток устьиц успеха не имели. Возможно, электрическое раздражение вызывало некоторое изменение химизма процессов жизнедеятельности листа, в результате которого и происходило закрытие устьиц. Есть публикации о том, что при объедании листьев картофеля или томатов насекомыми возникает ПД, распространяющийся по всем листьям. Затем повсеместно начинается синтез соединения, блокирующего пищеварительные ферменты насекомых — трипсин и хемотрипсин. Не исключено, что такая система существует на самом деле, но аргументов авторов исследования в пользу ее существования недостаточно.

Основной источник неопределенности наших знаний об электрическом управлении жизненными процессами растения заключается в отсутствии представлений о самой системе электрической сигнализации. Возникает ряд вопросов, касающихся механизмов, направляющих сигнал от места раздражения к месту его физиологического действия. В одном случае исходящий из листа ПД распространяется через стебель к корню, а в другом — через систему ветвей и побегов по всем листьям. Кроме того, волна возбуждения, исходящая из корня, в одном случае усиливает, в другом — снижает интенсивность наблюдаемого процесса и т. д.

Тем не менее становится очевидным, что только волна ПД, распространяющаяся со скоростью 4000–6000 см/ч, в состоянии обеспечить быструю первоначальную передачу информации на дальние расстояния в растительном организме.

Энергетика – ключ к пониманию специфики движений у растений. Из рассмотренных ответных реакций можно заключить, что у растений обнаруживаются разнообразные изменения положений в пространстве. Это касается как движений, происходящих внутри клеток, и свободных перемещений, так и движений органов, закрепленных в субстрате растений. Для высших растений особенно характерны последние. Стебель, листья и корни способны к обусловленным тропизмами и настиями, а также автономным ответным реакциям, благодаря которым они занимают удобное для жизни положение в пространстве. Несмотря на отсутствие органов чувств или нервов, растения могут воспринимать действие света, температуры, силы тяжести, химических и других раздражителей. Несомненно, это удивительное свойство растений. И хотя движения у растений весьма отличны от движений животных, они также имеют существенное значение. Даже чисто механические движения, в осуществлении которых живая протоплазма едва ли играет какую-либо роль, приносят растениям очень большую пользу.

Со спецификой движений растений самым тесным образом связана их энергетика. Как известно, под энергией понимают способность выполнять какую-либо работу. В последние годы энергетические проблемы все более становятся центром всеобщих интересов. Для животных и человека требуется «горючее», получаемое в виде пищи. В отличие от механических аппаратов и животных, которые в этом отношении зависимы от богатых энергией соединений, растения могут самостоятельно синтезировать такие вещества из CO_2 и H_2O , используя солнечный свет. Этот процесс, называемый фотосинтезом и уже неоднократно упоминавшийся нами, имеет для растений основополагающее значение.

О получении растениями энергии от солнца и ее использовании ими мы достаточно хорошо осведомлены благодаря интенсивно проводимым исследованиям этих процессов. Сначала солнечная энергия с помощью хлорофилла превращается в химическую энергию, служащую затем для осуществления синтеза углеводов. В качестве еще одной ступени биологического превращения энергии необходимо назвать дыхание, при котором вследствие окисления питательных веществ освобождающаяся энергия запасается уже упоминавшимся соединением АТФ. В итоге эта форма энергии используется для выполнения биологической работы. Работу определяют как произведение силы и расстояния. Если происходит сокращение белковых фибрилл, то это механическая работа, тогда как в основе изменений положения листьев мимозы и других растений лежит осмотическая (связанная с транспортом веществ) работа. Если происходят процессы биосинтеза, то говорят о химической работе. Она играет определенную роль не только при движениях, обусловленных ростом, но и при действии механизмов набухания и молекулярного сцепления, ко-

которые могут совершаться лишь в тех случаях, когда имеются растительные структуры сложного строения. Все эти разнообразные виды работы совершаются в растительных клетках, имеющих такую систему превращения энергии, эффективности которой до сих пор не удалось достигнуть (превысить) ни одной из машин.

Имея в виду энергетику, мы лучше понимаем тесную связь автотрофного способа питания с движениями органов растений. Поэтому закрепленные в субстрате растения вовсе не нуждаются в смене мест обитания.

Эволюция способов движения. Существующие растения и животные, а также свойственные им разнообразные формы движения возникли в процессе эволюции. Важнейшими узловыми событиями во время этого развития от низших форм к высшим, продолжавшегося миллиарды лет, были, в частности, переход от водного образа жизни к наземному и возникновение гетеротрофного и автотрофного способов питания. К числу важнейших факторов эволюции принадлежат изменчивость, отбор и изоляция. Предпосылками для эволюции служат размножение, обеспечивающее сохранение вида, и генетическая изменчивость потомства его представителей. Благодаря отбору и изоляции растения могли все больше и больше приспосабливаться к условиям окружающей среды.

Каким образом формировались у растений такие разнообразные типы движений? Принято считать, что высшие растения произошли от зеленых водорослей:

хламидомонадные → хлорококковые → улотриковые →
→ хетофоровые первые наземные высшие растения (риниофиты) →
→ папоротниковидные → голосеменные и цветковые.

Проследим, как при этом изменялась двигательная активность растительных организмов.

Монадные формы зеленых водорослей, живущие в основном в пресных водах, передвигаются с помощью жгутиков. Поскольку жгутики являются цитоплазматическими выростами, то клеточные стенки у монад не полностью замкнуты и избыток воды выделяется из клеток с помощью пульсирующих вакуолей. Клеточная оболочка полностью замыкается у хлорококковых водорослей, но при этом они теряют жгутики и способность к самостоятельному передвижению. Многоклеточные нитчатые водоросли (произошли от хлорококковых) типа улотрикса являются прикрепленными организмами, и их движение к падающему сверху свету осуществляется медленно — за счет деления клеток. Появление у нитчатых водорослей иного, быстрого типа роста путем образования большой центральной вакуоли и растяжения клеточной стенки — роста растяжением давало существенные преимущества в освоении лучше освещенных верхних слоев водоема. Удлинение клеток за счет роста растяжением ока-

залось настолько удачной формой движения, что наряду с фотосинтезом стало основой развития растительного мира. Другие формы движений у растений также включают рост растяжением.

В ходе дальнейшей эволюции у растений все в большей степени развивается способность к обратимым движениям на основе изменяющегося тургорного давления. Такой механизм возник, прежде всего, у первых высших наземных растений при формировании устьиц. Затем медленные тургорные движения (настии) начинают использоваться для движения листьев, закрывания и открывания цветков. Наконец, появляются быстрые обратимые тургорные движения – сейсмонастии. Если регуляция движений, связанных с ростом растяжением, осуществлялась с помощью фитогормонов, то для регуляции тургорных движений скорость передачи гормонального сигнала уже недостаточна, и управление двигательной активностью начинает осуществляться с участием электрических импульсов (ПД). Важно отметить, что у растений эволюционно продвинутых таксонов сохраняются в различных комбинациях и все ранее возникшие формы движения. Эволюцию форм движения у растений можно представить в виде схемы (рис. 3.9).

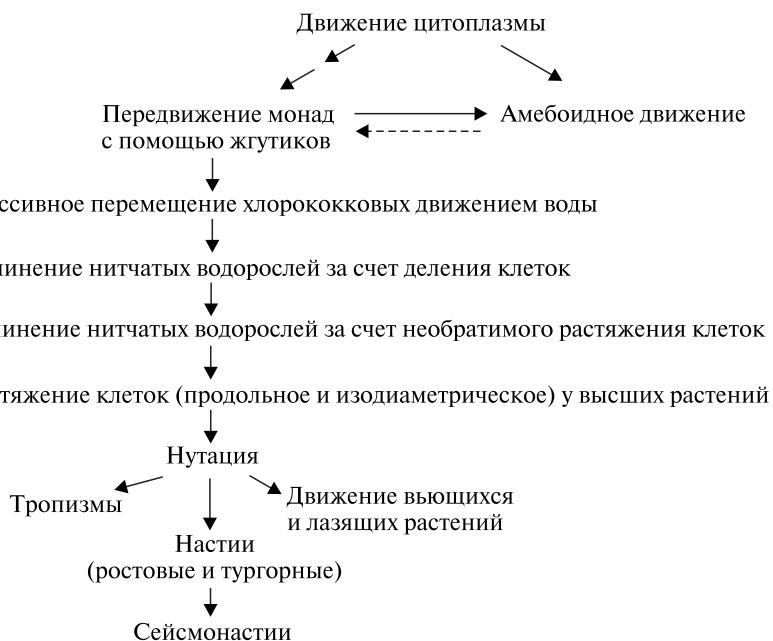


Рис. 3.9. Схема эволюции форм движения у растений (В. В. Полевой, 1989)

Из вышесказанного, очевидно, что для мира растений характерно большое разнообразие способов движения. Все имеющиеся данные подтверждают правоту Ч. Дарвина в том, что в настоящий момент мы знаем, что движение происходит постоянно и что только его размах или направление или то и другое вместе должны видоизменяться для пользы растения соответственно внутренним и внешним стимулам.

Движения, которые у животных выполняются сокращением мышц, у растений могут осуществляться движением воды и связанным с ним изменением гидростатического давления внутри клеток. Таким образом, можно сказать, что движения растений осуществляются гидравлической системой. При этом отметим, что разность гидростатических давлений, создаваемая растениями, может достигать очень высоких значений.

Хотя для осуществления проводившихся до сих пор исследований движений у растений уже использован широкий круг научных достижений, еще имеются многие нерешенные проблемы, на которые мы неоднократно указывали.

Глава 4

ДЕЙСТВИЕ БИМЕДИАТОРОВ НА РАСТЕНИЯ

Биомедиаторы (АХ, дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин, гистамин, ГАМК) у животных, как отмечалось, выполняют важные регуляторные функции при передаче внешнего раздражения в виде электрического импульса от одной клетки к другой. Они являются регуляторами энергетических и метаболических процессов, обеспечивающих рост и развитие организма на разных уровнях организации.

В настоящее время установлен ряд чувствительных к АХ и биогенным аминам реакций и у растений.

4.1. РОСТ И РАЗВИТИЕ

Из всех перечисленных биомедиаторов наиболее изучено действие на растения АХ. Один из аспектов физиологической роли АХ в растениях связан с действием его на ростовые процессы.

Физиологическая роль АХ в растениях была впервые рассмотрена в 1970 г. Было установлено действие этого вещества на ростовые реакции растений. Чаще всего под влиянием АХ наблюдается стимуляция элонгации coleoptилей и гипокотилей зеленеющих проростков злаков. У этилированных проростков такой эффект не обнаруживается (табл. 4.1).

Таблица 4.1

Влияние ацетилхолина на ростовые реакции растений
(В. В. Рощина, 1991)

Растение	Орган	Эффект
<i>Avena</i>	Колеоптили	Стимуляция элонгации
<i>Cucumis sativus</i>	Гипокотили	— // —
<i>Glycine max</i>	— // —	— // —

Растение	Орган	Эффект
<i>Phaseolus aureus</i>	Образование вторичных корней	Ингибирует у выросших на свету растений
<i>Pisum sativum</i>	Этиолированные проростки	Не действует на рост
<i>Triticum vulgare</i>	Проростки	Стимулирует рост
<i>Vigna sesquipedalis</i>	Эпикотили	Стимулирует рост

Следует подчеркнуть, что заметный сдвиг ростовых процессов вызывается только высокими концентрациями $>10^{-3}$ моль/л. Эффект составляет не более 20–30 % от контроля.

В более низких концентрациях (10^{-6} – 10^{-5} М) АХ вызывает заметную стимуляцию элонгации протонемы мха *Athyrium filix-femina* и разворачивания листьев у этиолированных проростков мягкой озимой пшеницы *Triticum aestivum*. Действие трансмиттера в этом случае аналогично эффекту КС, который, как известно, регулирует активность фитохрома — одного из фоторецепторов. Однако АХ не только вызывает стимулирующие эффекты, но и оказывает и ингибирующее действие, в частности подавление роста верхушек корней и образование вторичных корней. В зависимости от концентрации АХ стимулирует элонгацию пыльцевой трубки при прорастании пыльцы в низких концентрациях, но угнетает при высоких.

Эффекты биогенных аминов на рост растений исследованы в основном на каллусной ткани. Дофамин в концентрациях, превышающих $3,2 \cdot 10^{-5}$ М, ингибирует рост каллусной ткани банана *Musa acuminata*, а в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М полностью блокирует ростовой процесс. Однако в присутствии ауксина или гиббереллина катехоламины в микромолярных концентрациях стимулируют рост культуры ткани картофеля *Solanum tuberosum*, табака *Nicotiana tabacum* и корневых волосков *Acmella oppositifolia*.

Серотонин является одним из самых активных регуляторов роста и развития как у животных, так и растений. В экспериментах серотонин вызывает ростовой изгиб колеоптилей овса. На основании этих экспериментальных данных было высказано предположение, что это соединение, близкое по строению ИУК, обладает аналогичной функцией стимулятора роста. Ауксиноподобный эффект был обнаружен позднее и на гипокотилеях люпина *Lupinus albus*. Серотонин также стимулирует образование корней в культуре ткани листа *Populus tremuloides* и *P. tremula*, даже в большей степени, чем ИУК. Кроме того, серотонин ингибирует образование ризосферы на корнях тополя, но стимулирует рост вторичных корней. При

обработке семян ячменя этот трансммиттер вызывает повышение митотического индекса, ускорение роста корня, увеличение корневой массы и семядолей. Выявлено также, что серотонин ингибирует образование и рост галловых опухолей на дисках клубней картофеля.

АХ оказывает в основном стимулирующее действие на прорастание семян и пыльцы растений (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Действие ацетилхолина на прорастание семян и пыльцы
(В. В. Рощина, 1991)

Вид	Орган, часть	Эффект
<i>Agropyron repens</i>	Семена	Стимуляция прорастания
<i>Arachis hypogaea</i>	Пыльца	Стимуляция элонгации пыльцевых трубок
<i>Brassica kaber</i>	Семена	Стимуляция прорастания
<i>Chenopodium album</i>	Семена	— // —
<i>Raphanus sativus</i>	Семена	Нет эффекта
<i>Rumex obtusifolius</i>	Семена	Стимуляция прорастания

Стимуляция АХ прорастания семян наблюдается только при очень высоких концентрациях ($>10^{-3}$ М), и процент ее невелик. В других экспериментах указывается, что АХ и его аналог карбамаилхолин в концентрации 10^{-3} М на свету стимулировали прорастание семян *Rumex obtusifolius* на 25–50 %. Более того, в опытах польских исследователей (А. Tretyn [et al.], 1985) АХ ускорял прорастание семян *Echinochloa crusgalli* в 3 раза, *Chenopodium album* – в 4 раза, *Setaria viridis* – в 8 раз по сравнению с контролем, а семена *Brassica* sp. и *Agropyron repens* не прорастали без обработки АХ.

В экспериментах с редисом *Raphanus sativus* АХ, напротив, снижал количество проросших семян, а катехоламины, серотонин и гистамин стимулировали прорастание семян в концентрациях 10^{-7} – 10^{-4} М (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Действие ацетилхолина и биогенных аминов на прорастание семян редиса (в процентах от контроля)
(В. В. Рощина, 1991)

Содержание	%	Соединения	%
АХ	81 ± 7	Адреналин	100 ± 3
Дофамин	99 ± 7	Серотонин	144 ± 2
Норадреналин	136 ± 2	Гистамин	111 ± 7

Однако при повышении концентрации до $0,24 \cdot 10^{-3}$ М гистамин снижал количество проросших семян салата по сравнению с контролем на 50 %, а в более высоких концентрациях полностью подавлял этот процесс. Возможно, гистамин является регулятором прорастания семян, как и другие производные гистидина.

Чувствительным к биогенным аминам процессом является развитие микроспор растений. Для оценки прорастания пыльцы и развития вегетативных микроспор были использованы гиппеаструм *Hippeastrum hybridum* и хвощ полевой *Equisetum arvense* соответственно.

В диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-5} М дофамин и серотонин стимулировали развитие обоих видов микроспор, а норадреналин – только вегетативных микроспор. При концентрациях 10^{-5} М и выше норадреналин практически не влияет на прорастание пыльцы гиппеаструма *Hippeastrum hybridum*, но стимулирует развитие вегетативных микроспор по сравнению с контролем, тогда как дофамин и серотонин при этих концентрациях стимулировали оба процесса.

В 80-е г. XX в. было установлено, что в условиях постоянного освещения АХ препятствует цветению растений длинного дня ряски *Lemna gibba*, но в том же самом световом режиме ускоряет цветение другого короткодневного вида *Lemna perpusilla*. По сравнению с АХ катехоламины проявляют еще большую активность в регуляции процессов развития и морфогенеза. В одних случаях они подавляют цветение у *Lemna gibba*, в других – могут стимулировать цветение двух видов: *Lemna gibba* и *Lemna paucicostata*.

Катехоламины заметно влияют на рост *in vitro*. Так, добавление экзогенного дофамина (10^{-4} – $5 \cdot 10^{-4}$ М) в культуральную среду вызывает стимуляцию роста культуры ткани картофеля *Solanum tuberosum* L. При культивировании тканей с ИУК в среде норадреналин также стимулирует соматический эмбриогенез листьев, например у ежи сборной *Dactylis glomerata* L. Предполагается, что общий регуляторный эффект катехоламинов на рост связан с окислением ауксина. Например, дофамин может ингибировать оксидазу ИУК, защищая тем самым ауксин, и эта реакция высоко специфична.

Серотонин влияет на развитие растений, стимулируя их цветение, как предшественник мелатонина, который запускает этот процесс.

Эффекты трансмисмиттеров на рост и развитие растений зависят от факторов внешней среды. Достоверные сведения по данному вопросу пока получены лишь для АХ, тогда как для биогенных аминов экспериментальных данных мало, и они противоречивы. Как отмечалось, свет регулирует синтез АХ в растениях. Он также играет важную роль и в эффектах, вызываемых холиновыми эфирами. Содержание АХ регулируется фоторе-

цептором, связанным с продолжительностью светового дня, — фитохромом. Например, обнаружена зависимость ингибирования АХ образования вторичных корней у *Pisum sativum* от времени экспонирования проростков на свету. Польские исследователи (А. Tretyn [et al.], 1985) наблюдали на свету стимуляцию (до 50 % от контроля) АХ прорастания семян *Rumex obtusifolius*. В ряде случаев эффекты АХ на свету (ингибирование образования вторичных корней *Phaseolus aureus*, стимуляция споруляции у гриба *Trichoderma viride*, стимуляция прорастания семян различных растений, ингибирование роста гипокотилей и стимулирование роста эпикотилей *Vigna sesquipedalis*) были аналогичны тем, что вызывал КС с длиной волны <680 нм. Кроме того, синий свет или АХ в одинаковой мере стимулировали образование конидий у мицелия гриба *Trichoderma viride*, выросшего в темноте. Эти факты легли в основу дискуссии о механизме действия света различного качественного состава. Предполагалось, что механизм действия КС опосредован АХ. Однако однозначно решить этот вопрос не удалось, поскольку не все имеющиеся результаты укладываются в эту гипотезу.

Существует зависимость эффектов АХ и от рН среды. Доказано, например, что АХ в концентрациях 10^{-3} – 10^{-2} М стимулирует рост проростков *Triticum vulgare* только при рН 7,5.

Анализируя воздействие экзогенных АХ и катехоламинов на рост и развитие растений, следует отметить, что существуют определенные трудности использования этих веществ в опытах на целом растении или его интактных органах. Прежде всего, это касается АХ, который может на 90 % разрушаться холинэстеразой, локализованной в плазматической мембране и клеточной стенке. Трудно интерпретировать эффекты высоких ($>10^{-3}$ М) концентраций веществ, так как они могут вызывать неспецифические реакции и выступать в качестве блокаторов рецепторов, модифицируя ответные реакции растений.

Подобное явление наблюдается при ингибировании рецепторов пестицидами, которые являются одновременно ингибиторами холинэстераз и могут усиливать эффекты АХ благодаря блокированию гидролизующего его фермента. Например, стимуляция прорастания семян *Agropyron repens* L. экзогенным АХ усиливается в 3 раза в присутствии блокатора фермента эзерина.

С другой стороны, сами ингибиторы холинэстераз могут оказывать негативное действие. Например, эзерин ингибирует элонгацию пыльцевой трубки у *Crinum asiaticum*. Однако прозерин не оказывает подобного действия на пыльцевые трубки *Lathyrus latifolia*. На цветение *Lemna* ингибиторы холинэстераз также не влияли. Следовательно, при использо-

вании химических агентов в опытах с биомедиаторами необходимо учитывать индивидуальную специфичность к ним растений.

Механизм действия АХ и биогенных аминов на рост и развитие растений в полной мере не изучен. Он может заключаться в активации белков, участвующих в ростовых реакциях (в том числе ферментов синтеза фитогормонов). Но, кроме фитохрома, пока неизвестно, какие еще белки, регулирующие рост, активируются АХ или биогенными аминами.

При рассмотрении механизма действия биомедиаторов необходимо учитывать их возможное влияние на генетический аппарат клетки. У животных допускается возможность прямого действия АХ и норадреналина на синтез РНК в ядрах. Показано, что катехоламины и серотонин стимулируют синтез РНК в ядрах, изолированных из тканей мозга, печени. Серотонин способен также стимулировать синтез ДНК в фибробластах.

Не исключено и взаимодействие биомедиаторов с фитогормонами растений. Некоторые фитогормоны и биомедиаторы синтезируются по сходному пути из одного и того же предшественника. Например, мы уже отмечали, что серотонин и ИУК синтезируются из триптофана. В других случаях фитогормоны и медиаторы могут иметь разных предшественников, но синтезироваться одновременно и проявлять сходную активность.

Еще одна возможность взаимосвязи биомедиаторов и фитогормонов может заключаться в синергическом действии этих веществ.

В концентрации 10^{-7} – 10^{-6} М катехоламины адреналин, норадреналин и дофамин ускоряют вызванную гиббереллином элонгацию гипокотилей салата *Lactuca sativa*. Производные катехоламинов (метанефрин, норметанефрин, 3-метокси-4-гидроманделевая кислота) или их предшественник ДОФА не оказывают такого эффекта. Известно также, что у ежи сборной адреналин в молярных и миллимолярных концентрациях, подавляющих эмбриогенез, вызывает образование этилена, гормона старения, что демонстрирует определенный синергизм аминокергической и гормональной систем.

С другой стороны, возможны и конкурентные взаимодействия. Так, АХ (10^{-7} – $5 \cdot 10^{-4}$ М) снижает уровень стимуляции и рост проростков пшеницы, предварительно обработанных ИУК. В свою очередь обработка растения *Lemna* ИУК снижает на 30 % содержание АХ, а антагонист АХ атропин ($>10^{-6}$ М) снимает действие ауксина на рост. Другим примером может служить ингибирование АХ выделения гормона этилена этиолированными проростками *Phaseolus vulgaris* и листовыми дисками сои *Glycine max*. В низких концентрациях этилен вызывает стимуляцию элонгации клеток мха *Athyrium filix-femina*, а добавление АХ в концентрации 10^{-5} М ингибирует процесс в 1,5–2 раза. Антагонист АХ атропин ($>10^{-6}$ М) уменьшает действие ауксина на рост, а также сокращает количество цвет-

ков на растениях по сравнению с вариантами опытов, в которых использовалась только ИУК.

Имеются результаты, касающиеся и конкурентных отношений с гиббереллином. Показано, что АХ и ингибиторы АХЭ могут подавлять биосинтез гибберелловой кислоты. АХЭ как фермент, гидролизующий АХ, может быть включена во взаимоотношения *холин — ауксин*, что в конечном счете также влияет на ростовой процесс.

4.2. ФОТОСИНТЕЗ И ВОДООБМЕН

Польским исследователям удалось показать, что АХ оказывает влияние на процессы фотосинтеза и водообмена, определяющие рост и развитие растений. С этой целью побеги *Urtica dioica* срезались и помещались на 48 ч в воду (контрольный раствор) и воду, содержащую антагонист мускаринового рецептора АХ атропин (10^{-6} моль/л) или антагонист никотинового рецептора тубокурарин ($3 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Спустя 48 ч приготавливались срезы листьев для микроскопического анализа. Выдерживание *Urtica dioica* в растворах с антагонистами АХ приводило к определенным морфо-анатомическим изменениям листьев. При действии атропина отмечались уменьшение размеров клеток палисадной и губчатой паренхимы, межклеточного пространства, вакуолей. В присутствии тубокурарина уменьшался размер клеток палисадной паренхимы.

Наибольшей модификации под влиянием антагонистов подвергались хлоропласты: уменьшался их размер, наблюдалась пролиферация тилакоидных мембран (рис. 4.1).

Наблюдаемые эффекты аналогичны функциональной адаптации растений к ксероморфизму и затенению.

Приведенные выше закономерности проявляются в опытах по влиянию тех же антагонистов на водный баланс (поступление воды в побег) *Urtica dioica*. Побеги *Urtica dioica* помещались в воду (контроль), содержащую 10^{-6} моль/л атропина и $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л тубокурарина (вариант 1) или оба антагониста в тех же концентрациях и 10^{-6} моль/л АХ (вариант 2). После 48 ч листья, находящиеся в воде с антагонистами, теряли тургор и подсыхали, тогда как присутствие АХ в растворе предотвращало действие антагонистов (рис. 4.2).

Проведенные опыты, по крайней мере для *Urtica dioica*, доказывают, что холинэргическая система может вовлекаться в регуляцию водного гомеостаза и фотосинтеза в растениях. Кроме того, становится возможным присутствие сходных с АХ рецепторами животных клеток структур в растениях.

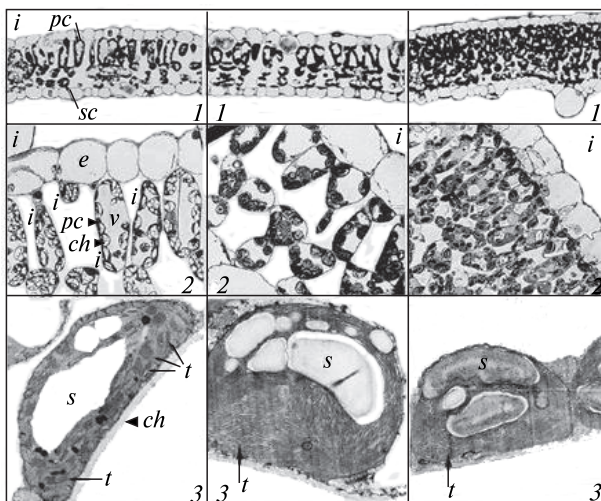


Рис. 4.1. Анатомо-морфологическое строение листа после 48 ч выдерживания побегов *Urtica dioica* в воде (левый столбец), с добавлением в водную среду $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л тубокурарина (средний столбец) и 10^{-6} моль/л атропина (правый столбец): ряд 1 – под световым микроскопом; ряды 2 и 3 – под электронным микроскопом; *e* – клетки эпидермиса; *pc* и *sc* – клетки палисадной и губчатой паренхим; *ch* – хлоропласты; *v* – вакуоль; *i* – межклеточные пространства; *t* – тилакоидные мембраны; *s* – крахмальные зерна (I. Wessler [et al.], 2001)



Рис. 4.2. Поступление воды в срезанные побеги *Urtica dioica* после 48-часового выдерживания в воде (CON) (а), в воде с добавлением 10^{-6} моль/л атропина и $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л тубокурарина (ATR/TC) (б) и обоих агонистов вместе с 10^{-6} моль/л АХ (ATR/TC + АСh) (в) (I. Wessler [et al.], 2001)

Российскими учеными на этиолированных проростках кукурузы (*Zea mays* L.) выявлено влияние адреналина на водонагнетающую деятельность корней. Установлено стимулирующее действие биомедиатора в концентрации 10^{-6} моль/л на корневое давление.

4.3. ДВИЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Как известно, нейромедиаторы участвуют в двигательных реакциях животных, контролируемых холинэргической и адренэргической системами. Движения свойственны и растительным видам (перемещения внутриклеточных элементов в клетке, а также настические движения и тропизмы целых растений или отдельных их частей (см. гл. 3). В живых клетках ряда растений движение цитоплазмы обнаруживает сходство с мышечным сокращением. В растениях и микроорганизмах сократительные элементы клетки также чувствительны к медиаторам, особенно в реакциях подвижности.

Катехоламины. Школой грузинских исследователей проведены обстоятельное изучение действия ряда биогенных аминов на скорость движения цитоплазмы и РЭП клеток харовых водорослей. Так, установлено, что адреналин и норадреналин начинали проявлять свое действие на циклоз и РЭП клетки *Nitella* в концентрации 10^{-7} М и выше, причем изменения носили колебательный характер.

Представление о концентрационном диапазоне действия ряда испытанных препаратов на циклоз дает рис. 4.3.



Рис. 4.3. Пороговые концентрации (о) и испытанные диапазоны действующих концентраций (—) биогенных аминов (Д. А. Ониани, 1997)

Процесс движения цитоплазмы при действии серотонина носил колебательный характер. Концентрации серотонина в среде до 10^{-5} М вызывали повышение скорости циклоза, тогда как при действии более высоких (10^{-4} М) скорость уменьшалась и падало значение РЭП.

Связь этих явлений с действием биомедиаторов на сократительные белки подтверждается опытами японского ученого, который исследовал процессы сокращения протопластов отдельных клеток корней *Phaseolus aureus* и показал, что они чувствительны к экзогенному АХ. Протопласты клеток перидикла апекса корня были также способны к сокращению под влиянием АХ. В связи с этим было высказано предположение, что в чувствительных к АХ клетках растений протоплазматическая мембрана включает сократительные белки.

Польскими исследователями доказано, что АХ также индуцирует Ca^{2+} -зависимое набухание протопластов мезофилла листа этиолированных проростков пшеницы *Triticum aestivum*. Набухание протопластов у проростков пшеницы может быть вызвано АХ, а также другими гормональными веществами.

Сократительные белки, по-видимому, играют определенную роль также в передаче и распространении хемосигналов с поверхности внутрь клетки. Это показано на вегетативных микроспорах хвоща полевого *Equisetum arvense* и генеративных микроспорах – пыльца гиппеаструма *Hippeastrum hybridum*. В качестве сигнальных молекул использовались дофамин и серотонин, стимулирующие прорастание микроспор. При обработке клетки цитохалазином В (ингибитор полимеризации актина в микрофиламентах), колхицином и винбластином (ингибиторы полимеризации тубулина в микротрубочках) у обоих типов микроспор наблюдали ингибирование развития. На основании полученных закономерностей сделано предположение, что передача сигнала от этих соединений с поверхности внутрь клетки от плазматической мембраны к ядру проходит с участием сократительных белков и, возможно, инициирует деление ядра, а затем и последующее прорастание микроспор.

Сократительные системы проводящих тканей растений также чувствительны к медиаторам. Обнаружили значительную (на 40–50 % от контроля) стимуляцию АХ ($5 \cdot 10^{-5}$ – 10^{-3} М) корневого давления у подсолнечника *Helianthus annuus* и экссудации ксилемного сока проростками кукурузы *Zea mays*. Норадреналин, адреналин и серотонин также стимулируют экссудацию ксилемного сока корней этих растений. Наблюдаемые эффекты объясняют воздействием биомедиаторов на сократительные белки (особенно на актин) сосудов растений. Недавним подтверждением этому стали эксперименты китайских исследователей (Е. Yung [et al.], 2007), в которых показано, что АХ ускорял транспорт ассимилятов, управ-

ляемый актиновыми филаментами флоэмной сосудистой системы у проростков редиса *Raphanus sativus*.

В исследованиях по влиянию биомедиаторов на двигательные реакции растений особое внимание, как уже отмечалось, привлекают локомоторные растения. У растений *Albizia julibrissin*, *Mimosa pudica*, *Samanea saman* быстрое складывание листьев происходит в результате изменения тургорного давления в особых моторных клетках, называемых подушечками, которые располагаются у основания черешка или мелких черешочков листьев. Благодаря изменению тургорного давления (связано с поступлением и выделением воды) в этих клетках, расположенных на разных сторонах подушечек, осуществляется быстрое складывание и опускание листьев при механическом воздействии.

Как было отмечено ранее, потеря тургора при раздражении связана с распространяющимся к подушечкам электрическим сигналом в виде ПД или ВП, который возникает при участии медиаторов. Результаты проведенных опытов показали, что концентрация эндогенного АХ в листьях и листовых подушечках у *Mimosa pudica* оказалась примерно одинаковой и экзогенный АХ в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} М не вызывает листовых движений. В этой связи полагают, что в движениях таких растений принимает участие норадреналин, содержание которого в подушечках и осях больше, чем в листовых пластинках.

Однако АХ и гидролизующий его фермент АХЭ могут быть связаны с подвижностью листьев в некоторых видах бобовых растений, чувствительных к механическому раздражению или тепловому стрессу. Так, у фасоли темнопурпурной *Macroptilium atropurpureum* японские исследователи (Y. S. Momonoki; T. Momonoki, 1993) обнаружили, что количество АХ во вторичных подушечках обычно выше, чем в листе, а в первичных – ниже. Причем активность АХЭ в первичных подушечках была в 4–12 раз выше, чем в листьях, черешках, стебле и корнях.

Тепловой стресс увеличивает активность АХЭ (возможно, вследствие возрастания количества АХ) в первичных подушечках в 4 раза, а во вторичных – в 2 раза. Это сопровождается опусканием листьев и закручиванием черешков при тепловом раздражении. Погружение отделенных завядших побегов в раствор АХ ускорило восстановление тургорного давления в подушечках растения.

Всегда считалось, что биомедиаторы, в частности АХ, могут действовать только на организменном уровне. Однако есть основания предполагать его участие во взаимоотношениях между организмами. Об этом говорят следующие факты. Во-первых, АХ играет важную роль в поддержании симбиоза клубеньковые бактерии – бобовое растение, так как может регулировать подвижность клубеньковых бактерий (*Rhizobium*) в почвенном

растворе. В клубеньках найден фермент АХЭ. Однако нет доказательств, что фермент принадлежит собственно бактериям, а не клеткам растений. Во-вторых, АХ, гистамин, серотонин являются распространенными продуктами выделений растений и как экзогенные продукты могут оказывать аллелопатическое влияние на фитоценоз. Так, АХ и другие медиаторы вымываются из листовых волосков крапивы, где содержатся в больших количествах. Таким образом, при дожде, тумане и росе почва, на которой произрастает крапива, может быть обогащена холиновыми эфирами, что влияет на сопутствующие организмы.

Известна роль АХ в подавлении у бактерий хемотаксиса, например у *Pseudomonas fluorescens*, что может рассматриваться как результат активности соединений, экскретируемых некоторыми видами растений. При концентрации $1,5 \cdot 10^{-3}$ М он на 30 % ингибирует подвижность фотосинтезирующих бактерий *Rhodospirillum rubrum* и *Thiospirillum jenense*.

Катехоламины и серотонин также проявляют активность при хемотаксисе бактерий, что подтверждает их влияние на сократительные белки.

4.4. БАРЬЕРНО-ТРАНСПОРТНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН

Основной механизм действия биомедиаторов в животных клетках состоит в модификации транспортных свойств мембран. В растительных клетках действие биомедиаторов также связано с изменением ионной проницаемости плазмалеммы, сдвигом мембранного потенциала и связанными с ними процессами.

Говоря о мембранотропном действии какого-либо вещества, имеют в виду прямую или косвенную (опосредованную) модификацию мембранных структур, вызываемую соответствующими соединениями, и наступающие в результате этого изменения свойств биологической мембраны, прежде всего транспортных характеристик.

Плазматическая мембрана любой клетки выступает первичной мишенью воздействия различных экзогенных соединений.

К наиболее ранним проявлениям мембранотропных эффектов экзогенных химических соединений относится изменение электрических характеристик (мембранный потенциал) и ионной проницаемости плазматической мембраны.

Мембрана, которая служит барьером для диффундирующего соединения, состоит из липидного матрикса, поэтому скорость прохождения химического агента через этот барьер в значительной степени зависит от его поведения в липидной фазе. В связи с этим скорость переноса иона определяется несколькими факторами.

В общем виде ее можно представить как произведение движущей силы на концентрацию (активность) и подвижность агента в мембране.

Если обозначить S количество вещества, входящего в клетку, тогда dS/dt будет скоростью его проникновения. Поток Φ – скорость поступления вещества в расчете на единицу площади, или $(1/A) (dS/dt)$, где A – площадь клеточной мембраны, через которую диффундирует вещество. Вводя коэффициент распределения в это выражение для потока, можно записать первый закон Фикса в виде

$$\Phi = -D dC/dt;$$
$$1/A dS/dt = DK (C^H - C^B) / \Delta X,$$

где dS/dt положительно, когда вещество входит в клетку, т. е. когда концентрация вещества вне клетки (C^H) больше его концентрации в клетке (C^B).

Для того чтобы определить количество вещества, проходящего через мембрану, необходимо знать величину множителя $DK/\Delta X$.

Однако пока коэффициент D в мембране определить не удалось, путь, пройденный веществом через мембрану (ΔX), не обязательно равен толщине мембраны, и имеется некая неопределенность величины константы распределения (K). Поэтому вводится понятие *коэффициента проницаемости мембраны* (P), заменяющего трудно измеряемые экспериментально значения:

$$P = DK/\Delta X,$$

где P имеет размерность скорости (см/с) и является единственной измеряемой величиной, характеризующей свойства мембраны и растворенного вещества.

Коэффициент проницаемости мембраны определяется для данного вещества как алгебраическая сумма молей вещества, прошедших через 1 см^2 мембраны в единицу времени, при условии, что разность концентраций по обе стороны мембраны составляет $1 \text{ моль} / \text{см}^3$.

Величину коэффициента проницаемости мембраны легко вычислить, используя выражение $dS/dt = PA (C^H - C^B)$, а также из измерений величин РЭП и сопротивление мембраны.

Пассивный перенос любого соединения через мембрану может осуществляться по каналам (ионные и неселективные каналы) и с участием переносчиков. В ответ на физиологические раздражители меняются конфигурация канала и проницаемость мембраны.

Ацетилхолин. Показано, что АХ способен увеличивать ионную проницаемость мембран растительных клеток и вызывать изменения мембранного потенциала. Отмечалось, что под влиянием АХ, также как и красной свет, протоны выходят из клеток корней растений в наружную среду и

происходит сдвиг мембранного потенциала. В табл. 4.4 приведены данные о влиянии АХ на ионную проницаемость у разных растений. Чаще всего под влиянием АХ (10^{-6} – 10^{-4} М) происходит деполяризация – снижение мембранного потенциала покоя и изменение K^{+} -проницаемости клеток. Проницаемость плазмалеммы целых клеток проростков и харовых водорослей обычно увеличивается для ионов K^{+} , Ca^{2+} , Cl^{-} и часто сопровождается выходом протонов в окружающую среду.

Таблица 4.4

Изменения ионной проницаемости мембран растительных клеток под влиянием ацетилхолина
(В. В. Рощина, 1991)

Растение	Орган	Ионная проницаемость	Концентрация, моль/л
<i>Avena</i>	Колеоптиль	Изменялись Ca^{2+} и H^{+} -проницаемость	10^{-4}
<i>Nitella</i>	Клетка	Увеличивалась K^{+} -проницаемость	10^{-5} – 10^{-3}
<i>Phaseolus aureus</i>	Корни	Увеличивалась H^{+} -проницаемость	10^{-5}
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Этиолированный гипокотиль	Увеличивалась K^{+} -проницаемость	10^{-6}
<i>Pisum sativum</i>	Корни	Увеличивалась K^{+} -проницаемость	10^{-4}

В опытах с хлореллой было также зарегистрировано влияние АХ на потоки протонов и калия (рис. 4.4).

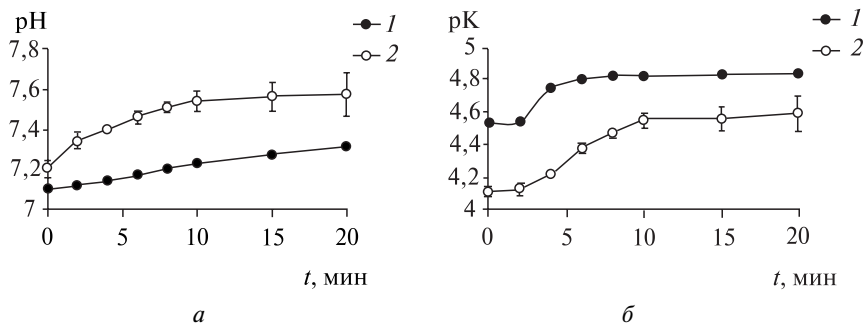


Рис. 4.4. Влияние ацетилхолина (10^{-4} М) на потоки H^{+} (а) и K^{+} (б) через мембрану клеток *Chlorella*: 1 – контроль; 2 – в присутствии АХ

Снижение мембранного потенциала АХ наблюдается и в других опытах. Например, разность потенциалов между верхушкой и местом среза этиолированного гипокотыла фасоли *Phaseolus vulgaris* обычно составляет около -30 мВ, а на синем свете с длиной волны 430 нм — -37 мВ.

Изменения проницаемости плазмалеммы под влиянием экзогенного АХ напоминают явления, происходящие в синапсах животных клеток, где АХ, вступая в контакт с постсинаптической мембраной, вызывает увеличение проницаемости для ионов Na^+ и K^+ и тем самым генерирует распространяющийся ПД.

Рассмотренные нами двигательные и ростовые реакции растений также связаны с действием АХ на функционирование ионных каналов. Эффекты экзогенного АХ при добавлении солей калия или кальция на вторичные подушечки листьев фасоли темно-пурпурной *Macroptilium atropurpureum*, закрывающихся при механическом или тепловом раздражении, исследовались японскими учеными. Они обнаружили, что погружение отделенных от растения поникших побегов в раствор АХ (10^{-6} – 10^{-5} М) в присутствии солей калия или кальция значительно ускоряет восстановление обычного вида растения. Возможно, что АХ контролирует ионные или гормональные потоки, вызывающие открывание ионных каналов вторичных подушечек листьев.

Как мы уже отмечали, при двигательных реакциях органов растений, в качестве сигнальной системы выступает ПД. Если АХ вызывает изменение проницаемости, как это происходит в возбудимых мембранах животных клеток, то он может взаимодействовать с электрической сигнальной системой в растительной клетке. Действительно, на клетках *Nitellopsis obtusa* было отмечено замедление развития нисходящей фазы ПД при действии 10^{-3} М АХ. Выдерживание клетки длительное время (16 ч) в присутствии в растворе АХ приводило к уменьшению скорости реполяризации ПД в 2 раза.

В интактных клетках харовой водоросли *Chara corallina* при действии АХ также отмечено пролонгирование нисходящей фазы ПД (табл. 4.5).

Таблица 4.5

Эффект ацетилхолина на нисходящую фазу потенциала действия

(Х. Q. Gong, М. А. Bisson, 2002)

Параметр	Контроль	Контроль + АХ, 10^{-3} М
Начальная скорость реполяризации, мВ/с	$35,0 \pm 1,3$	$19,0 \pm 0,9$
Время окончания быстрой фазы реполяризации, с	$4,63 \pm 0,20$	$5,31 \pm 0,24$

Первые исследования влияния медиаторов на изолированные органеллы были выполнены на митохондриях, выделенных из различных органов животных. При обработке митохондрий АХ (10^{-3} М) отмечено торможение их набухания. Российскими исследователями (V. V. Roshchina, E. N. Mukhin, 1985) обнаружено аналогичное явление на изолированных хлоропластах гороха. Так, АХ (10^{-4} – 10^{-3} М) тормозил набухание хлоропластов в изотонической среде, причем на свету в большей мере, чем в темноте. Набухание, как известно, связано с поступлением воды внутрь органеллы по осмотическому градиенту, в создании которого принимают участия и ионы. Поскольку высокие концентрации АХ (10^{-3} М) тормозят процесс, то следует предположить, что медиатор увеличивает проницаемость мембран хлоропластов для ионов. Об этом свидетельствуют и данные по изменению мембранного потенциала пластид, косвенным показателем которого является светоиндуцированное изменение адсорбции при длине волны 520 нм. В проведенных опытах рост содержания АХ в среде приводил к уменьшению регистрируемой величины на 40 %. Этот эффект можно рассматривать как снижение мембранного потенциала.

Чтобы установить, с переносом каких ионов связано падение мембранного потенциала пластид при действии АХ, были поставлены специальные опыты с регистрацией ионных потоков в суспензии интактных хлоропластов гороха. В этих опытах установлено изменение мембранного потенциала под влиянием экзогенного АХ в концентрациях 10^{-9} – 10^{-7} М, что было связано с выходом в наружную среду ионов Na^+ и K^+ . Полученные кривые, характеризующие потоки ионов, выходили на плато при концентрациях 10^{-6} – 10^{-5} М (рис. 4.5).

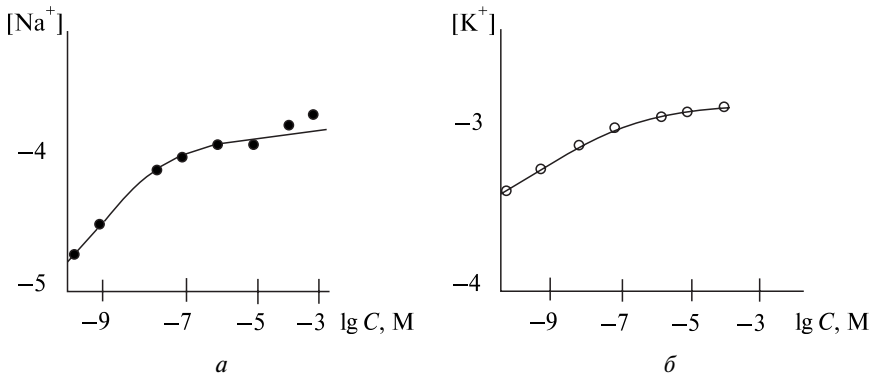


Рис. 4.5. Концентрационная зависимость действия ацетилхолина бромида на выделение ионов Na^+ (а) и K^+ (б) интактными хлоропластами гороха (В. В. Рощина, 1991)

Выход концентрационных кривых на плато свидетельствует о том, что количество мест связывания АХ в мембранах хлоропластов ограничено. Реакция была одинаковой независимо от того, освещались ли пластиды или находились в темноте. Концентрация Na^+ в окружающем растворе вследствие выхода ионов из пластид увеличивалась в 15 раз по сравнению с первоначальной, а содержание K^+ – в 2 раза. Выход ионов Na^+ и K^+ сопровождался поглощением ионов водорода в темноте как интактными хлоропластами, так и тилакоидами. АХ может регулировать движение молекул через мембраны за счет взаимодействия с липидной фракцией мембран. Это подтверждается тем, что низкая концентрация (10^{-8} М) АХ ингибирует включение радиоактивного фосфора в фосфолипиды, контролирующие транспорт веществ через мембрану.

Изменения мембранного потенциала и проницаемости для некоторых ионов происходят под влиянием АХ также в вакуолярной мембране. Например, в присутствии АХ (10^{-4} – $4 \cdot 10^{-3}$ М) отмечается зависимость от хлорных каналов деполяризация как плазмалеммы, так и тонопласта харовой водоросли *Chara corallina*. В дисках корнеплода красной свеклы АХ стимулирует выход ионов кальция из цитоплазмы и снижает натриевый поток наружу. При этом изменялась проницаемость и тонопласта, поскольку наблюдается усиление выхода красного пигмента бетацианина из вакуоли.

Биогенные амины. Подобно АХ биогенные амины также способны изменять проницаемость мембран и мембранный потенциал растительных клеток.

В табл. 4.6 сравниваются эффекты дофамина, норадреналина, серотонина и гистамина на ионную проницаемость клеток. В дисках из корнеплодов красной свеклы дофамин достоверно уменьшал выход из клеток Ca^{2+} . Серотонин и гистамин снижали транспорт Na^+ через плазмалемму. Гистамин, кроме того, снижал и Mg^{2+} -поток наружу. Помимо эффектов на плазмалемму, под действием серотонина и гистамина наблюдался выход из вакуолей в наружную среду красного пигмента бетацианина, что указывает и на повышение проницаемости тонопласта.

Таблица 4.6

Действие биогенных аминов (10^{-6} М) на проницаемость мембран клеток корнеплода красной свеклы *Beta vulgaris var. rubra* (V. V. Roshchina, 2001)

Варианты	Ионы, мкг/л				Бетацианин
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	
Контроль	$3,47 \pm 0,03$	$5,30 \pm 0,01$	$6,51 \pm 0,03$	$5,80 \pm 0,02$	Нет эффекта
Дофамин	$0,95 \pm 0,08$	$4,80 \pm 0,50$	$3,35 \pm 0,02$	$5,80 \pm 0,01$	Нет эффекта

Варианты	Ионы, мкг/л				Бетацанин
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	
Норадреналин	3,38 ± 0,02	5,30 ± 0,5	6,61 ± 0,05	4,80 ± 0,50	Нет эффекта
Серотонин	1,03 ± 0,10	4,80 ± 0,05	1,60 ± 0,07	5,30 ± 0,50	Стимулирует
Гистамин	0,77 ± 0,005	4,30 ± 0,04	3,95 ± 0,3	4,80 ± 0,05	Стимулирует

Примечание. Выход ионов и бетацанина регистрировали спустя час после начала опыта.

В заключение отметим, что биогенные амины чаще стимулируют проницаемость для Ca²⁺, тогда как АХ – для Na⁺ и K⁺.

Что касается ГАМК, то экспериментальные результаты по ее действию на растения отсутствуют. Исключением является работа, в которой нами рассматривается влияние ГАМК и ее аналога ФГАМК на электрические характеристики плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis* и ее проницаемость к ионам калия и натрия. Добавление в контрольный раствор 10⁻³ моль/л ГАМК вызывает увеличение мембранного потенциала, тогда как ФГАМК при концентрации на порядок ниже деполяризует мембрану (рис. 4.6).

Наиболее заметные изменения проницаемости мембраны к ионам K⁺ и Na⁺ по отношению к контролю отмечаются под действием ФГАМК (табл. 4.7)

Таблица 4.7

**Величины коэффициентов проницаемости
плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis*
(В. М. Юрин [и др.], 1976)**

Вариант	Коэффициенты проницаемости, см/с	
	$P_K \cdot 10^{-6}$	$P_{Na} \cdot 10^{-7}$
Контроль	5,0	0,65
ГАМК, 10 ⁻⁴	3,5	0,63
ГАМК, 10 ⁻³	5,1	1,0
ФГАМК, 5 · 10 ⁻⁵	1,0	1,0
ФГАМК, 10 ⁻⁴	0,7	0,7

В отличие от животных, у растений передача сигнала от клетки к клетке с участием биомедиаторов идет не по щелевым синаптическим контактам, а через непрерывные цитоплазматические структуры. Следовательно

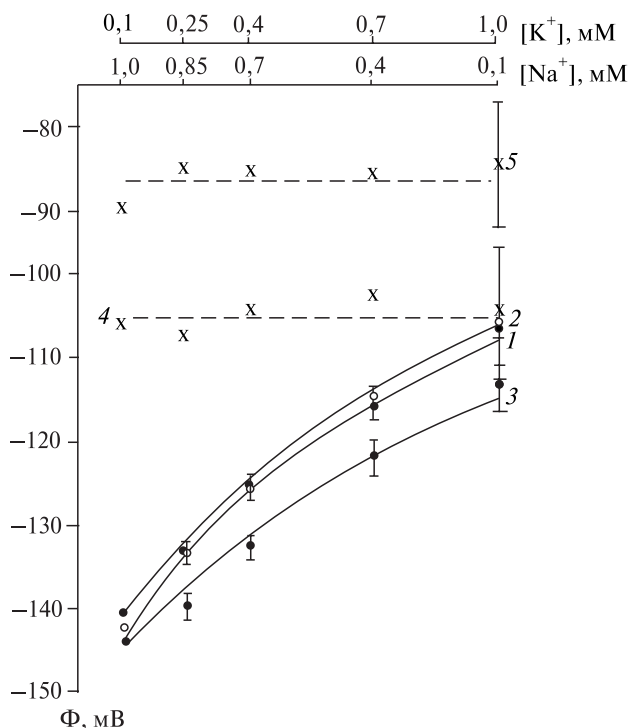


Рис. 4.6. Концентрационная зависимость величин разности электрических потенциалов плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis*:
 1 – контроль; 2, 3 – при добавлении 10^{-4} и 10^{-3} М ГАМК;
 4, 5 – при добавлении $5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} М ФГАМК
 (В. М. Юрин [и др.], 1976)

но, в растительных клетках АХ и другие медиаторы участвуют в передаче сигнала по плазматическим ттяжам внутри клеток. Поскольку медиаторы присутствуют и в одноклеточных организмах, можно полагать, что они участвуют в передаче сигнала от плазмалеммы к органеллам и между органеллами. В связи с предположением о роли медиаторов во внутриклеточной сигнализации были выполнены работы по изучению влияния АХ и биогенных аминов на ионную проницаемость и мембранный потенциал органелл.

Норадреналин, адреналин и серотонин не влияли на выход K^+ и Na^+ из хлоропластов, но стимулировали выделение ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} ; их действие начинало проявляться в низких концентрациях (10^{-8} М) и усиливалось при 10^{-7} М, после чего следовало насыщение (рис. 4.7).

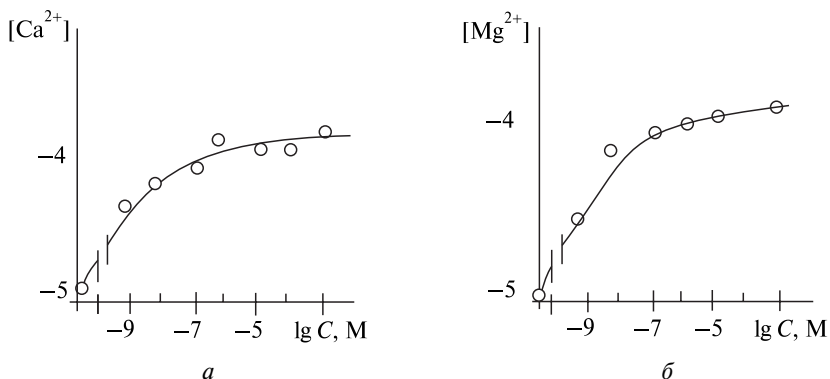


Рис. 4.7. Действие норадреналина на выход Ca^{2+} (а) и Mg^{2+} (б) из интактных хлоропластов гороха (В. В. Рощина, 1991)

В хлоропластах найдены кальциевые каналы и кальцийрегулирующий белок кальмодулин. Возможно, что это главная мишень для биогенных аминов в пластидах.

4.5. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Действие медиаторов на рост может быть опосредовано стимуляцией или ингибированием реакций обмена веществ и энергии, оцениваемым по скорости электронного транспорта и сопряженного фосфорилирования, флуоресценции, по разнообразным процессам окисления-восстановления и т. д.

Энергетические процессы. В 70-е гг. XX в. целым рядом исследователей было установлено, что даже небольшие концентрации АХ (10^{-8} М) вызывают 70%-е падение уровня эндогенного АТФ как в изолированных митохондриях корней бобов *Phaseolus aureus*, так и в стеблях фасоли *Phaseolus vulgaris*. В проявлении эффектов АХ большую роль играет свет. КС сам по себе значительно увеличивает уровень АТФ в этиолированных зародышевых почках фасоли, а АХ почти наполовину снижает его (табл. 4.8).

АХ стимулирует поглощение кислорода целыми и изолированными митохондриями корней *Phaseolus aureus*, но практически не влияет на физиологический показатель интенсивности дыхания (Φ/O) и утилизацию неорганического фосфата.

Таблица 4.8

Действие ацетилхолина и красного света на содержание аденозинтрифосфата в этиолированных зародышевых почках фасоли
(В. В. Рощина, 1991)

Концентрация АХ, М	Содержание АТФ, % от контроля
6 мин темноты	100
10^{-3}	31
10^{-7}	22
10^{-11}	29
5 мин КС +1 мин темноты	198
10^{-3}	126
10^{-7}	110
10^{-11}	128

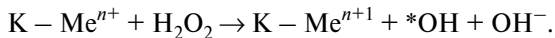
В изолированных хлоропластах гороха *Pisum sativum* низкие концентрации АХ ($<10^{-5}$ М) увеличивают скорость фотофосфорилирования по сравнению с контролем в 2 раза, а в более высоких – угнетают, при этом не влияя на электронный транспорт. Предполагают, что стимуляция синтеза АТФ на свету в хлоропластах обусловлена действием на АТФ-синтазу, поскольку АХ снижает Mg^{2+} -зависимую светоиндуцируемую АТФазную активность этого фермента.

Сегодня нет единого мнения о механизме влияния АХ на синтез АТФ. Одни считают, что стимуляция синтеза на свету в хлоропластах обусловлена непосредственным влиянием на АТФ-синтазу. Другие полагают, что возможно опосредованное рецепторное действие на фотофосфорилирование.

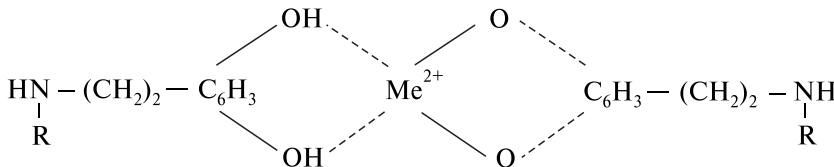
Действие биогенных аминов на энергетические реакции митохондрий растений пока не исследовано. Более детально изучены эффекты биогенных аминов на фотохимическую активность хлоропластов. Дофамин, адреналин, норадреналин, серотонин и гистамин не влияли на фотовосстановление $НАДФ^+$, но в концентрациях ниже 10^{-5} М все эти соединения, исключая серотонин, стимулировали фотофосфорилирование. Максимальная стимуляция синтеза АТФ (в 2 раза) наблюдалась при концентрациях катехоламинов 10^{-8} – 10^{-7} М. Примерно в тех же концентрациях повышает скорость фотофосфорилирования и АХ.

Реакции окисления-восстановления. Дофамин, адреналин и норадреналин как соединения, имеющие двойные связи и гидроксильные группы, могут вступать в окислительно-восстановительные реакции присоединения и отдачи электронов и протонов. Простейшая реакция автоокисления катехоламинов происходит при переносе электронов на молекулярный

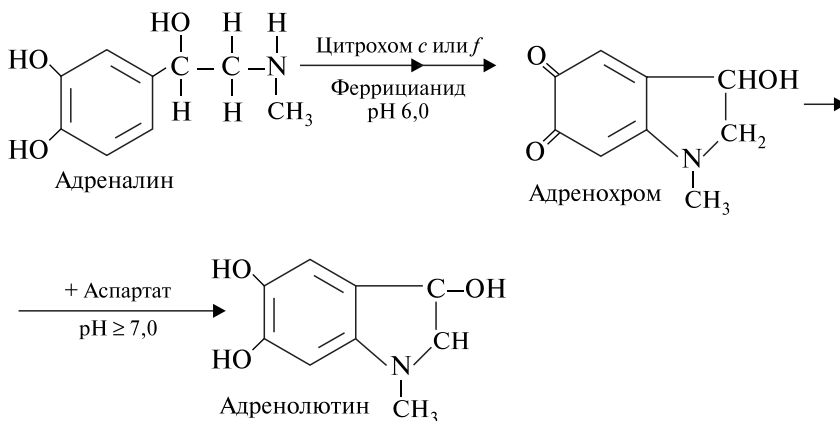
кислород воздуха с возможным образованием перекиси. Этот процесс значительно ускоряется в присутствии ионов металлов Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , которые образуют комплексы с катехоламинами ($K - Me$) и реагируют с кислородом (перекисью водорода) согласно уравнению Фентона:



В бескислородной среде медь и железо образуют комплекс с катехоламинами в соотношении 1:2, например с адреналином:



Адреналин на воздухе легко превращается в адренохром, а затем в щелочной среде в присутствии аскорбата – в адренолютин:



Адренохром легко образуется в присутствии ионов Fe^{3+} и Cu^{2+} и с еще большей скоростью (в 2-3 раза) – железосодержащих белков – ферритина, метгемоглобина, окисленного цитохрома *c*. Это окисленное производное адреналина является токсичным продуктом для тканей животных и в ряде случаев служит причиной различных заболеваний при накоплении катехоламинов организмом в стрессовых условиях.

Эксперименты с изолированными переносчиками электронов хлоропластов: ферредоксином, ферредоксин-НАДФ-редуктазой, пластоцианином из гороха, а также цитохромом *f* (C_{553}) из хлореллы показали, что в присутствии кислорода воздуха в высоких концентрациях ($>10^{-5}$ М) дофамин, норадреналин и адреналин могут вступать в окислительно-вос-

становительные реакции с переносчиками электронов, расположенными между фотосистемами II и I. Способность катехоламинов быть донорами электронов в ЭТЦ проверялась и подтвердилась на изолированных хлоропластах. Показано также, что экзогенный дофамин как оксидант может участвовать в механизме разложения воды при освещении хлоропластов шпината. Кислород, образуемый хлоропластами, может также окислять адреналин до красного продукта адrenoхрома, и это окисление происходит на уровне фотосистемы II.

Флуоресценция служит важным показателем сопряжения энергетических процессов в клетке. АХ и биогенные амины оказывают влияние на флуоресценцию изолированных пигментов и интактных клеток. Например, в ряде экспериментов обнаружено значительное снижение флуоресценции изолированного фикоэритрина водорослей адреналином, нор-адреналином, дофамином, серотонином и гистамином (табл. 4.9).

Таблица 4.9

**Ингибирование флуоресценции фикоэритрина
при 565 нм трансммиттерами и родственными соединениями**
(В. В. Рошина, 1991)

Соединение	Концентрация, М	% ингибирования
Адреналин	$5 \cdot 10^{-7}$	62
-//-	10^{-6}	80
-//-	10^{-5}	100
Нор-адреналин	$3,5 \cdot 10^{-7}$	63
-//-	10^{-6}	83
L-3,4 –дигидроксифенил-аланин	$5 \cdot 10^{-7}$	60
-//-	10^{-6}	78
Дофамин	$3 \cdot 10^{-7}$	41
-//-	$6 \cdot 10^{-7}$	62
-//-	10^{-6}	82
Гомованилиновая кислота	10^{-6}	43
-//-	$2 \cdot 10^{-6}$	55
Серотонин	10^{-6}	75
-//-	$3 \cdot 10^{-6}$	83
-//-	10^{-5}	88
Гистамин	10^{-6}	19
-//-	10^{-5}	41
Аскорбат	$1,2 \cdot 10^{-6}$	100
НАДН	10^{-6}	100
НАДФ ⁺	10^{-3}	31

В работах сотрудников Института биофизики клетки РАН показано, что автофлуоресценция клеток поверхности рыльца пестика гиппеаструма *Hippeastrum hybridum* резко изменяется при добавлении АХ или гистамина. При этом изменяется форма спектров флуоресценции и увеличивается интенсивность эмиссии. Пыльца собственного вида (которая содержит АХ), добавленная к необработанному пестику, вызывает такие же изменения в спектре флуоресценции клеток, как и АХ. Поскольку пыльца ряда видов содержит и выделяет АХ и гистамин, по-видимому, именно эти медиаторы вызывают характерные изменения свечения.

Метаболические процессы. АХ и биогенные амины могут влиять на метаболизм растительных клеток путем регуляции активности ферментов и(или) включения в отдельные реакции в качестве субстратов.

Регуляция активности ферментов биомедиаторами демонстрируется рядом примеров. АХ в концентрациях 10^{-4} – 10^{-3} М стимулирует пероксидазную активность растительных тканей, а в более высоких – угнетает (ингибирование достигает 50 %). У ячменя *Hordeum vulgare* он также ингибирует активность фенилаланинаммонийлиазы, ключевого фермента синтеза фенолов. Имеются данные об ингибировании АХ, адреналином и норадреналином активности светоиндуцируемой Mg^{2+} -зависимой АТФазы хлоропластов гороха. Известна также способность гистамина подавлять лизоцимную активность латекса *Asclepias syriaca*.

АХ и биогенные амины могут включаться в метаболизм клетки и как субстраты-предшественники для образования различных метаболитов. АХ служит предшественником холина при образовании других холиновых эфиров, катехоламины – предшественники ванилиновой кислоты и алкалоидов, а серотонин – предшественник как алкалоидов, так и 5-гидроксииндолилуксусной кислоты. АХ может также включаться в метаболический путь биосинтеза этилена на уровне 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, ингибируя тем самым образование этого газа.

Стоит отметить, что при окислении катехоламинов образуются их свободные радикалы и супероксид анион радикал, которые весьма токсичны и могут окислять различные соединения. Благодаря этому окислительному механизму многие растения способны противостоять инфекциям, а у ряда водорослей присутствие, например, дофамина помогает в конкуренции за жизненное пространство против поедания морскими животными.

Адреналин, норадреналин и серотонин могут выступать в качестве гормонов и активных компонентов азотного обмена. Наблюдаемые двигательные реакции изменения роста и развития под влиянием трансмит-

теров свидетельствуют об их важнейшей роли в явлениях раздражимости растений.

В заключение отметим, что трансмиттеры участвуют в распространении возбуждения в виде электрического сигнала и выполняют функцию химических посредников между клетками, а также между органеллами внутри клетки. При этом происходят изменения мембранного потенциала вследствие изменений ионной проницаемости мембран, сдвиги в электронном транспорте и фосфорилировании в хлоропластах и митохондриях, многочисленные окислительно-восстановительные реакции, в том числе с образованием активных форм кислорода. Биомедиаторы регулируют метаболические и энергетические процессы, способствуя адаптации организма к изменениям окружающей среды как модуляторы.

Глава 5

СИСТЕМА ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ

В последние годы появились многочисленные исследования, в которых обсуждается связь действия растительных гормонов с медиаторными соединениями — низкомолекулярными белками и циклазами. Особое значение в этой системе придают цАМФ и цГМФ, которые играют важную регуляторную роль у животных и микроорганизмов.

Синтез цАМФ или цГМФ осуществляется в клетке из АТФ и ГТФ соответственно с помощью ферментов — циклаз — АЦ и ГЦ.

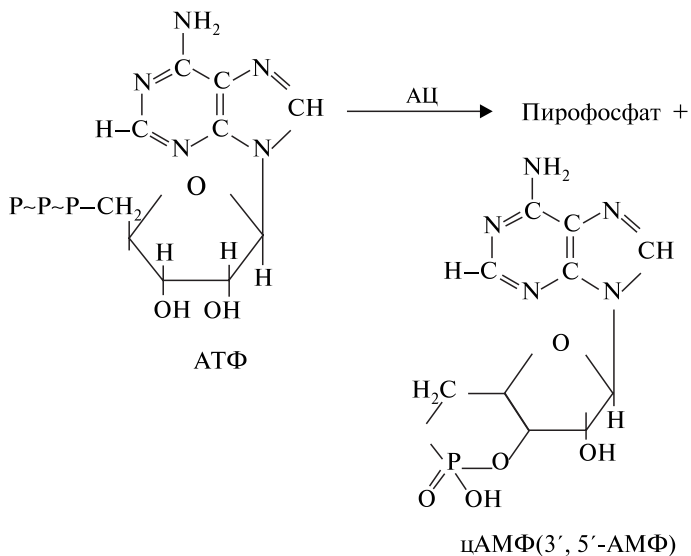


Рис. 5.1. Схема синтеза цАМФ (В. В. Рошина, 1991)

Для синтеза цАМФ из АТФ необходимо присутствие свободного иона Mg^{2+} и ГТФ (10^{-8} моль/л). Субстратом реакции является комплекс $Mg^{2+} - АТФ$. Когда концентрация АТФ значительно превышает уровень Mg^{2+} , реакция ингибируется; оптимальные условия реакции: АТФ $\sim 3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $Mg^{2+} - 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Для некоторых препаратов АЦ было продемонстрировано активирующее влияние Mn^{2+} .

По химической структуре циклические нуклеотиды значительно отличаются от обычных тем, что в их молекуле содержится 3,5-фосфатное кольцо, которое обладает большей энтальпией гидролиза. Это и определяет их уникальные биологические свойства. Многие биохимические реакции непосредственно контролируются циклическими нуклеотидами и инозитолтрифосфатной системой.

Для того чтобы различать номера атомов оснований и атомов сахара, к последним в нуклеотидах добавляется сверху штрих.

Сегодня считают, что синтез цАМФ в животных клетках осуществляется с участием двух эволюционно родственных семейств аденилатциклаз, представленных трансмембранными (тмАЦ) и растворимыми (рАЦ) формами фермента. Эти формы дополняют друг друга в процессах регуляции физиологических функций. Установлено, что диффузия цАМФ, обусловленная тмАЦ, происходит на расстоянии 1 мкм вследствие утилизации этого мессенджера. В этой связи синтез цАМФ вблизи внутриклеточных эффекторов может осуществлять рАЦ. Эти две формы АЦ различаются как по субклеточной локализации, так и по ответам на различные регуляторы.

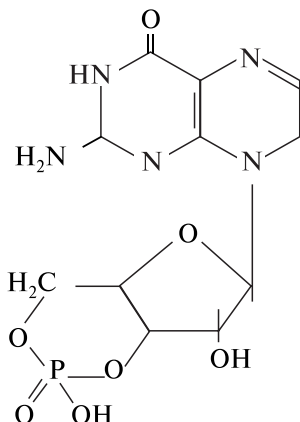
Доказательства присутствия тмАЦ у растений были получены на ультраструктурном уровне с использованием метода каталитической химии в 80-е гг. XX в. Биохимическими методами активность АЦ была обнаружена во фракциях митохондрий и вакуолярных мембранах. В настоящее время считается общепризнанным, что на плазматической мембране клеток различных тканей растений локализована тмАЦ.

По рАЦ растений информация противоречива. Тем не менее ряд полученных экспериментальных данных указывает на наличие в различных компартментах растительной клетки (клеточная стенка, цитозоль, вакуоль, ядра, митохондрии) рАЦ. Поэтому считают, что в клетках растений, как и в других живых системах, функционирование АЦ системы может осуществляться с участием трансмембранной и «растворимой» форм АЦ.

АЦ осуществляет и передачу сигнала внутрь клетки. Эффектор активирует АЦ, уровень цАМФ в клетке повышается, что приводит к реализации биологического ответа. Уровень АЦ в тканях животных составляет $(0,5-1,5) \cdot 10^{-6}$ моль/л.

Основное внимание при исследовании АЦ уделяется механизму регуляции ее активности, точнее, механизму функционального сопряжения гормонального рецептора с каталитической единицей (К) АЦ.

Активация АЦ требует обязательного наличия ГТФ:



Показано, что в систему АЦ-комплекса входит ГТФ-связывающий белок, который осуществляет сопряжение, например, β -адреноргических рецепторов с АЦ. Белок получил название G-белка (его также называют N-белком по его нуклеотидсвязывающей способности). На основании ряда данных был сделан вывод, что рецептор гормона, G-белок и АЦ — три независимых белка, которые сопряжены только функционально.

Ни эффектор (гормон), ни рецептор не взаимодействуют непосредственно с каталитической единицей АЦ. Комплекс с каталитической единицей АЦ способна образовывать только форма G-белка.

G-белок обладает двумя физиологически противоположными свойствами. Он обладает ГТФ-связывающими свойствами, позволяющими провести активацию АЦ ФАВ, и ГТФазными свойствами, обеспечивающими терминацию этого процесса.

При активации АЦ физиологически активными веществами ГТФ и свободные ионы Mg^{2+} взаимодействуют с G-белком циклазного комплекса.

Как считают в настоящее время, АЦ имеет трехкомпонентную структуру. Регуляторная субъединица находится ближе к наружной стороне мембраны и является составной частью или тесно связана с рецепторами. На внутренней стороне мембраны находится каталитическая субъединица, ответственная за превращение АТФ в цАМФ. В толще мембраны — сопрягающая субъединица (трансдуктор), через которую передается сигнал

от рецептора к каталитической субъединице. Каталитическая субъединица в отсутствие эффектора неактивна или имеет низкий уровень активности. При взаимодействии эффектора с регуляторной субъединицей каталитическая субъединица переходит в активное состояние, что и влечет быстрый синтез цАМФ из АТФ.

Доказательствами того, что циклические нуклеотиды являются сигнальными метаболитами, могут быть следующие:

- их наличие;
- концентрация циклических нуклеотидов *in vivo* должна быть достаточной, чтобы вызвать биологический ответ. Например, если ответ требует микромолярных концентраций экзогенного цАМФ, то эндогенная концентрация цАМФ также должна соответствовать микромолярным дозам;
- концентрация циклических нуклеотидов должна изменяться в ответ на стимулы, которые вызывают биологический ответ;
- в клетке должны присутствовать ферменты синтеза, катаболизма и молекулы-мишени нуклеотидов.

Циклические нуклеотиды – цАМФ (3', 5'-АМФ), а недавно и цГМФ (3', 5'-ГМФ) идентифицированы в растениях.

По данным ряда авторов, цАМФ найден в различных тканях растений: в паренхиме табака, семенах ячменя, семенах фасоли, проростках бобовых, клубнях картофеля, водорослях *Chlamidomonas reinhardtii*, *Eoglena gracillis*, *Nitella flexilis* и т. д. Примеры количественного содержания цАМФ в некоторых растениях приведены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Содержание цАМФ в растительных экстрактах
(B. Kessler, R. Levinstein, 1974)

Вид растения	Орган	Содержание цАМФ, 10 ⁻⁹ моль/г сырой массы
<i>Pisum sativum</i>	Этиолированные проростки	0,370
	Листья + стебли	0,170
		0,100
<i>Persea Americana</i>	Корни	1,300
		0,520
		0,140
	Листья нестерильные	0,860
	Листья стерильные	0,826
<i>Lemna gibba</i>	Побеги	1,040
		0,540
		0,112

Вид растения	Орган	Содержание цАМФ, 10^{-9} моль/г сырой массы
<i>Nicotiana tabacum</i>	Культура ткани	0,122 0,060
<i>Citrus limetiodes</i>	Листья нестерильные	0,264
	Листья стерильные	0,230
<i>Mangifera</i>	Листья нестерильные	1,270
	Листья стерильные	1,250

Присутствие цАМФ обнаружено и в изолированных хлоропластах фасоли *Phaseolus aureus* (табл. 5.2).

Таблица 5.2

**Содержание цАМФ, ферментов синтеза и катаболизма
в изолированных хлоропластах *Phaseolus aureus*
(В. В. Рощина, 1991)**

Условия	Содержание, 10^{-9} моль·г ⁻¹ сырой массы	Ферменты синтеза 10^{-9} моль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка АЦ	Ферменты катаболизма 10^{-9} моль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка ФДЭ
Свет	38,3	1,0	1,13
Темнота	12,2	—	—

Показано, что синтез цАМФ в растениях тесно связан с фосфорилированием (фото- и окислительным), в процессе которого образуется необходимый субстрат – АТФ. Синтез цАМФ на свету увеличивается в изолированных хлоропластах и побегах фасоли в 3–7 раз по сравнению с темнотой, что указывает на ключевую роль фотофосфорилирования как источника АТФ для образования циклического нуклеотида.

Было установлено (1987), что цАМФ в концентрации 10^{-5} – 10^{-6} моль/л участвует в эндогенном фотофосфорилировании белков диализованного кокосового молока из *Cocos nucifera*. Гидролиз цАМФ катализируется экстрактами различных водорослей и высших растений, т. е. из растений различного уровня организации. При обработке цАМФ экстрактами ферментов из водорослей наблюдается гидролиз с выделением 5'-АМФ, оптимум реакции лежит в области щелочных значений рН. Разрушение цАМФ экстрактами из высших растений было оптимальным при кислых значениях рН, и основным продуктом был уже 3'-АМФ.

Если пути синтеза цАМФ и его деградации в растениях и животных подобны, то в растительных клетках должны присутствовать АЦ и ФДЭ.

Действительно, в последние годы появились сообщения об аденилатциклазной активности, обнаруженной в экстрактах из корней люцерны, клещевины, гороха, листьев овса и т. д. Аналогичная активность обнаружена в плазматической и вакуолярной мембранах, во фракциях ядер, хлоропластов, митохондрий. АЦ растений — мембраносвязанный фермент (липопротеид), содержащий в основном фосфолипиды. Выделенный из корней люцерны *Medicago saliva* этот белок имеет молекулярную массу 84 кДа. Он активируется ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} , а также кальмодулином. АЦ животных имеют более высокие молекулярные массы — от 159 до 180–200 кДа и, возможно, являются димерами.

Также выявлено наличие у разных видов растений ФДЭ: в тканях гороха, картофеля, артишока и т. д. Для высших растений (проростки гороха) ФДЭ идентифицирована в цитозоле, во фракции органелл и плазмалемме.

Выделяют четыре типа ФДЭ, различающихся по субстратной и реакционной специфичности:

- ФДЭ 3', 5'-цАМФ животных и микроорганизмов, гидролизующая исключительно 3', 5'-цАМФ с образованием 5'-АМФ;
- ФДЭ 2', 3'-цАМФ, которая гидролизует только 2', 3'-цАМФ с образованием 3'-АМФ;
- ФДЭ, гидролизующая 3', 5'-цАМФ и 2', 3'-цАМФ — как у большинства растений;
- ФДЭ 2', 3'-цАМФ, которая разлагает только 2', 3'-цАМФ с образованием 2'-нуклеотидов.

ФДЭ растений в отличие от таковых у животных имеют четыре отличительные черты.

Во-первых, оптимальный для фермента растений рН находится в кислой области в интервале от 5 до 6. Во-вторых, ингибирование фосфодиэстераз метилксантинами происходит слабее и наблюдается не на всех растительных объектах. Тем не менее у водоросли *Chlamidomonas* отмечалось характерное ингибирование активности ФДЭ метилксантином, что приводило к повышению уровня цАМФ в клетке. Этот факт может свидетельствовать в пользу наличия системы цАМФ и сопутствующих ему ферментных систем в растениях. В-третьих, наиболее существенное отличие состоит в том, что растительные ФДЭ гидролизуют 3', 5'-цАМФ с образованием 3'- и 5'-АМФ, причем основным продуктом гидролиза является 3'-АМФ. В-четвертых, отмечается способность гидролизовать 2', 3'-цАМФ с образованием в качестве основного продукта 3'-АМФ.

Из других компонентов циклазной системы в растениях обнаружены связывающие циклические нуклеотиды белки, в частности связывающие цАМФ. Они выделены из проростков овса и корневища артишока,

корешков бобов. Из корешков бобов получены два компонента, один из которых связывает цАМФ и цГМФ, а другой — только цГМФ. Связывающий только цАМФ белок с молекулярной массой 250–300 кДа выделен из зародышей пшеницы.

До настоящего времени продолжают дискуссии о роли циклических нуклеотидов в растениях в растительных клетках.

Присутствие цАМФ в растениях не вызывает сомнения. Основная полемика касается реальной концентрации цАМФ в тканях высших растений. Ранее был установлен предел от 10^{-12} до $1,5 \cdot 10^{-9}$ моль/г сырого веса. Поскольку техника для измерения биологических метаболитов совершенствуется, многие из этих ранних оценок были пересмотрены. Это связано с тем, что ранее применявшаяся техника анализа не различала формы 2', 3'-цАМФ и 3', 5'-цАМФ. В 1989 г. была разработана новая методика. После устранения недостатков уровень цАМФ во всех растительных тканях, которые были протестированы, составлял всего 0,5 пмоль/г сырого веса ткани. Такие низкие концентрации могут свидетельствовать о том, что цАМФ в растениях не выполняет роли вторичного посредника, поскольку обычный уровень его в животных тканях составляет от 100 до 500 пмоль/г сырого веса. С другой стороны, следует все же более внимательно подойти к рассмотрению этих результатов (S. M. Assmann, 1995).

Действительно, уровень цАМФ у высших растений на 2–3 порядка ниже, чем у животных. Одно из объяснений различия в количественном содержании цАМФ в растениях и животных может заключаться в том, что в тканях растений цАМФ существует в какой-то модифицированной форме, например в виде гликолизированного производного. Наличие таких форм установлено для различных фитогормонов, причем известно, что, например, гликолизированные цитокинины более активны, чем их свободные формы.

Многие наблюдаемые эффекты в растительных системах возникают при действии миллимолярных концентраций экзогенного цАМФ. Эти эффекты, вероятно, являются неспецифическими или отражают наличие подобных с цАМФ других регуляторов; первыми кандидатами на эту роль могут быть аденинподобные цитокинины. Однако в последние несколько лет показано действие микромолярных концентраций на ряд физиологических процессов у растений. Например, на действие таких концентраций цАМФ наблюдается стимуляция открытия устьиц в *Vicia faba*, установлена активация поглощения Ca^{2+} культивируемыми клетками моркови, отмечено набухание этилированных протопластов пшеницы, стимуляция протеинкиназной активности в листьях риса. Имеется несколько сообщений об ответах на действие наномолярных концентраций экзогенного

цАМФ. Десять наномолей цАМФ существенно способствовали удлинению пыльцевых трубок у лилии. Обработка мембраны дибутирил-цАМФ в концентрации 100 нмоль/л и выше стимулировала придаточное почкование в сегментах стебля *Torenia*. Более того, на корнях люцерны на действие пикомолярных концентраций цАМФ наблюдалось утолщение образовавшихся клубеньков.

Ряд коллективов, проводивших анализы содержания цАМФ, получил более высокие концентрации цАМФ. Так, для сегментов стебля *Torenia* содержание цАМФ составляет 36 пмоль/г сырого веса, для суспендированных клеток *Phaseolus vulgaris* — 5 пмоль/г сырого веса. В стерильной культуре *Lemna* получены уровни нуклеотида от 70 до 80 пмоль/г сырого веса. Эти данные показывают, что содержание цАМФ может сильно варьировать и зависеть от вида растений и тканей. Это может оказаться полезным для пересмотра концепции о наличии систем в растениях, проявляющих биологический ответ на экзогенный цАМФ в соответствии с их концентрацией *in vivo*.

Концентрация цАМФ может также сильно варьировать в зависимости от условий окружающей среды, в которых выращиваются растения. Например, ряд независимых исследований показал, что освещение значительно увеличивает содержание цАМФ.

Высокая концентрация цАМФ может быть присуща определенным компартментам, т. е. эффективная концентрация цАМФ в местах действия эффектора может быть выше, чем общая.

В некоторых случаях при применении экзогенного цАМФ, его концентрация, которая в действительности достигает клеток-мишеней, может быть ниже, чем применяемая экзогенная концентрация. Например, экзогенной концентрации цАМФ от 50 до 5 нМ было достаточно, чтобы увеличить поток K^+ наружу в мезофильных протопластах *V. faba*, но только в присутствии изобутилметаксантина — ингибитора ФДЭ. Предположим, что экзогенный цАМФ может быстро метаболизироваться растительными тканями. Это дает объяснение тому, почему вызываемые в ответ экзогенные концентрации могут быть выше, чем эндогенные. Кроме того, цАМФ плохо проникает через мембраны, т. е. опыты с экзогенным цАМФ требуют более высоких доз.

Возможны временные и другие колебания уровня цАМФ. В культивируемых клетках *P. vulgaris*, например концентрация цАМФ увеличивалась от 5 до 18 пмоль/г сырого веса в процессе выделения, но это увеличение было временным и возвращалось к первоначальному уровню через 1 ч.

Содержание цАМФ колеблется и зависит от ряда факторов: вида растений, условий выращивания, возраста, обработки и т. д. В этой связи и концентрационные эффекты цАМФ сильно колеблются.

Одной из причин, ставящих под сомнение присутствие ферментов синтеза цАМФ, является то, что в растениях пока не найдены гены, кодирующие АЦ. С другой стороны, хотя имеются данные о фосфодиэстеразной активности, которая специфически гидролизует цАМФ и ингибируется метилксантинами, нет окончательного мнения о ее присутствии в растениях, поскольку также не установлены соответствующие гены.

Если бы клонирующие гены, кодирующие ферменты метаболизма цАМФ, были найдены, то был бы окончательно решен вопрос о содержании и роли цАМФ в растениях. Тем не менее на основании приведенных результатов можно предполагать регуляторную роль циклических нуклеотидов в растениях.

Регуляция метаболических реакций в растительной клетке, также как и в животной, осуществляется путем фосфорилирования белков с участием ПК.

Растительные цАМФ-зависимые ПК рассматриваются в качестве основной мишени действия цАМФ. В растениях показано наличие ПК, в ряде случаев подобных ПК животных (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Типы протеинкиназ
(B. W. Poovaiah, A. S. Reddy, 1987)

Тип	Эффектор	Животные	Растения
цАМФ-зависимая протеинкиназа	цАМФ	+	—
цГМФ-зависимая протеинкиназа	цГМФ	+	—
Ca ²⁺ -КМ-зависимая протеинкиназа	Ca ²⁺ и КМ	+	+
Светозависимая протеинкиназа	Свет	+	+
Фосфолипидзависимая протеинкиназа	Фосфолипид	+	+
Эпидермальноростзависимая протеинкиназа	ЭРФ	+	—

Примечание. Знак «+» указывает, что протеинкиназа присутствует, знак «—» — нет сообщений.

цАМФ-протенкиназная активность найдена во многих растительных структурах — плазмалемме, тонопласте, хлоропластах. В пластидах ПК проявляет активность в окружающих хлоропласт мембранах и тилакоидах, из которых она выделена и очищена. Установлено, что пептид с молекулярной массой 64 кДа. ПК участвует в управлении функционирования ионных каналов, в активации работы реакционных центров фотосистем и компонентов электрон-транспортной цепи, а также процессингом.

Вместе с тем представляет определенный интерес еще один экспериментальный факт. Обнаружено, что добавление животной цАМФ-зависимой протеинкиназы к растительным гомогенатам вызывает фосфорилирование белков, включая фосфорилирование красной и дальней красной форм фитохрома, фосфоенолпируваткарбоксилазы и сукцинил-фосфатсинтазы. Эти результаты говорят о том, что животная ПК имитирует эффект ПК растений, т. е. она фосфорилирует те же субстраты, что и растительный фермент. Данный факт является дополнительным указанием на существование в растительной ткани цАМФ-зависимой протеинкиназы.

О том, что цАМФ в растениях выполняет функцию вторичного посредника, свидетельствуют и следующие факты. Экзогенные АХ (10^{-11} моль/л) и цАМФ (10^{-9} – 10^4 моль/л) снижали содержание АТФ в бобах *Phaseolus aureus*, которое происходило, по-видимому, в результате изменения активности АЦ. Напротив, блокатор холинрецептора атропин (10^{-4} моль/л) резко повышал количество АТФ, так как, вероятно, не происходил синтез цАМФ. В этом случае атропин нарушал сопряжение холинрецептора с АЦ.

В тканях растений цАМФ приписывается и роль медиатора гормонального действия. Но в большей степени функциональную роль системы цАМФ в растениях связывают с действием фитогормонов. Установлено варьирование уровня цАМФ под действием ИУК, цитокининов, однако при действии гиббереллиновой кислоты подобных изменений не отмечено (табл. 5.4). Реакции, вызываемые фитогормонами в растениях, во многих случаях сходны при действии экзогенного цАМФ. Один из механизмов действия фитогормонов (цитокининов), как отмечается в ряде работ, заключается в ингибировании ФДЭ, при этом предполагается, что происходит повышение эндогенного цАМФ.

Таблица 5.4

Влияние фитогормонов на уровень цАМФ

Объект	Гормон	Эффект
Колеоптили овса	ИУК	+
Колеоптили кукурузы	ИУК	+
Алейроновый слой семян ячменя	ГК	—
Паренхима стебля табака	ИУК	+
Паренхима стебля табака	Кинетин	+
Гипокотили сои	ИУК	+
Листья бальзамина	ГК	—

Примечание. Знак «—» указывает, что фитогормон не влияет на уровень цАМФ.

Существуют и другие пути взаимосвязи цАМФ и фитогормонов. Например, нельзя исключить и возможности АЦ в определенных условиях находиться в клетках высших растений в латентной форме. В результате действия гормонов может происходить активация латентной АЦ.

Предполагают также, что в клетках высших растений при действии фитогормонов на геномном уровне система циклических нуклеотидов выполняет важную роль: согласование эффектов фитогормонов с общим функциональным состоянием клеток, как это имеет место при действии стероидных гормонов на клетки животных.

В роли вторичного медиатора в регуляции метаболических реакций животных выступает, как отмечалось, и цГМФ — активатор G-белка. Циклический гуаназин — 3'-5'-монофосфат обнаружен в корешках прорастающих бобов в количестве $(0,40-20) \cdot 10^{-12}$ моль/г сырого веса. Содержание его в меристематической ткани и в области образования вторичных корешков в 2–10 раз выше, чем в зоне растяжения. цГМФ обнаружен и в хлоропластах (табл. 5.5).

Таблица 5.5

Содержание цГМФ, ферментов синтеза и катаболизма в изолированных хлоропластах *Phaseolus aureus* (В. В. Рощина, 1991)

Условия	Содержание, 10^{-9} моль·г ⁻¹ сырой массы	Ферменты синтеза 10^{-9} моль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка ГЦ	Ферменты катаболизма 10^{-9} моль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка ФДЭ
Свет	20,0	294	4,9

Вопрос о физиологической роли цГМФ в высших растениях пока остается дискуссионным. Одним из спорных моментов является факт низкой концентрации цГМФ в тканях высших растений по сравнению с животными системами.

В этой связи рассмотрим данные, полученные на проростках овса *Avena sativa* L. Представление об эндогенном содержании цГМФ в тканях листьев зеленых и этиолированных проростков овса разного возраста дает рис. 5.2, который показывает, что содержание цГМФ в проростках овса находится в обратной зависимости от их возраста: в двухдневных растениях содержание цГМФ почти в 2 раза выше, чем в шестидневных.

Содержание цГМФ в проростках определяется световыми условиями выращивания растений. В ткани этиолированных проростков оно ниже, чем в ткани зеленых растений. Этиоляция зеленых растений (перенос в темноту на 24 ч) приводит к падению содержания цГМФ в ткани прак-

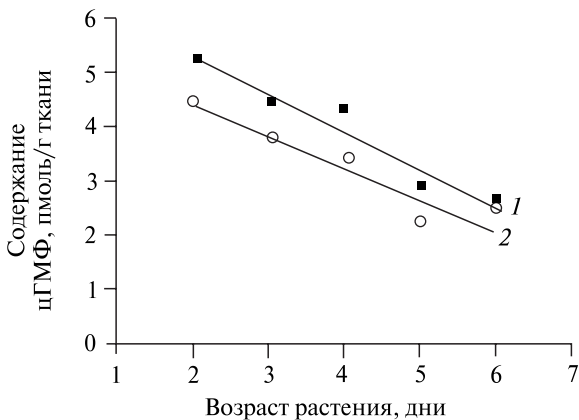


Рис. 5.2. Зависимость содержания цГМФ в экстрактах ткани зеленых (1) и этиолированных (2) проростков овса *Avena sativa* от возраста растения (Л. В. Дубовская, 2004)

тически до значений, свойственных этиолированным растениям. Таким образом, можно считать, что процессы синтеза и распада цГМФ в клетке находятся под контролем света. Эндогенная концентрация цГМФ в проростках овса составляет $(2,3-5,3) \cdot 10^{-12}$ моль/г ткани, а внутриклеточная концентрация цГМФ, измеренная в суспензии очищенных протопластов овса, — $0,269 \cdot 10^{-15}$ моль/л на одну клетку.

Для поддержания эндогенного уровня цГМФ необходимы ферменты синтеза (ГЦ) и катаболизма (ФДЭ). В табл. 5.6 представлены данные измерений активности ГЦ в различных субклеточных фракциях в пятидневных проростках овса. Наибольшая гуанилатциклазная активность регистрировалась во фракции ПМ. Следовательно, можно предположить, что в клетках проростков овса ГЦ содержится преимущественно в мембрансвязанной форме.

Таблица 5.6

Активность гуанилатциклазы в различных субклеточных фракциях пятидневных проростков овса *Avena sativa* L. (Л. В. Дубовская, 2004)

Фракция	Активность гуанилатциклазы, 10^{-12} моль/ мг белка · мин	
	Зеленые проростки	Этиолированные проростки
Грубый гомогенат	$1,85 \pm 0,10$	$0,84 \pm 0,03$
Осадок 1500g	$1,42 \pm 0,05$	$1,05 \pm 0,10$

Фракция	Активность гуанилатциклазы, 10^{-12} моль/ мг белка · мин	
	Зеленые проростки	Этиолированные проростки
Грубая митохондриальная фракция	$1,29 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,12$
Грубая микросомальная фракция	$1,73 \pm 0,06$	$1,28 \pm 0,08$
Плазматические мембраны	$3,34 \pm 0,02$	$1,78 \pm 0,03$
Цитозоль	$0,75 \pm 0,08$	$0,56 \pm 0,05$

Начальная скорость реакции, фактически отражающая активность ГЦ во фракции ПМ при оптимальных условиях инкубации, равна $3,3 \cdot 10^{-12}$ моль/мг белка·мин. Активность ГЦ практически полностью подавлялась гуанилатциклазным ингибитором в микросомальной и цитозольной фракциях на 97 и 84 % соответственно. Активность ГЦ снижалась под действием ингибитора G-белков в животных тканях и увеличивалась под действием активаторов G-белков. Следовательно, активность мембрансвязанной ГЦ контролируется G-белками.

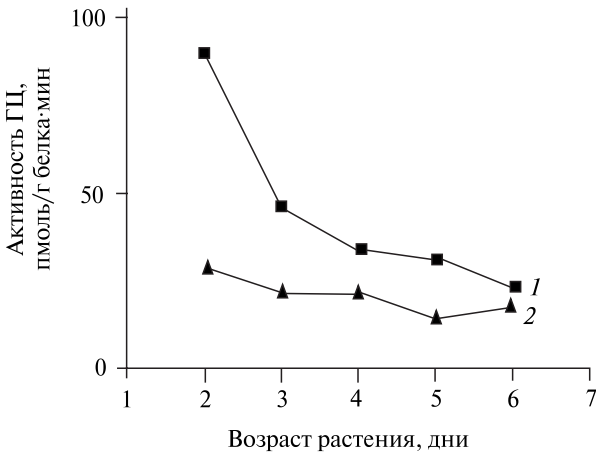


Рис. 5.3. Зависимость активности ГЦ в гомогенате ткани зеленых (1) и этиолированных (2) проростков *Avena sativa* от возраста проростка (Л. В. Дубовская, 2004)

Активность ГЦ определяется световыми условиями выращивания растений (рис. 5.3). В ткани зеленых проростков активность выше, чем в ткани этиолированных. К тому же во всех субклеточных фракциях, выделенных из этиолированных проростков, активность ГЦ была ниже, чем во фракциях, выделенных из зеленых растений. Таким образом, можно считать, что анаболизм цГМФ в клетках листьев овса контролируется светом.

Активность цГМФ-гидролизующей ФДЭ обнаружена во всех субклеточных фракциях (табл. 5.7).

Таблица 5.7

Активность цГМФ-гидролизующей фосфодиэстеразы в различных субклеточных фракциях пятидневных проростков *Avena sativa* L.

(Л. В. Дубовская, 2004)

Фракция	Активность фосфодиэстеразы, 10^{-12} моль/мг белка·мин	
	Зеленые проростки	Этиолированные проростки
Грубый гомогенат	$1,06 \pm 0,03$	$1,24 \pm 0,02$
Осадок 1500g	$0,47 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,10$
Грубая митохондриальная фракция	$0,25 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,01$
Грубая микросомальная фракция	$0,52 \pm 0,06$	$0,53 \pm 0,08$
Плазматические мембраны	$0,96 \pm 0,09$	$0,99 \pm 0,06$
Цитозоль	$1,57 \pm 0,18$	$2,22 \pm 0,15$

Оказалось, что начальная скорость реакции, характеризующая активность ФДЭ в цитозоле, при оптимальных условиях инкубации равна $1,57 \cdot 10^{-9}$ моль/мг белка·мин.

Так же, как и для цАМФ, выявлено значительное увеличение содержания цГМФ под действием фитогормонов в концентрации 10^{-8} моль/л (табл. 5.8).

Таблица 5.8

Влияние фитогормонов на содержание цГМФ в гомогенате ткани пятидневных зеленых проростков *Avena sativa* L.

(Л. В. Дубовская, 2004)

Фитогормон	Содержание цГМФ, 10^{-12} моль/мг белка		
	Контроль	Обработанные гормоном	В присутствии ингибитора
ИУК	$0,52 \pm 0,01$	$1,66 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,02$
НУК	$0,52 \pm 0,01$	$1,51 \pm 0,05$	$1,27 \pm 0,05$

Фитогормон	Содержание цГМФ, 10^{-12} моль/мг белка		
	Контроль	Обработанные гормоном	В присутствии ингибитора
ГК	$0,47 \pm 0,02$	$1,46 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,04$
АБК	$0,47 \pm 0,02$	$2,05 \pm 0,06$	$1,20 \pm 0,03$
ЭБР	$0,47 \pm 0,02$	$1,19 \pm 0,05$	$0,73 \pm 0,01$

В присутствии ингибитора ГЦ в среде инкубации наблюдалось подавление гормониндуцируемого роста уровня цГМФ.

Исследование влияния фитогормонов ИУК, НУК, ГК, АБК и ЭБР на активность цГМФ-гидролизующей ФДЭ в гомогенате ткани зеленых проростков *Avena sativa* показало, что активность фермента снижается под действием ИУК, НУК и АБК, в то время как ГК и ЭБР не оказывали влияния на фосфодиэстеразную активность. Скорее всего, благодаря тому, что ИУК, НУК и АБК увеличивают активность ГЦ и снижают активность ФДЭ, под их влиянием концентрация цГМФ в клетках растет более эффективно. Действие же таких фитогормонов, как ГК и ЭБР, на содержание цГМФ реализуется только через стимуляцию активности ГЦ, а не ингибирование ФДЭ.

Полученные результаты являются доказательством того, что в тканях проростков овса мишенью фитогормонов является фермент синтеза цГМФ – ГЦ.

Уровень циклических нуклеотидов в клетках регулируется активностью аденилатциклазы, гуанилатциклазы и соответствующих фосфодиэстераз.

На активность этих процессов большое влияние оказывают ионы Ca^{2+} . В большинстве случаев цАМФ и Ca^{2+} выступают как внутриклеточные посредники в реализации различных функций клеток, действуют как синергисты и, скорее всего, ионы Ca^{2+} являются основным посредником, так как цАМФ стимулирует приток Ca^{2+} извне и из внутриклеточных депо. Накоплено много фактов, позволяющих считать кальций также основным внутриклеточным посредником действия различных специфических и неспецифических сигналов, о чем пойдет речь в следующей главе.

Глава 6

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ Ca^{2+}

Давно установлена важная роль кальция в обмене веществ и его необходимость для роста растений.

Ионы кальция имеют большое влияние на мембранные структуры. Достаточно давно указывалось на необходимость ионов Ca^{2+} для стабилизации мембран. Было показано, что для образования поверхностной мембраны на эндоплазматической капле, изолированной из интернодальных клеток харовых водорослей, необходимо присутствие в окружающем растворе ионов Ca^{2+} . Присутствие Ca^{2+} в концентрации 10^{-4} М способствовало образованию поверхностной мембраны на капле, хотя и недостаточно прочной; более прочная мембрана образовывалась при концентрации 10^{-3} моль и особенно 10^{-2} моль/л. При удалении ионов кальция (например, при обработке хелатами или при отсутствии Ca^{2+} в среде) отмечается ослизнение корневых волосков, а также повышается проницаемость мембран к другим веществам. Ионы Ca^{2+} изменяют и электрические свойства как искусственных, так и естественных мембран, уменьшая плотность заряда на мембранной поверхности. Недостаток Ca^{2+} приводит к возрастанию вакуолизации, изменению хромосом, разрыву мембран ЭПР и других внутриклеточных компартментов.

Уже двухдневный дефицит Ca^{2+} сопровождается изменениями в ядерных и цитоплазматических мембранах, которые при последующем добавлении Ca^{2+} могут исчезать. С другой стороны, при избытке ионов кальция наблюдаются набухание и деструкция митохондрий, сопровождающиеся угнетением окислительного фосфорилирования, а в хлоропластах отмечено ослабление фотосинтетического фосфорилирования.

Значительная часть кальция в растениях содержится в клеточных стенках в форме пектатов, карбонатов, оксалатов, сульфатов или цитратов. Кристаллические соли кальция чаще встречаются в вакуоли, чем в клеточной стенке.

Известно, что кальций необходим для повышения устойчивости растений к различным стрессам (высоким и низким температурам, ан-аэриобиозу, токсическому уровню ионов, низкому рН и др.), для повышения созревания плодов и т. д.; установлена также зависимость активности некоторых ферментов растительных клеток от кальция (например, α -амилазы, дегидрогеназы, пектиностеразы и др.).

Ca^{2+} необходим также для поддержания нормального цикла в растительных клетках. Под его контролем находятся и движения хлоропластов, устьиц, листьев мимозы, гравитропизм, циркадные ритмы.

По отношению к кальцию растения подразделяются на кальциефилы (бобы, нут), кальциефобы (люпин желтый, кукуруза) и нейтральные (тыква).

Концентрация свободного кальция в цитозоле растительных и животных клеток низкая – 10^{-8} – 10^{-7} М, тогда как общее его содержание в растительной клетке составляет $2 \cdot 10^{-2}$ М.

Содержание кальция в отдельных компартаментах растительной клетки приведено в табл. 6.1.

Таблица 6.1

Распределение Ca^{2+} в растительной клетке
(Н. Д. Алехина [и др.], 2005)

Компартмент клетки	Концентрация, моль/л
Цитоплазма	10^{-7} – $2 \cdot 10^{-7}$
Ядро	10^{-8} – $2 \cdot 10^{-8}$
Вакуоль	10^{-3} – 10^{-2}
Клеточная стенка	10^{-3} – 10^{-2}
Эндоплазматический ретикулум	$\sim 10^{-3}$
Хлоропласт	$\sim 1,5 \cdot 10^{-3}$
Митохондрия	$\sim 10^{-3}$

В свою очередь, измеренный низкий уровень свободного кальция в цитоплазме варьирует у клеток разных видов растений (табл. 6.2).

Таблица 6.2

Содержание свободного кальция в цитоплазме
клеток некоторых видов растений
(B. W. Poovaiah, A. S. Reddy, 1987)

Клетка	Концентрация, моль/л
<i>Chara</i>	$2,2 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-7}
<i>Nitella</i>	$4 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-6}

Клетка	Концентрация, моль/л
Эндосперма <i>Haemanthus</i> sp.	$5 \cdot 10^{-8}$
Ризоид <i>Fucus serratus</i>	$2,8 \cdot 10^{-7} - 2,47 \cdot 10^{-6}$
Протопласт кончика корня проростка фасоли	$1,71 \cdot 10^{-7}$
Протопласт алейронового слоя ячменя	$< 10^{-6}$

С появлением концепции о роли вторичных посредников в регуляции метаболизма клетки стала проясняться универсальная роль кальция в физиологических и биохимических процессах. Кальций участвует в регуляции клеточного метаболизма посредством локального изменения концентрации его свободных ионов в цитоплазме. К характерным свойствам кальция как вторичного посредника относится его небольшая по сравнению с биополимерами молекулярная масса, что определяет его высокую скорость диффузии в цитоплазме.

Поступление кальция в клетки животных обеспечивается работой нескольких механизмов. Показано, что кальций поступает в цитоплазму извне через специальные каналы в плазматической мембране по градиенту электрохимического потенциала. В возбудимых клетках имеются потенциалзависимые каналы, которые открываются при деполяризации мембраны. Каналы другого типа – рецепторзависимые – активируются при связывании гормонов с рецепторами. Оба типа каналов сходны по ряду свойств: блокируются ионами Ni^{2+} , Cd^{2+} , а в отсутствие Ca^{2+} во внешней среде проницаемы для Na^{+} . В ЭПР также имеются кальциевые каналы, сходные с каналами плазматических мембран, причем электрохимический градиент движет их в цитозоль.

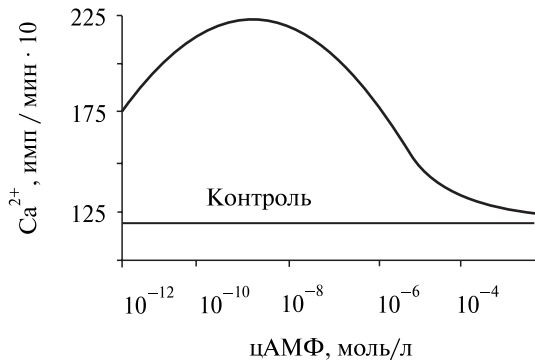


Рис. 6.1. Влияние экзогенного цАМФ на поглощение Ca^{2+} клетками *Chlamidomonas reinchardi* (мутант без клеточной стенки) (Ф. Г. Каримова, О. И. Тарчевская, 1990)

Кальциевые каналы обнаружены и в мембранах растительных клеток. Показана регуляция входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в микросомы, выделенные из колеоптилей кукурузы и гипокотилей тыквы, светом, ИУК, и зависимость этой реакции от кальмодулина. Для функционирования потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов (харовая водоросль *Nitellopsis*) необходимо наличие Mg^{2+} . Состояние этих потенциалзависимых каналов контролируется системой ферментов, регулирующих уровень цАМФ в клетке. Были также получены данные, свидетельствующие о прямом действии экзогенного цАМФ на поглощение $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* (мутант без клеточной стенки).

Данные, приведенные на рис. 6.1, свидетельствуют о регуляторном действии цАМФ на поглощение Ca^{2+} клетками. Это указывает на возможность взаиморегуляции двух систем вторичных посредников – цАМФ и Ca^{2+} . В опытах с животными клетками усиление поглощения Ca^{2+} под действием цАМФ объясняется фосфорилированием белков потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов и вследствие этого увеличением пребывания их в открытом состоянии.

Работа кальциевых каналов контролируется фосфоинозитольным каскадом, в котором участвуют такие промежуточные соединения, как диацилглицерол и инозитолфосфат (рис. 6.2).

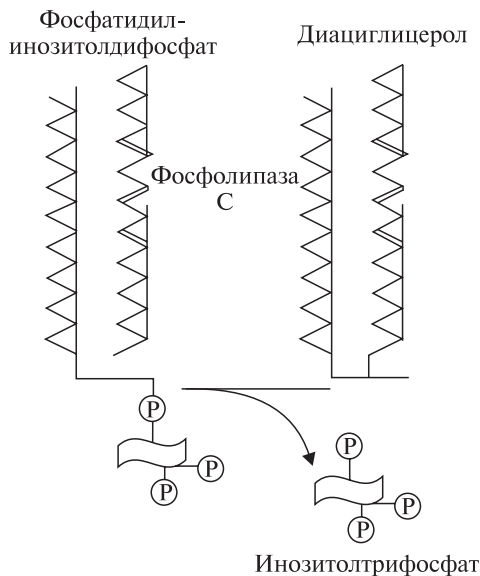


Рис. 6.2. Образование инозитол-1, 4, 5'-трифосфата (В. В. Рощина, 1991)

В растениях *Apium graveolens*, *Brassica oleracea*, *Allium cepa*, *Narcissus* и др. были обнаружены вторичные посредники инозитолфосфатной системы – фосфотидилинозитол фосфодиэстераза (фосфолипаза), которая гидролизует фосфотидилинозитол-4,5-дифосфат с образованием диацилглицерола и инозитолфосфата.

Диацилглицерол активирует протеинкиназу С, которая фосфорилирует белки, тогда как инозитолфосфаты стимулируют выход ионов Ca^{2+} из компартмента клетки в цитоплазму. Изменение концентрации кальция регулирует активность многих ферментов, в том числе и киназ.

Большое значение имеют системы удаления Ca^{2+} из цитозоля, так как ионы кальция в больших концентрациях вредны клетке. Кальций называют подвижным, но опасным посредником. Поэтому клетка должна поддерживать кальциевый гомеостаз. Существуют три основных механизма его поддержания.

1. **Ca^{2+} -АТФаза** плазматических мембран и мембран ЭПР удаляет излишек Ca^{2+} . Ca^{2+} -АТФазы для работы требуют затраты энергии АТФ при переносе Ca^{2+} из цитозоля во внешнюю среду и цистерны ЭПР против электрохимического градиента. Ca^{2+} -АТФазы – белки с высоким сродством к кальцию, осуществляющие его перенос. Одна молекула белка может повторять этот процесс многократно, благодаря чему мембранные белки эффективно регулируют концентрацию Ca^{2+} . Ca^{2+} -АТФаза связывает кальций, когда его концентрация в клетке ниже 10^{-6} моль/л, и обеспечивает его низкий уровень в состоянии покоя. В растительных клетках идентифицированы два типа транспортных Ca^{2+} -АТФаз: стимулируемая кальмодулином Ca^{2+} -транспортирующая АТФаза, подобная по свойствам АТФазе животных клеток и доминирующая в плазматических мембранах; второй тип Ca^{2+} -АТФазы не активируется КМ и присутствует на мембране ЭПР и тонопласте.

Ca^{2+} -активируемая АТФаза идентифицирована также в мембранах хлоропластов и митохондрий. Установлена зависимость активности Ca^{2+} -АТФазы корней от наружной концентрации ионов натрия.

Фитогормоны и свет регулируют активности систем транспорта в плазмалемме. Полагают, что эти системы поддерживают концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме при изменении внутренних и внешних условий произрастания растений.

Как на животных, так и на растительных клетках показано, что изменения рН могут быть триггером изменений концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Высказывается предположение, что изменения рН могут влиять на комплекс Ca^{2+} -кальмодулин и уровень внутриклеточного цАМФ. С другой стороны, изменения рН цитоплазмы могли быть следствием изменения внутриклеточной концентрации аденилатов.

Благодаря имеющимся данным можно считать, что активное удаление избытка свободного Ca^{2+} из цитозоля растительных клеток происходит при участии мембранных Ca^{2+} -АТФаз.

2. При резком увеличении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме животных клеток для его удаления помимо Ca^{2+} -АТФаз включается еще один механизм — **$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник**. Транспорт Ca^{2+} осуществляется с помощью локализованного в плазматических мембранах белка — в обмен на Na^+ . Мощностью этого переносчика довольно высока, однако он работает эффективно только при достаточно высокой внутриклеточной концентрации кальция — выше 10^{-6} М, так как он имеет невысокое сродство к Ca^{2+} . Полагают, что именно он удаляет основную массу кальция из поврежденных или возбужденных клеток. Этот переносчик функционирует за счет электрохимического градиента, т. е. для его работы не требуется энергия (АТФ). В этом случае один ион Ca^{2+} обменивается на три Na^+ .

Физиологическая необходимость существования такого обменника в растительных клетках на первый взгляд проблематична, поскольку в них функционирует «протонная» энергетика, в отличие от «натриевой» в животной. Поэтому в литературе по физиологии растений как альтернативу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменнику выдвигают наличие $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -антипорта на плазмалемме с использованием энергии H^+ -АТФазы или пиридинового нуклеотидов, расположенных на плазмалемме.

Тем не менее появляются данные о зависимости транспорта и содержания кальция в клетках растений от Na^+ . Зарегистрирован прямой обмен Ca^{2+} на Na^+ в клетках корней бобов. Соотношение обмена Ca^{2+} на Na^+ зависело от содержания Na^+ во внешней среде. Отмечено влияние экзогенного АТФ на этот обмен. Направление переноса Ca^{2+} и Na^+ зависело от градиента Na^+ . Эти данные укладываются в рамки представлений работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. Подтверждением этому служат данные о зависимости выхода Ca^{2+} из отрезков корней хлопчатника при увеличении наружной концентрации Na^+ .

Отметим, что градиент концентрации Na^+ на плазмалемме растительных клеток может быть весьма высоким. Более того, у растений галафитов для защиты цитоплазмы от избыточного содержания солей (Na^+) в плазмалемме функционирует Na^+/K^+ -АТФазный насос, т. е. в какой-то мере в поддержании ионного гомеостаза этих растений принимает участие «натриевая» энергетика.

3. **Буферная система цитозоля** оказывает существенное влияние на изменение концентрации Ca^{2+} в клетке и представляет третий механизм поддержания низкого уровня свободных ионов Ca^{2+} в цитоплазме. Система включает растворимые белки, связывающие Ca^{2+} , что приводит к снижению его концентрации почти на два порядка при непрерывном поступлении Ca^{2+} в клетку.

СаСБ имеют высокое сродство к Са ($K \sim 10^{-8} - 10^{-6}$) и высокую степень гомологии. Химические свойства Са²⁺-связывающих сайтов таковы, что, например, селективность их в 1000 раз выше к ионам Са²⁺ по сравнению с Mg²⁺. СаСБ – функционально инертны в отсутствие связанного Са²⁺.

Наиболее известный и распространенный СаСБ во многих эукариотических клетках – КМ. КМ в животных и растительных тканях был открыт в 1970 г. двумя независимыми группами исследователей как белок, активирующий ФДЭ циклических 3', 5'-нуклеотидов. Впоследствии была показана роль этого белка во многих других ферментативных процессах. Действуя на ряд ферментов (ПК, АТФазы, ФДЭ и т. д.), он регулирует такие важнейшие клеточные процессы, как деление, рост, секрецию гормонов, а также обуславливает форму клеток. Изучено распределение КМ в субклеточных структурах, при этом он обнаружен в митохондриях (5–9 %), хлоропластах (1–2 %), микросомах (<1 %) и даже клеточных стенках, 90 % его от общего содержания находится в цитозоле. КМ – полифункциональный белок.

Концентрация КМ варьирует в зависимости от вида тканей и других факторов. Например, в этиолированных тканях гороха его содержание выше в растущих клетках кончика корня, которые имеют молодые метаболически активные ткани. В зеленых растениях содержание КМ выше в листьях. В корне кукурузы более высокое содержание КМ отмечено в кончике корня. Концентрация КМ в клетках растений составляет $10^{-6} - 10^{-5}$ моль/л.

Очищенный из растений КМ в присутствии и отсутствие Са²⁺ имеет разную ММ: 17–19 и 14,5 кДа соответственно. Активируется он так же, как и в животных тканях, при уровне Са²⁺ в клетке 10^{-6} моль/л. В растениях он активирует Са²⁺-АТФазу, НАД-киназу, ПК. КМ – кислый низкомолекулярный термостабильный белок. При нагревании до 95–100 °С устойчив в течение 5–10 мин. Физико-химические свойства КМ зависят от различных факторов, в частности от связывания его с кальцием и т. д. КМ способен связывать до четырех атомов Са²⁺ на одну молекулу белка. Переход от биологически неактивного комплекса к активному происходит после связывания третьего иона Са²⁺. Только после связывания с кальцием КМ приобретает способность взаимодействовать с многочисленными природными и синтетическими соединениями.

КМ не обладает ни видовой, ни тканевой специфичностью (его определяют по способности активировать ФДЭ мозга). Химические и физические свойства КМ растений идентичны во многих чертах с КМ животных. Он имеет высокую степень эволюционной стабильности. КМ, кроме высокой активности к температуре, также устойчив к кислотам и другим

воздействиям, которые вызывают денатурацию. КМ, выделенный и очищенный из растений, был подобен КМ бычьего мозга. Аффинность КМ к Ca^{2+} для растений и позвоночных характеризуется одинаковым порядком величин. Кроме того, КМ различных растений стимулируется КМ-зависимой ФДЭ из млекопитающих.

Аминокислотный состав КМ растений и животных подобен. Сходство КМ растений и бычьего мозга подтверждается наличием аминокислоты, триметиллизина, двух остатков пролина, высоким содержанием отрицательно заряженных аминокислот, отсутствием триптофана, однако есть и отличия. Так, остаток цистеина, который отсутствует в бычьем КМ, присутствует в КМ растений. Бычьи КМ содержат два остатка тирозина, тогда как КМ растений – только один. Значимость присутствия цистеина в КМ растений пока неизвестна. Аминокислотная последовательность КМ шпината, зародыша пшеницы, *Dictyoselium* и *Chlamydomonas* имеет малое различие с КМ позвоночных. При сравнении аминокислотного состава КМ шпината с КМ крысы были обнаружены различия в ряде аминокислотных последовательностей.

Аминокислотный состав и их последовательность в КМ *Chlamydomonas* показали четыре отличительные черты в структуре, которые отсутствуют в КМ других растений и животных. Поскольку КМ из этого вида может активировать НАД-киназу растений в большей степени, чем позвоночных или высших растений, то возможно, что уникальные структурные особенности могут оказаться важными для определения максимальной массы НАД-киназы.

КМ входит в качестве субъединиц в состав НАД-киназы и киназы фосфорилазы высших растений. Комплекс КМ с соответствующим ферментом образуется только при оптимальных концентрациях кальция. Изменение концентрации Ca^{2+} в любую сторону приводит к распаду комплекса и возвращению активности фермента к исходному уровню.

Концентрация КМ не является лимитирующим фактором для реакции, в которой он участвует.

При изучении третичной структуры КМ установлено наличие, как уже отмечалось, четырех подобных доменов, каждый из которых содержит Ca^{2+} -связывающий сайт. Последние исследования трехмерной структуры КМ крыс показали, что КМ состоит из двух глобулярных частей, связанных длинной α -спиралью. Каждая часть связывает два иона Ca^{2+} через домен *спираль – петля – спираль*. При связывании Ca^{2+} КМ претерпевает большие конформационные изменения, сопровождающиеся увеличением содержания α -цепи на 5–10 %. Отмеченные Ca^{2+} -зависимые конформационные изменения объясняют роль Ca^{2+} в превращении неактивной формы КМ в активную, способную взаимодействовать с белками или ферментами, вызывающими в конечном счете биологический ответ.

Механизм активации ряда ферментов КМ происходит в две стадии:

1) Ca^{2+} связывается с КМ, вызывая изменение конформации его молекулы;

2) активная конформация КМ взаимодействует с неактивным или частично активным ферментом, вызывая его активацию.

Существуют четыре конформационных состояния комплекса Ca^{2+} /КМ, которые могут «узнаваться» различными белками. КМ может таким же образом переводить количественные Ca^{2+} сигналы различной амплитуды в различные качественные клеточные ответы.

Кроме КМ в растениях имеются и другие Ca^{2+} -связывающие белки. Одна из групп исследователей идентифицировала Ca^{2+} -связывающий белок массой 63 кДа, который действует как обратимая субъединица НАД⁺-оксидоредуктазы. При выращивании в темноте эти ферменты в клетках становятся Ca^{2+} -зависимыми олигомерами, содержащими специфическую Ca^{2+} -связывающую половину (63 кДа), тогда как в выращенных на свету клетках эти соединения – мономеры, нечувствительные к Ca^{2+} .

В *Ficus* обнаружены изменения в свойствах СаСБ во время развития. Ряд авторов выделил несколько СаСБ из экстракта эмбриональных тканей моркови. Некоторые из них были найдены во время эмбриогенеза и начального развития. СаСБ 54 кДа значительно увеличивался по массе во время эмбрионального развития. В различных тканях *Vicia faba* и протопластах замыкающих клеток устьиц также был проведен анализ СаСБ. Было выявлено несколько СаСБ, которые проявляли общую метаболическую активность в отдельных частях растений и которые были специфичными для замыкающих клеток устьиц, стебля и корня. Эти результаты указывают на то, что имеется несколько типов СаСБ в растениях и некоторые из них специфичны для отдельных тканей или клеток.

Для лучшего понимания Ca^{2+} /КМ-взаимодействия необходимо идентифицировать и охарактеризовать все СаСБ в растениях.

Роль СаСБ, как считает ряд исследователей, может выполнять и ферредоксин.

После реализации клеточного ответа на внешний сигнал Ca^{2+} удаляется из цитозоля у одних клеток через плазматическую мембрану во внешнюю среду, у других – транспортируется преимущественно во внутриклеточное депо. Так, в мышечных клетках большую роль играет СР, являющийся аналогом ЭПР. Ca^{2+} -АТФаза СР перекачивает Ca^{2+} из цитозоля в СР, реагируя на небольшие увеличения Ca^{2+} в цитозоле.

В опытах с растительными клетками (кресс-салат) отмечено оксалат-стимулируемое АТФ-зависимое накопление Ca^{2+} во фракции ЭПР, что, вероятно, связано с механизмом поддержания низких концентраций Ca^{2+} в цитозоле. В какой-то мере это подтверждается установленным стимулирующим действием КМ на поступление Ca^{2+} в ЭПР гипокотилей кабачков.

В клетках животных организмов большую роль в поддержании уровня свободного Ca^{2+} в цитозоле, кроме СР, ЭПР, играют митохондрии, которые осуществляют регуляцию в более широком диапазоне. Аналогичное явление характерно и для растительных клеток. Однако накопление Ca^{2+} в митохондриях растений отличается от такового в животных клетках по ряду свойств. Так, например, поступление Ca^{2+} в митохондрии растений стимулируется адениновыми нуклеотидами и Mg^{2+} , необходим неорганический фосфат и т. д.

Но в растениях, кроме митохондрий, имеются дополнительные системы регуляции содержания Ca^{2+} в цитозоле, которые локализованы в вакуолях и хлоропластах. Установлено, что Ca^{2+} выходит из протоплазмы в вакуоль под влиянием различных воздействий, нарушающих структуру протоплазмы. Транспорт Ca^{2+} в вакуоль через тонопласт, вероятно, осуществляется с помощью Ca^{2+} -АТФазы и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -антипорта.

Концентрация свободного Ca^{2+} в строме хлоропластов низкая, но увеличивается при освещении. Система регуляции концентрации Ca^{2+} в хлоропластах, возможно, включает АТФазу мембран хлоропластов, стимулируемую Ca^{2+} , Mg^{2+} и КМ. Функционирование $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ -зависимой АТФазы предполагается также в ядрах растительных клеток.

Очевидно, что растения имеют механизмы, необходимые для поддержания низкой концентрации свободного кальция в цитозоле клетки.

В свою очередь Ca^{2+} может участвовать в регуляции уровня цАМФ, влияя на активность ферментов его обмена. С другой стороны, цАМФ также участвует в регуляции уровня Ca^{2+} . Как мы уже указывали, Ca^{2+} стимулирует активность протеинкиназ, относящихся к группе связывающих кальцийрегуляторных белков: $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ -зависимые и Ca^{2+} -зависимые. Эти протеинкиназы состоят из четырех субъединиц: двух регуляторных и двух каталитических. Они локализованы главным образом в цитозоле, однако есть данные, что имеются мембраносвязанные ПК.

Протеинкиназная активность в растениях найдена в плазмалемме, тонопласте, хлоропластах, цитозоле. В пластидах ПК обнаружили в оболочке мембран и тилакоидах, из которых она выделена и очищена. Это пептид с ММ 64 кДа.

Экзогенные сигналы либо непосредственно, либо через вторичных посредников регулируют активность протеинкиназ. Классификацию протеинкиназ проводят на основе характеристики действующего эффектора. В клетках растений, как и животных, выявлена $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ -зависимая протеинкиназа (см. табл. 5.3).

$\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ -комплекс действует двумя путями: непосредственно на эффекторную систему и опосредованно на регуляторную систему. Протеинкиназы через фосфорилирование могут повышать или ингибировать активность других ферментов. Эти механизмы определяют быстрый и

медленные ответы на действие Ca^{2+} и КМ. В растениях такие энзимы, как НАД-киназа, Ca^{2+} -АТФаза, H^+ -АТФаза, НАД⁺-оксидоредуктаза, протеинкиназа, находятся под контролем Ca^{2+} и КМ.

Протеинкиназы подвергаются многим постсигнальным обратимым модификациям. Фосфорилирование является одним из таких процессов, и этим регулируются различные метаболические реакции в клетке. Реакции фосфорилирования протеинов изменяют их активность и свойства. При фосфорилировании эти энзимы переносят фосфат АТФ к аминокислотным остаткам (обычно к серину и тионину, иногда к тирозину) белков.

Дефосфорилирование энзимов катализируется другой группой белков, известных как протеинфосфатазы или ФПФ. Реакции, катализируемые протеинкиназами и протеинфосфатазами, можно представить следующим образом:



В растительных клетках протеинкиназы осуществляют фосфорилирование различных белков, в основном ферментов, которые управляют мембранными процессами, такими как открывание ионных каналов в плазмалемме, активация реакционных центров фотосистем и компонентов электрон-транспортной цепи (цитохром b_6 и f). Во многих случаях это фосфорилирование находится под контролем Ca^{2+} .

До недавнего времени основное внимание уделялось изучению каталитических субъединиц ПК и их фосфорилирующих свойств. Однако, как оказалось, регуляторные субъединицы ПК обладают самостоятельными функциями и несут большую физиологическую нагрузку. Так, в 1975 г. было установлено, что регуляторные субъединицы могут связываться с ДНК. Одновременно было отмечено, что ПК переносятся в ядро.

НАД-киназы во всех случаях способны чувствовать изменения в концентрации кальция в цитоплазме, что подтверждает роль Ca^{2+} как вторичного посредника. Более того, НАД-киназы весьма интересны, поскольку их активность зависит от света. Исследования показали, что в колеоптилях кукурузы, на которые действовали ДКС, увеличивалось соотношение НАДФ(Н)/НАД(Н), происходила активация НАД-киназы, которая локализована на наружной митохондриальной мембране при увеличении свободного Ca^{2+} в цитоплазме; увеличение последнего связано с ингибированием процесса удаления Ca^{2+} из клетки. Эффект дальнего света можно имитировать инкубированием сегментов колеоптилей кукурузы в условиях варьирования концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Подобные эффекты наблюдаются в опытах с гипокотильями тыквы. Эти данные под-

тверждают, что Ca^{2+} -зависимый регуляторный механизм является одинаковым для растворимой НАД-киназы и наружной митохондриальной НАД-связанной киназы. Следовательно, в растениях присутствуют ферменты, активность которых находится под контролем Ca^{2+} и КМ. Эти ферменты перечислены в табл. 6.3.

Таблица 6.3

Ca^{2+} /КМ-зависимые энзимы
(B. W. Poovaiah, A. S. Reddy, 1987)

Энзим	Локализация
НАД-киназа	Цитоплазма
НАД-киназа	Наружная митохондриальная мембрана
НАД-киназа	Оболочка хлоропласта
Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФаза	Плазматическая мембрана
Протеинкиназа(ы)	Растворимая и мембрансвязанная

Имеющаяся информация позволяет считать, что фосфорилирование белков в растениях может регулироваться физиологическими концентрациями Ca^{2+} и, по крайней мере, часть регуляции связана с КМ.



Рис. 6.3. Общая схема физиологического ответа клетки на действие эффектора при фосфорилировании и дефосфорилировании белков с участием кальция (B. W. Poovaiah, A. S. Reddy, 1987)

Открытие КМ в растениях и Ca^{2+} /КМ-зависимых энзимов внесло большой вклад в понимание существующих молекулярных механизмов. Биохимические свойства механизмов внутриклеточного транспорта Ca^{2+} и их регуляции позволяют раскрыть роль Ca^{2+} как вторичного посредника.

Последовательность стадий физиологического процесса через Ca^{2+} -регулируемое фосфорилирование белков представлена в табл. 6.4.

Изменение программы роста и развития, контроль метаболизма и формирование ответных реакций на действие экзогенных факторов происходит вследствие передачи сигналов на белки мишени или на геном по сложным информационным путям.

В клетке информация передается цитозольным структурам и компартаментам через изменения концентрации множества вторичных посредников. Кальций в сети передачи сигналов является универсальным посредником, поскольку реагирует на большое число стимулов характером изменения своего цитозольного содержания. Именно разнообразие закономерностей сдвигов концентрации кальция в цитозоле позволяет ответить на вопрос о том, каким путем в растительной клетке с участием одного посредника достигается специфичность ответной реакции. Изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме на действие различных стимулов может иметь вид всплесков, волн, пульсаций и т. д. (см. табл. 6.4).

Характер изменения Ca^{2+} может оцениваться по уровню его увеличения, продолжительности лаг-периода от момента воздействия до увеличения концентрации, времени выхода на максимальный уровень и возвращения к первоначальному уровню. Сигнальная информация кодируется амплитудой и частотой осцилляций, а также их регулярности. Специфичность Ca^{2+} -сигнала обусловлена также его локализацией в клетке.




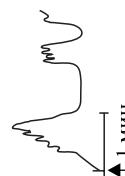
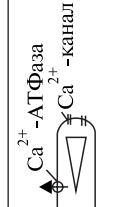
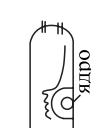
В растущих клетках трихобластов, пыльцевых трубок и других сигналом ориентированного роста служит градиент концентрации Ca^{2+} . Высокая концентрация в растущей части является результатом пространственного разделения входа Ca^{2+} извне по Ca^{2+} -каналам плазмалеммы в зоне активного роста и выкачивания Ca^{2+} -АТФазами плазмалеммы и эндо-мембран в базальном конце клетки.

При воздействии Nod-фактора, вызывающего образование азотфиксирующих клубеньков у бобовых, кальций также поступает извне через кальциевые каналы кончика корневого волоска, и сигнал передается в виде быстро нарастающего увеличения цитоплазматического Ca^{2+} и пульсации в области ядра, что приводит к скручиванию корневого волоска и смене программ дифференциации и функционирования.

Возникающий в ответ на определенные стимулы Ca^{2+} -сигнал является первым этапом возникновения специфической ответной реакции.

Функции кальция в растениях, как и у животных, разнообразны и сложны. Кальций регулирует внутриклеточные процессы многими спо-

Особенности изменения концентрации кальция в зависимости от стимулов
(Н. Д. Алехина [и др.], 2005)

Стимул	Ответная реакция	Характер возрастания $[Ca^{2+}]_{цит}$ (подъем — высокий уровень — спад)
1. Холодовый шок	Экпрессия генов <i>SOR</i> , <i>KIN-1</i> ; синтез пролина; изменения состава липидов; акклиматизация к холоду	 Кратковременное увеличение: 0 — (4 — 5) — 30 (с)
2. Гипоосмотический шок	Осмоадаптация	 Двухфазная динамика: 30 — 60 — 150 (с)
3. КС	Фотоморфогенез	 Продолжительное стационарное состояние: 30 — 150 — 420 (мин)
4. АБК и потенциал на мембране	Закрывание устьиц	 Осцилляции с большим периодом (мин) и центростремительная волна (не указана), которая распространяется за 5–10 с и релаксируется за 40–50 с
5. Сигналы межклеточного взаимодействия	Полярный рост кончиком корневого волоска	 Продолжительный и устойчивый градиент с максимумом у кончика
6. <i>Nod</i> -фактор	Скручивание корневых волосков, образование клубеньков	 Продолжительное увеличение через 5 мин и осцилляция в области ядра

П р и м е ч а н и е. ↑ — момент воздействия.

собами. На регуляторную роль кальция в растениях указывают следующие факты:

- изменения в ответ на внешние стимулы содержания цитоплазматического Ca^{2+} в клетках;
- идентификация Ca^{2+} - и Ca^{2+} /КМ-зависимых ПК, их субстратов и других Ca^{2+} /КМ-зависимых энзимов;
- непосредственное обнаружение чувствительных к стимулам инозитолфосфатов (ИФ_1 , ИФ_2 и ИФ_3) в разных частях растений и установление их роли в сигнальной трансдукции;
- установление Ca^{2+} -транспортных механизмов на уровне клеток и органелл;
- эффекты Ca^{2+} на регуляцию экспрессии генов, процессы транскрипции и трансляции (рис. 6.4).



Рис. 6.4. Схема предполагаемого механизма действия кальция на процессы транскрипции и трансляции (B. W. Poovaiah, A. S. Reddy, 1987)

В заключение отметим, что система вторичных посредников с участием кальция сложнее, чем система цАМФ. Это связано с более разнообразным изменением количества цитоплазматического Ca^{2+} и сложностью его метаболизма по сравнению с цАМФ. Тем не менее роль кальция как вторичного посредника в регуляции внутриклеточных процессов по сравнению с циклическими нуклеотидами для растений более очевидна.

Глава 7

СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ С УЧАСТИЕМ МЕДИАТОРОВ

В тканях животных функционируют сложные системы регуляции. Каждая система регуляции включает низкомолекулярный медиатор, ферменты его синтеза и катаболизма, чувствительный к нему рецептор. Все компоненты системы участвуют в восприятии и передаче внешнего сигнала по организму и реализации быстрой ответной реакции. Способность передачи восприятия и передачи сигнала основывается на межклеточных контактах. Способность клеток поддерживать связь друг с другом необходима для регуляции их роста и развития, организации их в ткани, деления и координации происходящих процессов на организменном уровне.

7.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ. КОНЦЕПЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

В растениях присутствуют соединения, которые являются медиаторами у животных. Они вызывают, как отмечено выше, заметные физиологические изменения. В растениях выявлены и другие компоненты системы регуляции с участием биомедиаторов. Одним из важнейших мембранных элементов системы регуляции является регуляторный белок (G-белок), способный связывать ГТФ. G-белки играют основную роль в механизмах передачи сигнала с поверхности внутрь клеток животных. Они обнаружены и в плазмалемме клеток высших растений. ММ ГТФ-связывающих белков у растений и животных примерно равна 90 кДа. Содержание этих протеидов в плазмалемме корней кукурузы составляет ~ 0,4 % от общего количества мембранного белка. Общая схема действия медиаторов представлена на рис. 7.1.

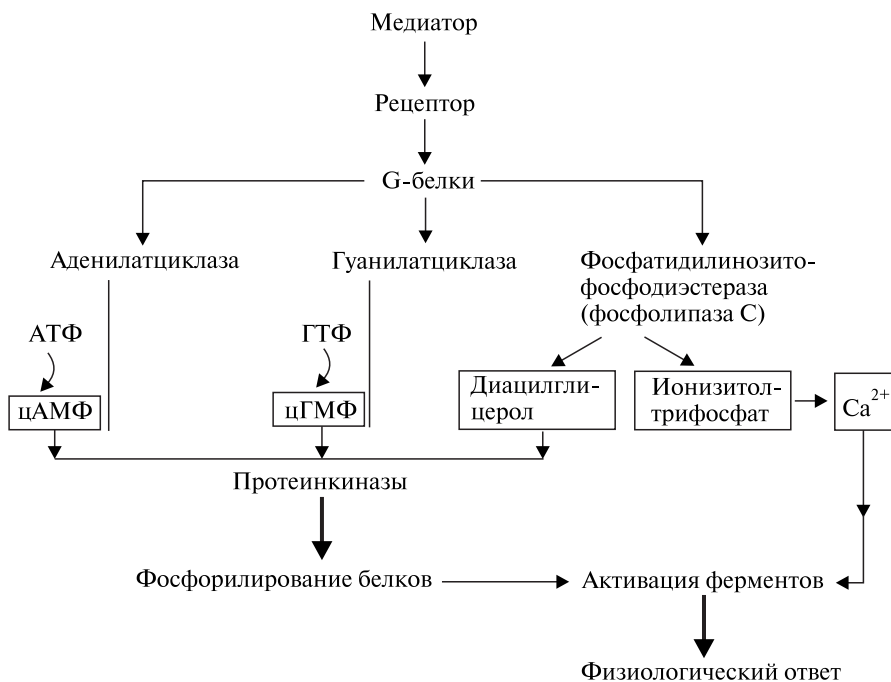


Рис. 7.1. Общая схема действия биомедиаторов
(В. В. Рощина, 1991)

На рубеже XIX–XX вв. П. Эрлих сформулировал знаменитый принцип: вещества не действуют, не будучи связанными, т. е. необходимы некие места связывания (рецепторы). Теория рецепторов получила свое развитие при изучении действия различных гормонов. Установленные факты по влиянию гормонов позволили предположить, что последние связываются с расположенными на поверхности специальными молекулами, способными «узнавать» гормон, взаимодействовать с ним и передавать информацию во внутриклеточное пространство, т. е. с рецепторами. Однако достоверно доказать наличие рецепторов на мембранах не так просто.

С одной стороны, это связано с чрезвычайно низкой концентрацией, их лабильностью и неоднородностью, с другой – на поверхности любой клетки имеются мембранные компоненты, неспецифически связывающие тот или иной гормон (эффе́ктор), т. е. не все места, связывающие эффе́ктор, являются рецепторами. Поэтому необходимы были подходы и критерии, позволяющие соотнести соответствующее место связывания эффе́ктора к рецептору.

Для строгого доказательства наличия рецепторов на мембране лучше всего выделить этот компонент, очистить, затем встроить в искусственную бислойную липидную мембрану или липосому и показать, что он сохраняет биологическую активность.

Для выделения и изучения свойств мембранного рецептора используется несколько методов, наиболее часто – хроматографический и метод радиоактивных лигандов или их комбинаций. Методы основаны на анализе процессов взаимодействия лиганда (эффектора) с рецептором.

Лиганды – соединения, связывающиеся с соответствующим рецептором, причем одни из них являются агонистами, другие – антагонистами.

Выделенные рецепторы оказались гликопротеинами или гликолипидами. Молекула любого рецептора состоит, по крайней мере, из двух частей. Одна из них, наружная, служит для связывания лиганда. Основную роль в этом играют полисахаридные цепи молекулы рецептора. Вторая, менее полярная часть молекулы рецептора, служит для ее закрепления в липидном бислое и передачи принятого сигнала внутрь клетки. Взаимодействие связывающих и передающих участков осуществляется благодаря конформационным перестройкам, происходящим в результате «посадки» эффектора (агониста) на связывающий участок рецептора.

К основным критериям, по которым можно судить о наличии рецепторов, относят следующие:

- высокое сродство, характеризующееся тем, что лиганд (эффектор) действует при низкой концентрации (10^{-9} моль/л и ниже);
- выход на плато кривой, описывающей процесс взаимодействия (эффектор – рецептор) на мембране от времени и концентрации (количество рецепторов ограничено);
- строгое соответствие пространственных и зарядовых геометрий *лиганд – рецептор*;
- антагонисты эффектора, связываясь с рецептором, должны препятствовать проявлению индуцированной эффектором реакции;
- тканевая специфичность биологического действия веществ;
- обратимость связывания с рецептором при удалении эффектора.

Одним из основных отличий рецепторного связывания от нереперторного является быстрый физиологический ответ на гормональный или медиаторный эффектор и соответствующие величины констант связывания (10^{-9} моль/л и ниже).

7.2. ХОЛИНЭРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА РЕГУЛЯЦИИ

Эта система регуляции включает такие компоненты, как АХ, холинорецептор, фермент синтеза АХ – АХТ и фермент гидролиза – ХЭ (рис. 7.2).

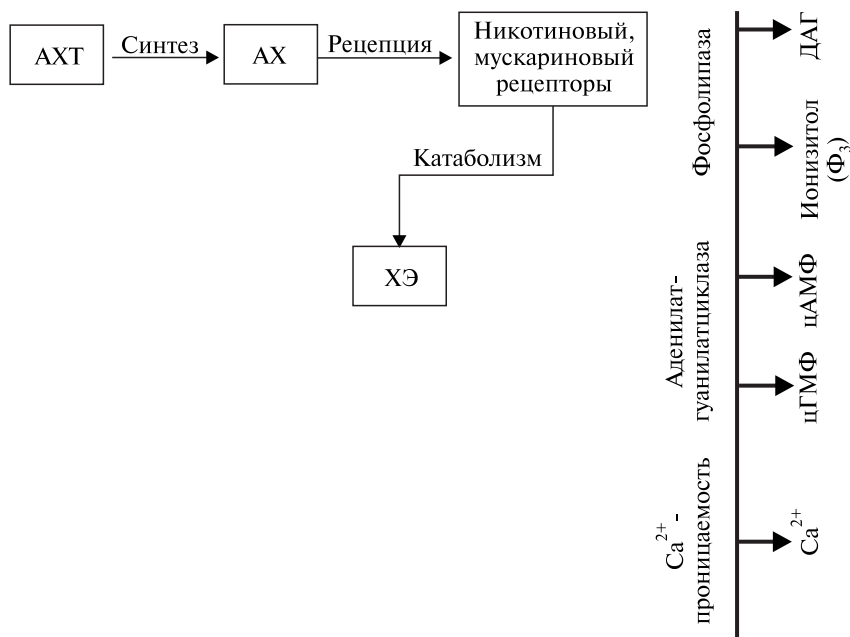


Рис. 7.2. Система регуляции с участием ацетилхолина (В. В. Рошина, 1991)

В начале 1970-х гг. впервые был выделен ацетилхолиновый рецептор из электрического ската *Torpedo* с помощью полипептидных нейротоксинов из яда змей.

Холинорецептор животных представляет собой пентамерный гликопротеин. Он состоит из трансмембранных полипептидов четырех разных типов, каждый из которых кодируется отдельным геном. Рецептор имеет средство к АХ и определенным фармакологическим агентам, которые могут блокировать физиологическое действие АХ (антагонисты) или, наоборот, имитировать его (агонисты).

Агонистами АХ являются мускарин, ареколин, никотин, а антагонистами – атропин, *d*-тубокурарин, α -бутаротоксин.

По чувствительности к агонистам АХ никотину или мускарину различают никотиновые и мускариновые холинорецепторы. Два этих типа холинорецепторов блокируются разными антагонистами АХ: никотиновые – *d*-тубокурарином, а мускариновые – атропином.

Никотиновый холинорецептор (рис. 7.3) представляет собой сложный белок с молекулярной массой 250–300 кДа и состоит из 5-6 субъединиц с ММ от 40 до 66,5 кДа, образующих ионный канал.

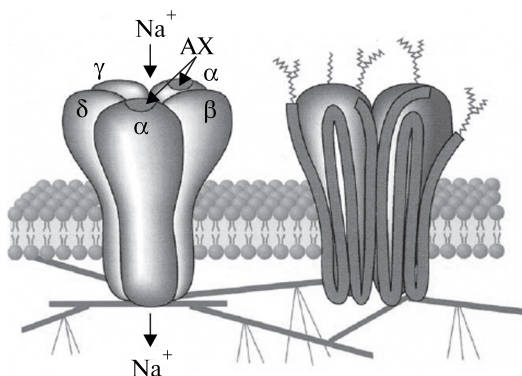


Рис. 7.3. Схема расположения никотинового холинорецептора в мембране животных клеток (В. В. Рощина, 1991)

При возбуждении нервной клетки одна из субъединиц связывает АХ, происходят конформационные изменения белка и канал открывается.

В отличие от никотинового рецептора, мускариновый холинорецептор управляет работой ионного канала, но сам его не образует.

Холинорецептор имеет два активных центра связывания АХ. Первый — отрицательно заряженный анионный центр, который определяется карбоксильными группами глутамата или аспартата. Этот участок рецептора вступает во взаимодействие с положительно заряженной «головкой» молекулы АХ. Второй — эстерофильный положительно заряженный центр, который взаимодействует с карбоксильной группой и кислородом эфирной связи молекулы биомедиатора.

Действие рецептора можно представить в виде двухступенчатого процесса — связывания лиганда и инициации сигнала действия. Реализация последнего процесса может осуществляться двумя различными путями. Первый путь связан с образованием рецептором ионного канала, другой — включает пусковые механизмы систем синтеза вторичных посредников. При этом происходит активация АЦ, катализирующей образование вторичного мессенджера цАМФ на внутренней стороне плазматической мембраны, что, в свою очередь, вызывает целый ряд реакций внутри клетки. Скорость обычной реакции в этом случае ниже, чем ионофорного механизма.

Связывание АЦ с мускариновыми рецепторами сопровождается увеличением концентрации цАМФ и цГМФ и образуемых при гидролизе фосфатидилинозитолфосфата ДАГ и ИФ.

Взаимодействие с никотиновым рецептором приводит только к открытию определенных видов ионных каналов на плазматической мембране.

Наличие компонентов ацетилхолинэргической системы (АХ, АХТ и ХЭ) инициировало исследования, направленные на поиски холинового рецептора в растениях. Был проведен ряд исследований по выяснению реакции растений на действие АХ и его агонистов и антагонистов.

Целенаправленные поиски холинорецептора у растений показали, что *d*-тубокурарин – антагонист АХ – ингибирует стимулированное КС (<700 нм) поглощение ацетата натрия корнями *Phaseolus aures*; но, с другой стороны, *d*-тубокурарин слабо ингибировал корневое давление у подсолнечника *Helianthus annuus*, которое обычно стимулируется АХ.

В других исследованиях показано, что АХ ингибирует выделение этилена дисками листьев сои, тогда как его антагонист атропин – стимулирует.

Отмечена также стимуляция АХ в микромолярных концентрациях открытия устьиц. По действию агонистов АХ (никотин, мускарин) и антагонистов (α -бунгаротоксин, атропин) на движение устьиц листьев *Vicia faba* L. сделано предположение о наличии двух видов рецепторов на протопластах, выделенных из замыкающих устьичных клеток листьев. Причем эффекты мускарина, и атропина проявлялись в присутствии Ca^{2+} . Таким образом, и мускариновые, и никотиновые рецепторы включены в АХ-систему регуляции устьичных движений.

В последние годы польскими исследователями показано, что разрывание листьев этиолированными проростками пшеницы стимулируется как АХ, так и его агонистами – мускарином и никотином (10^{-6} М) в присутствии ионов Ca^{2+} и Na^{+} . Напротив, антагонисты АХ атропин и *d*-тубокурарин (10^{-5} М) блокируют этот процесс в присутствии указанных ионов.

В этой связи особый интерес вызывают результаты по действию АХ на набухание протопластов, выделенных из этиолированных листьев пшеницы (рис. 7.4).

Эффекты набухания протопластов наблюдались не только в присутствии Ca^{2+} , но и K^{+} или Na^{+} . Максимальное набухание протопластов отмечалось в растворе, содержащем 10^{-6} М АХ, сразу же после его введения в среду. Кроме АХ, карбомилхолин также стимулировал набухание. Блокаторы кальциевых каналов (нифедипин и La^{3+}) ингибировали АХ-стимулируемое Ca^{2+} -зависимое набухание протопластов. Такое же влияние оказывали Li^{+} , ингибиторы КМ и ингибитор G-белка. Ни одно из указанных веществ, за исключением ингибиторов КМ, не влияло на АХ-стимулирующее $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$ -зависимое набухание. При изучении действия агонистов и антагонистов рецепторов АХ в средах, содержащих Ca^{2+} , K^{+} или Na^{+} , было установлено следующее. Никотин в концентрации 10^{-7} М

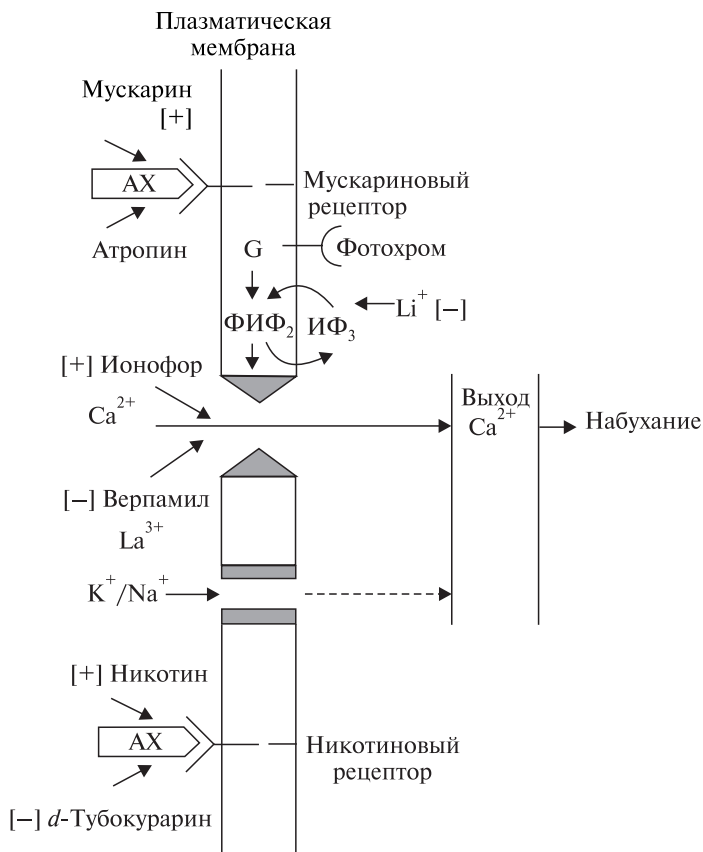


Рис. 7.4. Схема действия ацетилхолина на набухание протопластов (A. Tretyn, R. E. Kendrick, 1991)

стимулирует набухание протопластов в среде, содержащей K^+ или Na^+ . Протопласты, инкубированные в среде с Ca^{2+} и обработанные никотином, не изменили объема.

Противоположные результаты получены в опытах с агонистом мускарином. Мускарин стимулировал набухание протопластов в присутствии Ca^{2+} , тогда как эффект отсутствовал в средах, содержащих K^+ или Na^+ . Эффекты антагонистов АХ рецепторов также зависели от ионного состава среды. Атропин (антагонист мускариновых рецепторов) в концентрациях от 10^{-6} до 10^{-5} М в средах с K^+ или Na^+ не влиял на объем протопластов. Однако в присутствии Ca^{2+} атропин нейтрализовал стимулирующее дей-

ствии АХ. *d*-Тубокурарин (антагонист никотиновых рецепторов) в присутствии Ca^{2+} незначительно подавлял набухание, тогда как в средах с K^+ или Na^+ полностью блокировал эффект АХ.

Приведенные здесь и ранее результаты могут свидетельствовать о присутствии рецепторов АХ в растительных клетках.

Помещенные в раствор 0,5 мМ CaCl_2 , 0,1 мМ KCl или 0,1 мМ NaCl протопласты не изменялись в объеме после трехминутного освещения ДКС. Однако протопласты, освещенные ДКС, а затем обработанные АХ в темноте, достигали объема протопластов, облученных одноминутным импульсом КС.

На основании данных по действию КС и ДКС высказывалось мнение, что у растений рецептором АХ может быть хромпротеид – фитохром. Это связано с тем, что в ряде опытов АХ имитировал действие КС на управляемые фитохромом процессы. Последнее более вероятно тем, что светочувствительный белок может управлять ионной проницаемостью. Однако некоторые исследователи отрицают прямое действие АХ на фитохром, поскольку не обнаружили эффектов его действия на такие управляемые фитохромом процессы, как синтез антоциана и никтинастические движения листьев ряда растений. Присутствие АХ в хлоропластах и его эффекты на некоторые реакции фотосинтезирующих мембран послужили основанием для поиска рецепторов АХ в хлоропластах. Данные, полученные по изучению влияния АХ, его агонистов и антагонистов на мембранные реакции хлоропластов, приведены в табл. 7.1.

Таблица 7.1

Характеристика холинорецепторных свойств мембран хлоропластов
(В. В. Рошина, 1991)

Реакция	Минимальная концентрация агониста, вызываемого эффект, моль/л				Антагонист, блокирующий эффект, индуцируемый АХ	Насыщение концентрационной кривой АХ
	АХ	М	АР	КХ		
Фосфорилирование	+ 10^{-9}	—	++ 10^{-10}	+ 10^{-9}	Атропин, α -бунгаротоксин, хинуклидинилбензилат	Есть
Na^+ -поток (выход)	++ 10^{-9}	++ 10^{-9}	++ 10^{-9}	+ 10^{-9}	Атропин, <i>d</i> -тубокурарин, α -бунгаротоксин	Есть

Примечание. М – мускарин, АР – ареколин, КХ – карбамоилхолин, «+ +» – сильная стимуляция, «+» – слабая стимуляция, «–» – ингибирование.

Как видно из табл. 7.1, подобно АХ, его агонисты мускарин и ареколин стимулируют выход натрия и калия из интактных хлоропластов гороха и поглощение тилакоидами ионов H^+ .

Антагонисты АХ (атропин 10^{-6} моль/л, *d*-тубокурарин 10^{-6} моль/л и др.) подавляли выход ионов Na^+ (рис. 7.5).

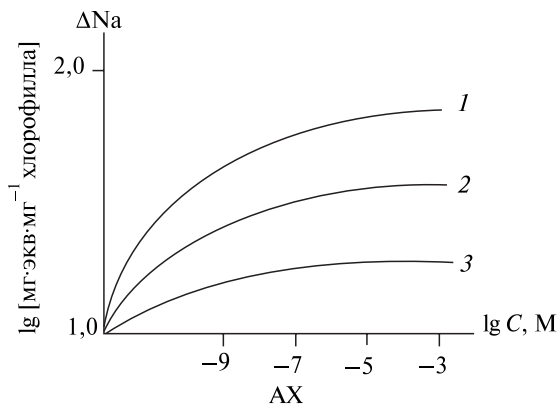


Рис. 7.5. Влияние агонистов ацетилхолина на выход ионов Na^+ из хлоропластов гороха, предварительно обработанных АХ: 1 — без блокаторов; 2 — атропин 10^{-6} М; 3 — *d*-тубокурарин 10^{-6} М (В. В. Рощина, 1991)

Для АХ, мускарина и ареколина константа Михаэлиса $K_M = 5 \cdot 10^{-9}$ М для выходящего потока натрия из хлоропласта была одного порядка с вызываемыми АХ ответами клеток млекопитающих. Константы связывания агонистов, рассчитанные по изменению скорости фосфорилирования, для АХ и ареколина также составляли $5 \cdot 10^{-9}$ М. Эти результаты свидетельствуют о высоком сродстве мембранных рецепторов хлоропластов к этим соединениям, что сравнимо с животными. Проявление действия АХ и агонистов в низких концентрациях, насыщение концентрационных кривых и малые величины K_M свидетельствуют в пользу наличия функциональных аналогов холинорецепторов в оболочке интактных пластид. Но, конечно, маловероятным является прямое сходство свойств холинорецептора животных клеток и мембран хлоропластов и плазматических мембран клеток. Возможно лишь предполагать присутствие в хлоропластах одного из функциональных аналогов холинорецептора в наружной мембране пластид, который может регулировать ионные потоки Na^+ и K^+ , а другого — в тилакоидах, связанного с регуляцией фотофосфорилирования.

В табл. 7.2 представлены основные реакции растений, чувствительных к АХ, его агонистам и антагонистам.

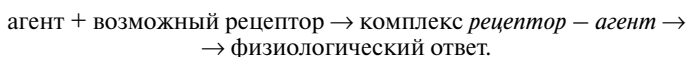
Таблица 7.2

**Реакции растений на действие ацетилхолина,
его агонистов и антагонистов
(В. В. Рощина, 2010)**

Реакция	Агонист	Антагонист
Подвижность одноклеточных фотосинтезирующих организмов	АХ	Атропин
Поглощение C^{14} -ацетата	АХ	<i>d</i> -Тубокурарин
Поглощение воды клетками	АХ	Атропин, <i>d</i> -тубокурарин
Корневое давление	АХ	<i>d</i> -Тубокурарин
Выделение этилена	АХ	Атропин
Рост зародышей (эмбрионы)	Никотин	–
Прорастание вегетативных микроспор	АХ, Мускарин	α -Бунгаротоксин, <i>d</i> -тубокурарин
Движение устьиц	Мускарин	<i>d</i> -Тубокурарин
Выход Na^+ из интактных хлоропластов	АХ, мускарин, карбомоилхолин	<i>d</i> -Тубокурарин, α -бунгаротоксин
Выход K^+ из интактных хлоропластов	АХ, ареколин, мускарин	Атропин, <i>d</i> -тубокурарин
Фотофосфорилирование	АХ, ареколин, мускарин, карбомоилхолин	Атропин, <i>d</i> -тубокурарин, α -бунгаротоксин
Развертывание листьев	АХ, мускарин, никотин	Атропин, <i>d</i> -тубокурарин
Автофлуоресценция рыльца пестика	АХ	Атропин, <i>d</i> -тубокурарин
Оплодотворение после обработки рыльца пестика	АХ	Атропин, <i>d</i> -тубокурарин, α -бунгаротоксин
Поглощение воды сухой пылью	АХ	Атропин, <i>d</i> -тубокурарин
Сокращение протопласта	АХ	Атропин
Эксудация ксилемного сока из сосудов корней	АХ	Атропин

Сравнивая описанные физиологические ответы с участием холинорецептора у животных с данными, полученными на растительных клетках, можно отметить определенное сходство. АХ и его агонисты вызывают в растениях изменения K^+/Na^+ -проницаемости и деполяризацию плазмалеммы или внешней мембраны хлоропластов, что напоминает реакции с участием никотинового холинорецептора животных.

Вполне возможно, что в растительных клетках работает и механизм вторичных мессенджеров, включаемый мускариновым холинорецептором. цАМФ, цГМФ и АЦ найдены в тканях растений и даже хлоропластах. Конечный ответ в этом случае сводится к достаточно простой схеме:



Рассмотрим другие компоненты холинэргической системы регуляции, а именно свойства ферментов синтеза и катаболизма (АХТ и ХЭ).

Ацетилхолинтрансфераза. Активность этого фермента, принимающего участие в синтезе АХ из холина и уксусной кислоты, впервые обнаружена в жгучих волосках крапивы. Затем аналогичный фермент найден в экстрактах зародышевых почек гороха, цветной капусты, фасоли, семенах лука и др. Скорость образования АХ у крапивы была сравнима со скоростью синтеза у домашней мухи (табл. 7.3). Однако все выделенные из растений препараты этого фермента отличались в сотни и тысячи раз более низкими скоростями синтеза по сравнению с аналогичным ферментом мозга крысы или свиньи.

Таблица 7.3

Ацетилхолинтрансфераза в живых организмах
(B. Smallman, A. Maheckjee, 1981)

Организм	АХ, 10^{-9} моль/мин на 1 мл среды	Белок, мг/мл	Специфическая активность, 10^{-9} моль/мин на 1мг белка
<i>Urtica dioica</i>	1,067	1,0	1067,00
<i>Pisum sativum</i>	0,108	5,7	18,94
<i>Spinacia oleracea</i>	0,016	3,5	4,53
<i>Helianthum annuus</i>	0,026	4,1	6,26
<i>Oscillatoria agardhii</i>	0,016	101,0	0,16
<i>Musca domestica</i>	1,210	1,2	1008,00

АХТ проявляет максимальную активность при температуре 40 °С и рН 9,0. Наибольшая активность АХТ выявлена в почках и молодых листьях. Активность АХТ, обнаруженная в тканях крапивы, в 100 раз выше, чем в тканях гороха, шпината и других растений.

Как и в клетках животных, в клетках растений АХТ находится главным образом в цитоплазме и легко ассоциируется с клеточными мембранами в средах с низкой ионной силой.

Так, в *Phaseolus vulgaris* наибольшая активность фермента наблюдалась в цитозоле (57 % от общей активности), что может указывать на подобие с животными тканями. Однако в *Phaseolus aureus* в кончике корня синтез АХ идет преимущественно в мембранах ЭПР. Некоторые авторы предполагают, что местом синтеза АХ могут быть хлоропласты (на примере гороха). В растениях может функционировать специфический механизм, контролирующий синтез АХ. Есть сообщения, что синтез АХ в цистернах ЭПР контролируется фитохромом через изменение активности АХТ.

АХТ, выделенная из проростков фасоли, имела ММ 80 кДа, что сравнимо с аналогичными белками из животных объектов – 66–68 кДа.

K_M , характеризующая сродство фермента к субстрату, для АХТ растений равна $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Холинэстераза. Впервые ХЭ была идентифицирована в 1920-х гг. О. Леви в экспериментах, проводимых на сердце амфибий. В 1938 г. фермент был обнаружен и у низших растений, а затем найден в плодовых телах шампиньонов, бактериях. Таким образом, стало ясно, что фермент присутствует не только в организмах животных, обладающих нервной системой.

Для животных установлено два типа ХЭ. Фермент, специфичный к АХ, называют истинной ХЭ или АХЭ. Фермент, гидролизующий с высокой скоростью не только АХ, но и другие холиновые эфиры – бутирилхолин, пропионилхолин и т. д., называют псевдохолинэстеразой или просто ХЭ.

Активность истинных ХЭ в отличие от псевдохолинэстераз ингибируется высокими концентрациями субстрата ($>10^{-3}$ М). Причиной снижения скорости гидролиза при возрастании содержания субстрата является взаимодействие двух и более молекул АХ с одной каталитически активной субъединицей АХЭ, и они мешают друг другу принять правильную ориентацию в активном центре фермента. Возможно также взаимодействие избыточных молекул субстрата с аллостерическими центрами АХЭ.

Также следует отметить, что антитела против АХЭ не связываются с псевдохолинэстеразой. ХЭ различаются по субстратной специфичности, чувствительности – это видо-, тканеспецифические ферменты.

Начало систематическим исследованиям ХЭ растений было положено в 60-е гг. XX в. Холинэстеразная активность была обнаружена сначала в экстрактах харовой водоросли нителлы. В дальнейшем было показано, что это явление присуще многим высшим растениям (табл. 7.4).

Таблица 7.4

**Наличие холинэстеразной активности в
экстрактах разных органов растений**
(В. В. Рощина, 1991)

Растения	Орган
<i>Nitella</i> sp.	Таллом
<i>Spinacia oleracea</i>	Листья
<i>Zea mays</i>	Листья
<i>Cassia fora</i>	Корни
<i>Lathyrus latifolia</i>	Цветки
<i>Lathyrus odoratus</i>	Корни
<i>Lathyrus sativus</i>	Корни
<i>Leguminosae</i>	Корни
<i>Medicago sativa</i>	Корни
<i>Phaseolus aureus</i>	Клубеньки, корни
<i>Pisum sativum</i>	Листья, корни
<i>Vicia faba</i>	Корни
<i>Mimosa pudica</i>	Корни
<i>Solanum melongena</i>	Листья, корни
<i>Urtica dioica</i>	Листья
<i>Albizia julibrissin</i>	Листья

Способностью гидролизовать холиновые эфиры обладают все органы и ткани растений: листья, корни, семена, цветки и т. д. Существует, как уже отмечалось, тканевая специфичность проявления активности ХЭ. Самая высокая активность в листьях и зародышевых почках, например для гороха $7 \cdot 10^{-9}$ моль·мин⁻¹г⁻¹ сырой массы. Особенно часто холинэстеразная активность обнаруживается у представителей семейства *Leguminosae*, в основном в корнях. Холинэстеразная активность встречается в листьях 64 видов растений из 50 семейств.

Способность гидролизовать холиновые эфиры возникает на самых ранних стадиях развития растений. Семена *Pisum sativum* начинают проявлять ацетилхолинэстеразную активность сразу же после прорастания. В первые 24 ч активность довольно высока, а затем снижается. В период между 48 и 72 ч после начала роста наблюдается лаг-фаза активности. После этого начинается синтез фермента *de novo* и одновременно возрастает его активность, в 3 раза превышая исходный уровень.

Имеются сведения о том, что холинэстеразная активность обнаруживается даже у эмбриона и в клетках алейронового слоя семян пшени-

цы, овса, тыквы. Она отмечается на стадии дифференцировки корней и стеблей, в эпидермисе, флоэме, камбии и апикальных меристемах этих растений.

На основании гистохимических исследований в 1989 г. была высказана гипотеза об участии ХЭ растений в узнавании пыльцы своего вида рыльцем пестика цветков *Pharbitis nil*.

В растениях ХЭ содержится в плазмалемме, клеточной стенке и частично в цитоплазме клеток. У лишайника *Parmelia caperata* АХЭ сосредоточена в клеточных стенках или(и) плазматических мембранах обоих симбионтов – гриба и водоросли. К настоящему времени имеются сведения о локализации фермента в различных клеточных компартментах (см. табл. 5.4) в зависимости от органа и ткани растения (табл. 7.5).

Таблица 7.5

Локализация холинэстеразы в растительной клетке
(В. В. Рощина, 1991)

Компартмент	Орган, ткань	Растение
Клеточная стенка	Гипокотиль, корень	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	Корень	<i>Phaseolus aureus</i>
	Семядоля	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	Таллом	<i>Parmelia caperata</i>
Плазмалемма	Корень	<i>Phaseolus aureus</i>
	Семядоля	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	Таллом	<i>Parmelia caperata</i>
Ядро	Корень	<i>Pisum sativum</i>
Хлоропласт	Лист	<i>Pisum sativum</i>
		<i>Urtica dioica</i>
		<i>Zea mays</i>
		<i>Phaseolus aureus</i>
Цитоплазма	Корень	<i>Phaseolus aureus</i>
	Семядоля	<i>Phaseolus vulgaris</i>

При анализе гидролиза АХ фракциями гомогената и хлоропластов гороха и крапивы обнаружено, что наибольшая гидролизующая активность сосредоточена в хлоропластах.

Для выяснения локализации фермента в пластидах было проведено разделение хлоропластов на фракции в градиенте плотности сахарозы. Холинэстеразная активность была обнаружена во фракциях наружных

мембран и тилакоидах. При этом активность холинэстеразы в тилакоидах была примерно в 7 раз выше, чем в оболочке хлоропластов.

Продолжаются работы по выделению и очистке холинэстераз растений и проводится анализ их свойств. Показано, что АХ, гидролизующий белок из корней *Phaseolus aureus*, отличается от неспецифических эстераз более высокими скоростями реакции ($K_M = 0,84 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и способностью ингибироваться эзирином и прозерпином. Неспецифические эстеразы имеют более высокие $K_M > 1$ моль/л, чем ХЭ, и отличаются по молекулярной массе.

Согласно некоторым данным, различают слабосвязанные (вымываемые буфером) и прочносвязанные с мембранами (вымываемые буфером, содержащим 4,5 % сульфата аммония) фракции ХЭ в растениях. ХЭ в экстрактах из проростков и корней гороха, а также из семян *Allium* имела несколько изоформ. Множественные формы обнаружены в слабосвязанной фракции АХЭ, выделенных из хлоропластов листьев гороха, крапивы, белой акации и вьюнка. В прочносвязанной фракции исследованных растений множественные формы не найдены. В экстрактах листьев таких растений, как бобы и кукуруза, слабосвязанный фермент также не имел множественных форм, а прочносвязанная форма вообще отсутствовала.

АХЭ из *Zea mays* гидролизовала АХ и пропионилхолин, но не бутирилтиохолин, а алифатический ингибитор АХЭ неостигмин бромид конкурентно ингибировал ее активность. Установленные закономерности говорят о том, что в кукурузе АХЭ функционирует подобно животным. Однако кинетический анализ показывает, что АХЭ кукурузы имеет более низкую аффинность к веществам и ингибиторам по сравнению с животными. Скрининг показал, что гомологи АХЭ кукурузы, широко распространенные в растениях, отсутствуют в животных тканях. Полученные результаты позволяют предположить, что специфически распространенное в растительном царстве семейство АХЭ включает новые энзимы.

ХЭ удалось выделить не только из сформированных хлоропластов, но и из этиопластов гороха. В этиолированных пластидах содержание ХЭ было в 3 раза меньше, чем в нормальных зеленых хлоропластах, а их активность в 5 раз ниже.

Основная часть выделенных ферментов с большой скоростью гидролизует АХ и ацетилтиохолин по сравнению с другими холиновыми эфирами. Кажущиеся константы K_M , характеризующие скорость гидролиза субстрата и сродство к нему активного центра ХЭ растений, были одного порядка, как и для ХЭ нервной ткани, эритроцитов и других тканей позвоночных, и составляют $(0,67-5,0) \cdot 10^{-4}$ моль/л. Избыток субстрата ингибирует активность белков, и концентрационная кривая зависимости скорости гидролиза холиновых эфиров имеет колоколообразную форму (рис. 7.6).

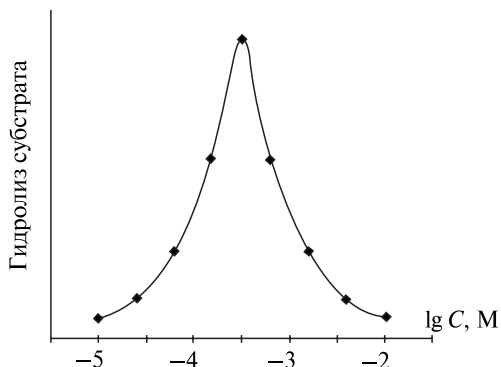


Рис. 7.6. Гидролиз ацетилхолина препаратами холинэстеразы из листьев гороха (В. В. Рошина, 1991)

Аналогичную форму имеет кривая гидролиза субстрата АХЭ из нервной ткани, эритроцитов млекопитающих, электрического органа рыб. Специфический ингибитор псевдохолинэстераз действует в экстрактах растений в высоких концентрациях ($\geq 10^{-3}$ М), тогда как ингибиторы АХЭ в концентрациях в 100 и более раз низких.

Следовательно, на основании полученных данных можно заключить, что ХЭ растений представляют собой в основном истинные ХЭ или АХЭ. Как и ферменты из животных тканей, они имеют у ряда растений оптимальные рН 8,0–8,3 и температуры 37–40 °С, но у большинства растений эти показатели все же более низкие: рН 7,8–8,0 и температура 30 °С соответственно, как и для псевдохолинэстераз животных; есть данные, что в семенах *Allium altaicum* наряду с АХЭ есть и псевдохолинэстераза.

Для установления регуляторных механизмов действия АХЭ изучалась ее активность в рассаде дикого типа и фитохромных мутантах томата. Активность ингибировалась избытком субстратов и известными ингибиторами АХЭ животных – эзерином и неостегмином. Активность АХЭ была найдена как во всех этиолированных органах, так и в выращиваемой на свету рассаде. В обоих случаях наибольшая активность была в семядоле, а наименьшая – в тканях корня. Активность фермента контролировалась фитохромом. В дикорастущей рассаде КС снижал активность АХЭ, тогда как ДКС подавлял эффект КС. Более того, в светозависимой растущей дикой рассаде активность АХЭ была вдвое выше, чем в этиолированных растениях. Однако у фитохромных мутантов томатов, дефектных по биосинтезу хромофора, свет не влиял на активность АХЭ. У различных мутантов КС и ДКС по-разному влияли на активность АХЭ. Предпола-

гают, что в одном типе мутанта по фитохрому происходит регуляция активности АХЭ, во втором – наблюдается влияние на синтез АХЭ *de novo*.

Определялся аминокислотный состав выделенных из структурных элементов растительной клетки ХЭ, в частности хлоропластов. Аминокислотный состав выделенной и очищенной холинэстеразы хлоропластов гороха приведен в табл. 7.6.

Таблица 7.6

**Аминокислотный состав очищенной холинэстеразы
из хлоропластов гороха
(В. В. Рощина, 1991)**

Аминокислота	Количество остатков/моль белка	Моль/100 моль
Аспарагин	57	10,0
Треонин	37	6,6
Серин	50	9,0
Глютамин	68	12,0
Пролин	32	5,6
Глицин	55	9,8
Аланин	46	8,2
Валин	33	5,8
Метионин	6–7	1,1
Изолейцин	20–21	3,8
Лейцин	44–45	7,9
Тирозин	14	2,6
Фенилаланин	20–21	3,6
Гистидин	9–10	1,7
Лизин	35–36	6,3
Аргинин	30–31	5,3

По сравнению с АХЭ, выделенной из электрического ската *Torpedo californica*, наблюдалось сходство по числу аминокислотных остатков на 1 моль белка в расчете на молекулярную массу 60 кДа (аспарагин – 59, треонин – 22, серин – 45,5, глютамин – 58,5, пролин – 38,5, глицин – 54). Отличия наблюдались главным образом в минорных остатках аминокислот.

ХЭ из хлоропластов большинства исследованных растений имели молекулярную массу субъединиц 31–63 кДа, что сопоставимо с ХЭ из микросом кролика (65–70 кДа). Высокомолекулярные формы ХЭ из листьев иногда разделились на субъединицы с меньшими молекулярными мас-

сами, хотя считают, что белки с молекулярной массой 63,1 кДа являются мономерными. Более мелкие пептиды (<60 кДа), как считают исследователи ХЭ животных, являются продуктами автопротеолиза самого фермента. В отличие от большинства ХЭ, молекулярные массы эстераз других растений (например, плодов тыквы) составляют 36 и 18 кДа.

Субстратная специфичность ХЭ растений, как отмечалось, проявляется по отношению к АХ и ацетилтихолину. Скорость гидролиза других холиновых и нехолиновых эфиров с участием ферментов представлена в табл. 7.7.

Таблица 7.7

**Скорость гидролиза некоторых эфиров
(в % от варианта с ацетилхолином)
(В. В. Рощина, 1991)**

Эфир	% к контролю
Пропионилтихолин	41
Бутирилтихолин	0–38
Индоксилацетат	67
Индофенилацетат	62
α -Нафтилацетат	0–17
Аденозинтрифосфат	0,13

При хранении ХЭ животных и растений при 20–37 °С в течение 6 ч или 1 недели при 40 °С фермент распадается на более мелкие пептиды, что указывает на его способность к автопротеолизу.

Характер взаимодействия ХЭ с их субстратами (холиновыми эфирами) представлен на рис. 7.7.

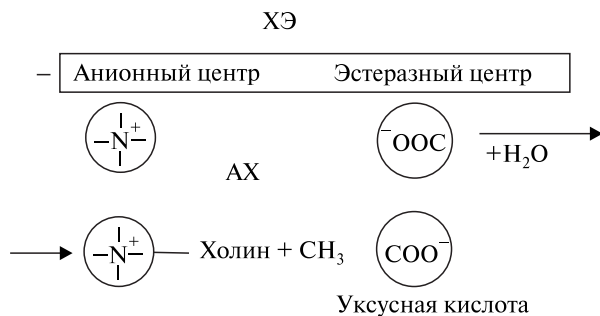


Рис. 7.7. Схема взаимодействия холинэстераз с субстратом
(В. В. Рощина, 1991)

Субстрат обычно связывается с двумя участками ХЭ. Карбоксигруппа ($-\text{CO}-\text{O}$) холиновых эфиров присоединяется водородными связями к эстеразному центру фермента, выполняющему собственно гидролизующую функцию, а $-\text{N}$ -группа АХ (катионная головка) соединяется с анионным центром ХЭ, который выполняет лишь функцию правильной ориентации субстрата.

ХЭ растений, как и животных, чувствительны к производным карбаминовой кислоты (прозерин, эзерин) и фосфорорганическим соединениям (дихлорофос, фосфон) и четвертичным аммонийным соединениям. В целом чувствительность к прозерину у ХЭ растений ниже, чем у ферментов из тканей животных. Сродство к эзерину всех растительных ХЭ было в 10–100 и более раз ниже, чем к прозерину, тогда как, например, у эритроцитов крови выше.

В связи с вышеприведенной схемой (см. рис. 7.7) можно легко понять эффект ингибирования различными веществами ХЭ. Например, соли карбаминовой кислоты (прозерин, эзерин) в низких концентрациях (10^{-5} – 10^{-6} М) угнетают активность ферментов гидролиза холиновых эфиров. Аминогруппа ингибитора, находящаяся рядом с карбонильной группой, связывается с анионным центром ХЭ, не затрагивая эстеразный центр. Ингибирование носит конкурентный характер и может быть обратным.

ХЭ латекса *Synadenium grantii* обладает более высокой, по сравнению с другими растениями, чувствительностью к карбаминовым ингибиторам. Возможно, что в млечниках этого растения фермент, чувствительный к ядам, выполняет защитную роль.

ФОС связываются со всеми серинсодержащими белками, в том числе с ХЭ. ФОС присоединяются группировкой PO_4 к серину эстеразного центра ХЭ. Такие вещества действуют как конкурентные ингибиторы, и в большинстве случаев эффекты необратимы. ФОС проявляют меньшую избирательность к ХЭ, чем карбаминовые ингибиторы. Например, они могут включаться в субъединицы холинэстеразы фасоли с ММ 61, 23 и 17 кДа, а также в серинпротеазы из тилакоидов хлоропластов шпината с ММ 38 кДа. ФОС угнетают холинэстеразную активность листьев и изолированных хлоропластов (горох), что указывает на присутствие в активном центре серина, характерного для ХЭ.

ХЭ растений имеют более низкое сродство анионного центра к ФОС, чем аналогичные ферменты млекопитающих, но весьма сходны с ферментами беспозвоночных, например морских звезд. Применение многих пестицидов связано с подавлением холинэстеразной активности вредителей культурных растений. При обработке инсектицидами обычно не учитывается ингибирование ХЭ ферментов у растений, хотя

это может быть одной из важных причин ухудшения роста. Некоторые ретарданты, производные карбаминовой кислоты, или четвертичные амины (хлорхолинхлорид и др.), также действуют на ХЭ растений. Поэтому испытания новых веществ – регуляторов роста на холинэстеразную активность растений могут иметь важное значение для сельскохозяйственных и природоохранных мероприятий, поскольку позволяют целенаправленно планировать получение высокоспецифичных и малотоксичных соединений.

Влияние факторов среды на активность ХЭ. В темноте скорость синтеза ферментов ниже, чем на свету. На ДКС скорость синтеза холинэстераз выше, чем на КС. Но каталитическая активность не зависит от световых условий. Синтез ХЭ стимулируется ИУК, а в высоких концентрациях ингибируется АХ, гибберелловой кислотой и кинетином.

О влиянии температуры и рН на холинэстеразную активность мы уже упоминали: оптимум 28–30 °С и рН 7,8–8,0 (для большинства растений); для ХЭ из латекса температурный оптимум был выше (40 °С), что может быть связано с тропическим происхождением растения. Ионы металлов также оказывают действие на ХЭ (табл. 7.8).

Таблица 7.8

**Влияние ионов на активность холинэстеразы
в побегах гороха (в % к контролю)
(В. В. Рошина, 1991)**

Ион	Активность	Ион	Активность
Li ⁺	+3	Sr ²⁺	+8
Na ⁺	+55	Mn ²⁺	–28
K ⁺	+57	Co ²⁺	–10
Rb ⁺	+1	Cu ²⁺	–48
Be ²⁺	0	Cd ²⁺	–34
Mg ²⁺	+27	Al ³⁺	–13
Ca ²⁺	0		

Na⁺, K⁺, Mg²⁺ стимулируют холинэстеразную активность в побегах гороха на 30–60 %, а тяжелые металлы Cu²⁺ и Cd²⁺ столь же сильно угнетают процесс, Ca²⁺ и Be²⁺ вообще не действуют. Однако 1–10 мМ Ca²⁺ ингибируют ХЭ из корней фасоли, а Mg²⁺ на нее не действует. Следовательно, в зависимости от условий, вида тканей и растений возможны отклонения от приведенных для побегов гороха зависимостей.

Некоторые свойства холинэстераз растений представлены в табл. 7.9.

Таблица 7.9

Характеристика холинэстераз растений и животных
(А. Tretyn, R. E. Kendrick, 1991)

Свойства	АХЭ растений	АХЭ животных
Локализация	Мембраны, клеточная стенка	Мембраны
Молекулярная масса, кДа	>200 или >800 или <80	Мономеры (?) Димеры, 118–160 Тетрамеры, 290–460 Протомеры, 66–80
Способность к агрегации	+	+
Гидролиз холиновых эфиров	Ацетил>Пропионил>Бутирил	Ацетил>Пропионил>Бутирил
Гидролиз нехолиновых эфиров	+	+
K_M для АХ, моль/л	$5,6 \cdot 10^{-5} - 4,6 \cdot 10^{-4}$	$10^{-4} - 3,0 \cdot 10^{-4}$
Оптимальная рН	8,0–9,0	8,0–8,3
Влияние ионов	Ингибируется Mn^{2+} или Ca^{2+} , Mg^{2+} не влияет	Стимулируется Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}
Влияние концентрации субстрата	Ингибируется или не ингибируется избыт- ком	Ингибируется из- бытком
Влияние холина	Ингибирует или сти- мулирует	Ингибирует
Ингибиторы: неостигмин эзерин органические фосфаты	+ + + + + + +	+ + + + + + + + +

Приведенные выше результаты дают возможность сделать заключение о наличии в растениях холинэргической системы регуляции.

7.3. СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ С УЧАСТИЕМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ

Катехоламины, серотонин, гистамин, так же как и АХ, входят в состав сложных систем регуляции у животных.

Взаимодействие элементов, составляющих указанные системы, представлено на рис. 7.8.

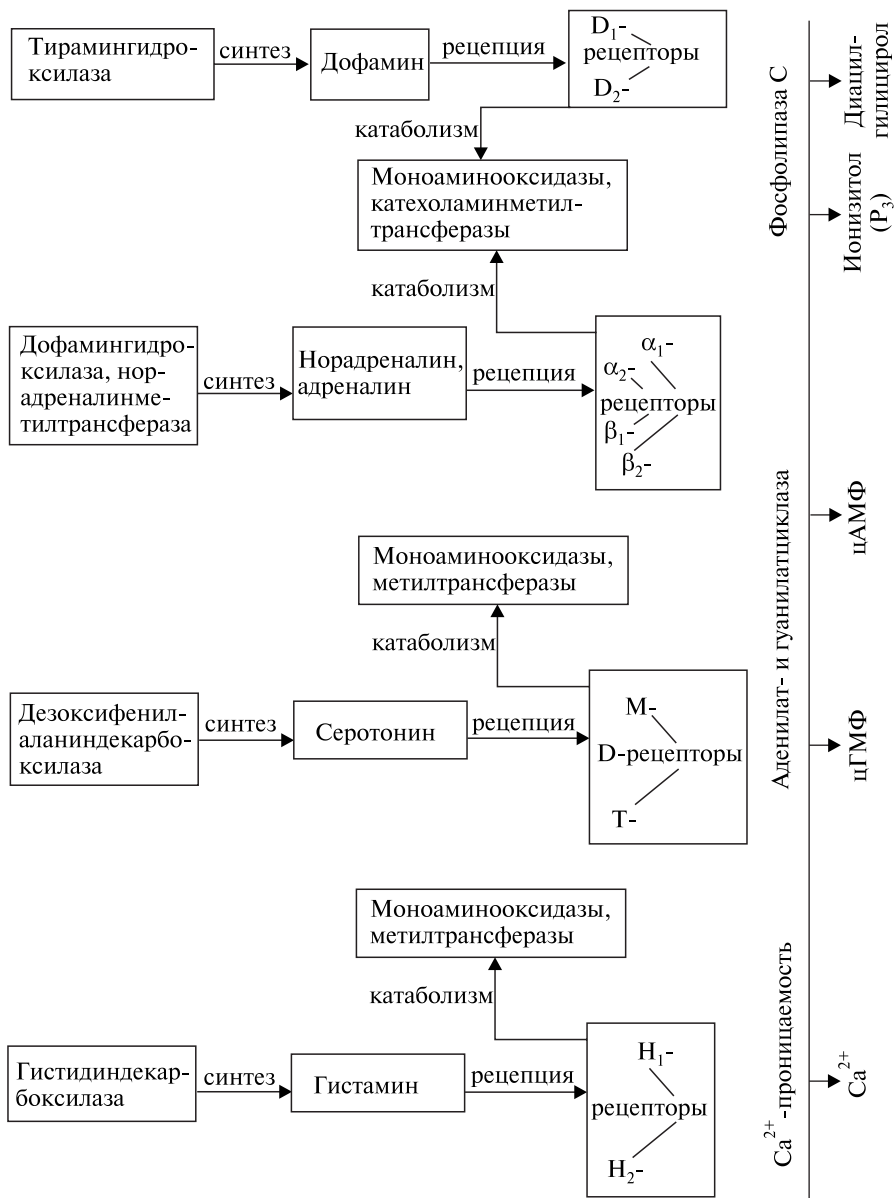


Рис. 7.8. Системы регуляции с участием биогенных аминов (В. В. Рошина, 1991)

В мембранах клеток животных имеются особые рецепторы дофамина (D_1 - и D_2 -дофаминовые рецепторы), адреналина и норадреналина (α - и β -адренорецепторы) серотонина (М-, D-, Т-серотониновые рецепторы) и H_1 -, H_2 -гистаминовые рецепторы.

У каждой группы рецепторов есть агонисты и антагонисты, некоторые из них перечислены в табл. 7.10.

Таблица 7.10

Агонисты и антагонисты биогенных аминов
(В. В. Рощина, 1991)

Биогенные амины	Агонист	Антагонист
Дофамин	Аналоги фенольной природы (диметилдофамин, метилсульфид и др.)	Хлорпромазин и его производные, сульпиридин и его производные
Норадреналин	Адреналин, эфедрин, изадрин и др.	Лабеталол, иохимбин, празозин, индерал
Серотонин	Максамин, буфотеин, квипазин	Хлорпромазин, лизергиновая кислота, бенперидол
Гистамин	Метилгистамин, диметилгистамин, этиламин, бетазол	Периламин, буримаид, метиамида, бенадрил

Агонисты дофамина представлены аналогами фенольной природы. Антагонисты дофамина — или производные хлорпромазина, или сульпирида. Агонистами норадреналина и адреналина являются окисленные метилизированные производные катехоламинов, среди которых природный алкалоид эфедрин. Антагонисты представлены сложными фенольными производными, среди которых алкалоид иохимбин. Агонистами серотонина являются в основном производные триптофана, в том числе продукт метилирования серотонина буфотеин, а в качестве антагонистов выступают хлорпромазин и его производные, а также фторированные пиридоны. К антагонистам серотонина относится и природное соединение лизергиновая кислота — сильный галлюцинационный яд. В качестве агонистов гистамина выступают его метилированные метаболиты, а агонистами H_1 -группы — дифенолы, H_2 -группы — амиды.

Недавно с помощью аффинной хроматографии из тканей животных выделен и очищен D_2 -дофаминовый рецептор с молекулярной массой 92 кДа. β -Адренорецепторы также выделены из клеток млекопитающих; они представлены полипептидами с молекулярной массой 62–67 кДа или 76 кДа. Все типы рецепторов биогенных аминов располагаются в основном на поверхности плазматических мембран животных.

Имеются также экспериментальные данные, на основании которых были сделаны выводы о возможности наличия рецепторов биогенных аминов на растительных объектах. В первую очередь следует назвать данные по влиянию агонистов (см. раздел 4.3) и антагонистов (адреноблокаторы — индерал, дигидроэрготоксин и др.) катехоламинов на мембранный потенциал и скорость движения цитоплазмы (циклоз) клеток *Nitella*.

Обработка клетки изадрином, который в животном организме является стимулятором β -адренорецепторов, в концентрации 10^{-6} М приводила к увеличению скорости движения цитоплазмы и РЭП клетки.

Индерал (блокатор β -адренорецепторов) в концентрации 10^{-6} М вызывал быстрое уменьшение скорости циклоза и РЭП.

При действии дигидроэрготоксина (α -адреноблокатор) в концентрации 10^{-7} – 10^{-6} М наблюдалось быстрое падение величин скорости циклоза и РЭП клетки.

По мере возрастания непосредственного эффекта (действие испытуемого агента на внутриклеточные системы, ответственные за поддержание циклоза) на движение цитоплазмы биогенные амины располагаются в ряд:

фенитрон < индерал < атропин < дигидроэрготоксин < адреналин <
< эфедрин < изадрин < норадреналин < серотонин.

Из потенциалзависимости скорости движения цитоплазмы возможно определить характер действия испытанных препаратов (см. гл. 3), а именно действуют ли они на движение через изменения мембранного потенциала или через влияние на структуры, ответственные за циклоз. Если по этим характеристикам разделить исследуемые адреномиметики, то первую группу образуют блокаторы адренорецепторов (фенитрон, индерал, дигидроэрготоксин), а вторую — исключительно агонисты (адреналин, эфедрин, изадрин, норадреналин). Отсюда можно предположить существование аналогии в организации структур, обуславливающих реакцию животных и растительных клеток на катехоламины и их аналоги.

Определенным подтверждением этой гипотезы служат результаты, полученные в испытаниях совместного действия активаторов и блокаторов α - и β -адренорецепторов.

Предварительная обработка клеток сравнительно низкой концентрацией дигидроэрготоксина ($5 \cdot 10^{-8}$ М), не оказывающей действия на регистрируемые параметры, предотвращала развитие реакции клетки на норадреналин в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М, вызывавшей у интактных клеток достоверный ответ. Однако эта же концентрация дигидроэрготоксина не приводила к полной утрате чувствительности к адреналину. Это объясняется тем обстоятельством, что адреналин активен как в отношении α -, так и β -рецепторов.

Аналогичная картина наблюдалась при последовательном применении блокатора (индерал) и активатора (изадрин) β -рецепторов. И в этом случае клетка, обработанная низкой концентрацией ($5 \cdot 10^{-7}$ М) индерала, теряет чувствительность к изадрину ($5 \cdot 10^{-5}$ М).

Изменение порядка применения агентов в тех же парах *антагонист — агонист* привело к подавлению в обоих случаях реакции, наступавшей под действием агониста.

Совокупность приведенных данных может быть объяснена на основании гипотезы о существовании в клетке центров взаимодействия с молекулами катехоламинов, подобных α - и β -рецепторам животных клеток, причем это подобие распространяется как на структурную организацию, так и на функциональные особенности.

Основные доводы в пользу такой гипотезы состоят в следующем:

- действие блокаторов адренорецепторов на скорость движения цитоплазмы проявляется через сдвиги РЭП; в случае активаторов адренорецепторов признаки такого влияния не выражены;
- адреномиметики, активные в отношении только α - или β -рецепторов, вызывают противоположную по знаку реакцию клетки;
- эффект норадреналина, активатора α -рецепторов, снимается блокатором этих рецепторов дигидроэрготоксином; аналогичным образом, действие активатора β -рецепторов изадрина не проявляется в присутствии индерала — характерного блокатора β -рецепторов;
- для снятия действия адреналина, активного в отношении обоих типов рецепторов, необходимо совместное применение дигидроэрготоксина и индерала.

Следует обратить внимание на то обстоятельство, что факт непосредственного действия соединения на циклоз можно трактовать как признак его проникновения в цитоплазму. Тем самым справедливо предположение, что блокаторы, действующие всегда через РЭП, либо не переносятся транспортными системами через мембрану, либо, попав в цитоплазму, не оказывают влияния на процессы, обуславливающие циклоз.

Подтверждением наличия α - и β -адренорецепторов служат результаты стимулирующего влияния адреналина и ингибирования адреноблокаторами движущей силы экссудации — корневого давления этиолированных проростков *Zea mays*.

К катехоламинам весьма чувствительным оказался и морфогенез растений. Норадреналин, адреналин (10^{-6} – 10^{-4} м) и их агонист L-изопротеренол ускоряют цветение при фотопериодическом режиме с интервалами 8 ч света и 16 ч темноты у *Lemna paucicostata*. Пропранолол (антагонист катехоламинов, блокатор β -адренорецепторов) частично подавляет цветение, вызванное катехоламинами.

Установлено также, что низкие ($<10^{-5}$ М) концентрации адреналина, норадреналина, а также дофамина стимулируют фотофосфорилирование и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -проницаемость в хлоропластах гороха. Далее было показано, что селективный агонист дофамина – 2-амино-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидронафтаген гидробромид вызывал стимуляцию синтеза АТФ в концентрациях 10^{-8} – 10^{-7} М (рис. 7.9).

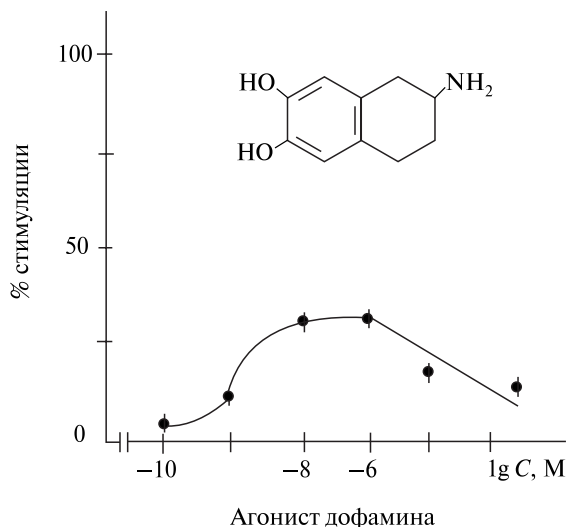


Рис. 7.9. Действие агониста дофамина 2-амино-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидронафтагена гидробромида на фотофосфорилирование с НАДФ^+ и ферредоксином в изолированных хлоропластах гороха (В. В. Рошина, 1991)

Его действие имитировало эффект, вызываемый катехоламинами в тех же концентрациях. Константы связывания дофамина и его агониста равны 10^{-9} и $2 \cdot 10^{-9}$ моль/л соответственно.

Антагонист катехоламинов – адреноблокатор иохимбин в низких концентрациях (10^{-10} – 10^{-6} моль/л) сам по себе не ингибирует синтез АТФ.

Торможение этой реакции выявляется в более высоких концентрациях. Концентрационная кривая действия норадреналина на фотофосфорилирование в обработанных иохимбином хлоропластах показывает, что максимум этой реакции смещается в сторону более высоких концентраций норадреналина и при 10^{-5} моль/л иохимбина пул предполагаемых рецепторов полностью заполнен, в результате чего стимуляции не наблюдалось (рис. 7.10).

Константы связывания норадреналина, его агониста адrenalина и антагониста иохимбина равны 10^{-8} – $5 \cdot 10^{-9}$ и $1,1 \cdot 10^{-9}$ моль/л соответственно.

Специфичность действия катехоламинов и их агонистов, эффективность низких концентраций, насыщение мест связывания и блокирование физиологической реакции антагонистами может указывать на присутствие адренорецепторов как в хлоропластах, так и в других мембранах растительных клеток.

В состав адренорецепторов хлоропластов, вероятно, входят или связаны с ними сократительные элементы (актиноподобные белки), поскольку блокатор актомиозиновых филаментов цитохолозин В препятствует стимуляции фотофосфорилирования норадреналина, а блокатор микротрубочек колхицин не оказывает подобного действия.

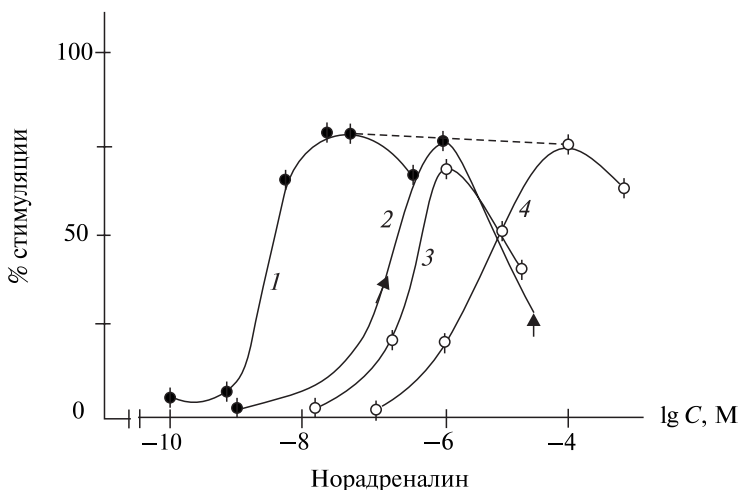


Рис. 7.10. Влияние иохимбина на стимуляцию норадреналином фотофосфорилирования с НАДФ⁺ и ферредоксином в изолированных хлоропластах гороха:
 1 — без иохимбина; 2–4 — на фоне иохимбина 10^{-8} , 10^{-7} и 10^{-6} моль/л соответственно
 (В. В. Рощина, 1991)

Другие биогенные амины, в частности антагонист серотонина хлорпромазин, ингибируют прорастание семян в большей мере без серотонина и в меньшей мере в присутствии серотонина. Прорастание семян редиса тормозится при действии других антагонистов. Стимулируемое серотонином прорастание семян редиса в поставленных опытах также

ингибировалось на 50–60 % по отношению к контролю трифторперазином (10^{-7} – 10^{-5} моль/л).

Отметим, что блокаторы серотониновых рецепторов – хлорпромазин и трифторперазин – являются одновременно ингибиторами КМ. Развертывание листьев пшеницы блокируется и антагонистами серотонина, и блокатором кальмодулина – трифторперазином, но агонист Ca^{2+} -каналов активирует эту реакцию подобно АХ.

Агонист H_2 -типа гистаминового рецептора – 4-метилгистидин (одновременно ингибитор гистидиндекарбоксилазы) – на 30 % снижает рост проростков шпината по сравнению с контролем.

В табл. 7.11 приведен перечень реакций растений на действие агонистов и антагонистов биогенных аминов.

Таблица 7.11

Чувствительные к биогенным аминам реакции растений
(В. В. Рошина, 2010)

Реакция	Влияющий на реакцию агент	
	Агонист	Антагонист
Фотоморфогенез (ускорение цветения)	Норадреналин, адреналин	Пропранолол, L-изопротеренол
Прорастание вегетативных микроспор	Норадреналин, адреналин	6,7-diОНАТН Иохимбин
Прорастание вегетативных микроспор	Серотонин	Кюр-14 Инмекарб
Прорастание пыльцы	Норадреналин, адреналин	6,7-diОНАТН
Прорастание семян	Норадреналин, адреналин	6,7-diОНАТН Иохимбин
Прорастание семян	Серотонин	Кюр-14 Инмекарб
Прорастание семян	Гистамин, 4-метилгистидин	–
Движение цитоплазмы	Норадреналин, адреналин	Изадрин индерал
Мембранный потенциал	Норадреналин, адреналин	Изадрин индерол
Выход из клеток K^+ и Mg^{2+}	Норадреналин, адреналин	Иохимбин

Реакция	Влияющий на реакцию агент	
	Агонист	Антагонист
Выход из хлоропластов Ca ²⁺ и Mg ²⁺	Норадреналин, адреналин	Иохимбин
Фотофосфорилирование	Дофамин, норадреналин, адреналин	Иохимбин 6,7-diOHATN

Примечание. 6,7-diOHATN – 2-амино-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидронафтален гидробромид; Кюр-14 – 5-метил-2-β-этилиндол.

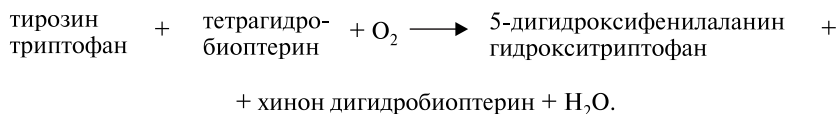
Следовательно, полученные к настоящему времени результаты могут указывать на возможность присутствия рецепторов биогенных аминов в растительных клетках.

Перейдем к рассмотрению других элементов систем регуляции, а именно к ферментам синтеза и катаболизма биогенных аминов.

Ферменты синтеза биогенных аминов. В синтезе биогенных аминов принимают участие гидроксилазы и декарбоксилазы. Гидроксилазы превращают тирозин в 5-гидродоксифенилаланин, а триптофан в 5-гидроксириптофан. Тирозингидроксилаза, выделенная из тканей животных, гидролизует тирозин в присутствии тетрагидробиоптерина и кислорода. Эта гидроксилаза стимулируется ионами двухвалентного железа и имеет ММ от 32 до 220 кДа.

Триптофан-5-гидроксилаза гидроксилирует триптофан сходным образом, с обязательным участием тетрагидробиоптерина и кислорода. Предполагается, что тирозингидроксилаза и триптофангидроксилаза активируются фосфорилированием с участием циклических нуклеотидов. ММ триптофангидроксилазы составляет для нативной формы 220 кДа, а по данным электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия или после обработки трипсином имеет мономерные субъединицы 55,0–60,9 кДа.

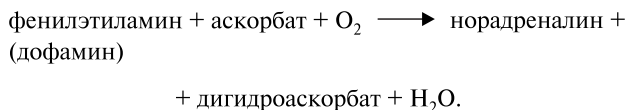
Общий вид гидроксилирования представлен следующим образом:



Возможно, что промежуточной стадией реакции является образование перекиси водорода.

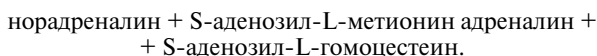
Фермент L-триптофан-5-гидроксилаза, участвующий в превращении триптамина в серотонин, обнаружен во всех органах западно-африканского бобового растения *Griffonia simplicifolia*.

Помимо тирозин- и триптофангидроксилаз существует третий тип гидроксилаз — дофамин-β-гидроксилаза, превращающая фенилэтиламины до норадреналина и адреналина:



Нативный фермент имеет ММ 290 кДа, а субъединицы денатурированного белка — около 75 кДа. Фермент содержит медь в простетической группе.

В синтезе адреналина из норадреналина у животных принимает участие фермент фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза. Реакция протекает по схеме



В растениях также предполагается присутствие подобного фермента.

Еще один фермент тирамингидроксилаза, гидроксилирующий тирамин до дофамина, найден в плодах банана *Musa sapientum*. По своим характеристикам он напоминает дофамин-β-гидроксилазу и имеет оптимум при рН 6,0, реакция протекает в присутствии аскорбата и кислорода.

Упомянутая группа декарбоксилаз включает дигидроксифенилаланиндекарбоксилазу, превращающую дигидроксифенилаланин в дофамин, декарбоксилазу (декарбоксилаза ароматических аминокислот), катализирующую образование серотонина из 5-окситриптофана, и гистидиндекарбоксилазу, декарбоксилирующую гистидин с образованием гистамина. Дигидроксифенилаланиндекарбоксилаза была обнаружена в растении *Cytisus scoparius*.

В процессе синтеза серотонина из триптофана принимают участие два основных фермента — декарбоксилаза ароматических кислот, превращающая 5-окситриптофан в серотонин, или триптофандекарбоксилаза, превращающая триптофан в триптамин. 5-Окситриптофандекарбоксилазная активность обоих ферментов найдена в плодах растений рода *Juglans*. Второй фермент выделен также из побегов томата *Lycopersicon esculentum*.

Участие гистидиндекарбоксилазы в образовании гистамина у растений впервые показана на листьях гороха в 1948 г. Установлено, что гиста-

мин образуется только при введении L-гистидина в живой лист или срезы проростков шпината. Гистидиндекарбоксилазная активность найдена в прорастающих семенах хлопчатника. Гистидиндекарбоксилаза, выделенная из бактерий и млекопитающих, имеет ММ 210 кДа с субъединицами 145 и 66 кДа.

Ферменты катаболизма биогенных аминов. Как уже отмечалось, катаболизм биогенных аминов происходит с участием двух основных ферментов — аминоксидаз и метилтрансфераз. У животных реакции окислительного дезаминирования протекают с участием моноаминоксидаз, а в ряде случаев и диаминоксидаз. Оба типа ферментов являются медьсодержащими белками и катализируют преимущественно распад моноаминов или диаминов.

Основные сведения о моноаминоксидазе получены при изучении физиологии животных.

В зависимости от специфичности к субстрату различают *A*- и *B*-типы моноаминоксидаз. *A*-тип преимущественно использует адреналин, норадреналин и серотонин, тогда как *B*-тип — другие моноамины, в том числе триптамин и метилгистамин. Оба типа фермента в равной мере и с высокой скоростью катализируют дезаминирование и окисление тирамина и дофамина. Скорость реакций с участием моноаминоксидаз зависит от pH.

Этот фермент дезаминирует и окисляет катехоламины до физиологически неактивных продуктов — ванилиновой кислоты, серотонин — до гидроксиндолилуксусной кислоты, а гистамин — до имидазоламиноуксусной кислоты.

По современным представлениям в состав моноаминоксидазы входит медь, соединенная сульфогидрильными группами с белком. Полагают, что медь необходима для активации реакционного центра, в который входят две сульфогидрильные группы, два гистидиновых остатка и один ковалентно связанный флавинадениндинуклеотид. Молекулярная масса субъединиц выделенного из клеток животных фермента составляет 100 кДа, однако встречаются разновидности с ММ 89, 44, 75, 52 кДа.

Основным местом локализации моноаминоксидаз в животной клетке являются митохондрии. У многих растений моноаминоксидазная активность впервые обнаружена более 50 лет назад, однако катехоламины, серотонин, гистамин не являются субстратами для этого фермента. Предшественник серотонина триптамин окисляется и дезаминируется моноаминоксидазой клеток растений, в частности клеток колеоптилей овса *Avena*, до ИУК.

Фермент, использующий в качестве субстратов норадреналин и другие моноамины и участвующий в реакции окислительного дезамини-

рования, был обнаружен в проростках разных видов растений и идентифицирован как диаминооксидаза. Экстракты из *Trifolium pratense* и *T. Repens* были способны в качестве субстратов использовать норадrenalин и другие моноамины. В дальнейшем было показано, что не все диаминооксидазы способны утилизировать биогенные моноамины. Преимущественно они окисляют гистамин и диамины путресцин, кадаверин, спермидин.

В табл. 7.12 приводятся некоторые данные о присутствии у ряда видов растений диаминооксидаз, катализирующих окислительное дезаминирование гистамина и некоторых биогенных моноаминов; они обнаружены у 21 вида из 7 семейств.

Таблица 7.12

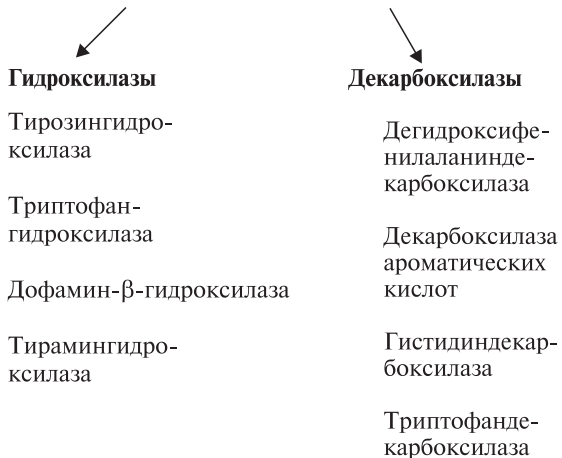
Диаминооксидазы в растениях
(В. В. Рошина, 1991)

Вид	Орган	Субстрат
<i>Artemisia</i>	Листья	Гистамин
<i>Glycine max</i>	Корни, проростки	Гистамин, тираин, триптамин
<i>Pisum sativum</i>	Проростки	Моноамины, в том числе гистамин
<i>Lavandula spica</i>	Листья, стебель	Гистамин
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Листья	Гистамин
<i>Thymus vulgaris</i>	Листья	Гистамин
<i>Rubus</i>	Листья	Гистамин

Активатором фермента служит медь. При взаимодействии с субстратом диаминооксидаза образует желтый комплекс в анаэробных условиях, что, по-видимому, происходит за счет образования хелатного комплекса. Активный центр у различных аминоксидаз представлен или флавинадениндинуклеотидом, или пиридоксальфосфатом. У животных окисление гистамина осуществляет похожий на диаминооксидазу фермент гистаминаза, который содержит в активном центре оба указанных кофермента. Гомогенный препарат диаминооксидазы из этиолированных проростков гороха с молекулярной массой 185 кДа имел на электрофореграмме в полиакридном геле две полосы, одна из которых обладала способностью к окислительному дезаминированию.

Итак, основные ферменты синтеза и катаболизма биогенных аминов можно представить в следующем виде:

ФЕРМЕНТЫ СИНТЕЗА БИОГЕННЫХ АМИНОВ



ФЕРМЕНТЫ КАТАБОЛИЗМА БИОГЕННЫХ АМИНОВ



На основании полученных данных можно заключить, что в растениях присутствуют ферменты синтеза и метаболического превращения биогенных моноаминов, хотя они имеют свои отличительные особенности.

Глава 8

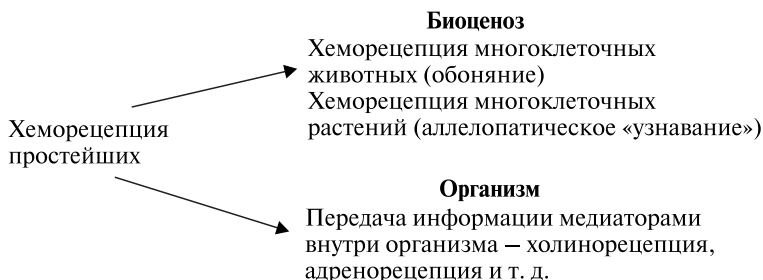
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ БИМЕДИАТОРОВ В РАСТЕНИЯХ

Внутриклеточная регуляция физиологических процессов с использованием метаболитов – химических передатчиков импульса возбуждения от плазмалеммы к органеллам, по-видимому, сначала возникла у одноклеточных организмов, где плазмалемма непосредственно получала сигнал из внешней среды.

Вероятно, что внутриклеточная сигнализация – более древний тип передачи информации по сравнению с межклеточной у многоклеточных организмов. Еще позднее появляется химическая сигнализация между клетками многоклеточных организмов, с помощью которых и предопределяется реакция на химические изменения окружающей среды.

Вершиной эволюции в животном организме стало появление медиаторов – передатчиков информации между клетками многоклеточного организма: АХ и биогенных аминов.

Эволюция этого явления, вероятно, была направлена на развитие информационных систем как в биогеоценозе, так и внутри одного организма. Это видно по следующей схеме (В. В. Рошина, 1991):



Физиологи животных считают, что АХ и биогенные амины выполняют не только медиаторную функцию, но и роль модуляторов внутриклеточного метаболизма, а в ряде случаев и гормонов. Предполагается, что последняя функция особенно важна в безнервных тканях и в донервный период развития организма.

Выделяют медиаторные и немедиаторные функции этих соединений. Обратим внимание на накопленный к настоящему времени экспериментальный материал, касающийся функций биомедиаторов в растениях.

8.1. МЕДИАТОРНЫЕ ФУНКЦИИ

К медиаторным функциям АХ и биогенных аминов относят внутриклеточную и межклеточную химическую и электрическую регуляции, связанные с передачей сигнала, участие их в движении цитоплазмы и в качестве триггеров вторичных посредников.

Пути внутриклеточной трансдукции химического сигнала. Основная роль приемника экзогенных сигналов и его распространения принадлежит плазмалемме, которая регулирует обмен веществ между клеткой и средой. Она играет и роль посредника между внеклеточным окружением и клеточными органеллами. Считают, что большинство клеточных мембран, в том числе мембран митохондрий и хлоропластов, эволюционно произошли от плазмалеммы. Поэтому полагают, что существуют общие принципы химической сигнализации между клетками и органеллами внутри клетки. Получив внешний сигнал, плазмалемма передает импульс возбуждения к мембранам отдельных органелл через химические посредники, возможно, аналогично тому, как это происходит в межклеточных синапсах животных клеток.

В качестве сигнальных веществ в животных клетках функционируют АХ, катехоламины, аминокислоты и другие соединения. Вступая во взаимодействие с клеточными мембранами, химические агенты передают информацию, сигнализируют об изменениях во внешней среде. Воспринимают сигналы мембраны различных органелл — ядер, митохондрий, а у растений — и хлоропластов.

Рассмотрим с позиций унифицированного механизма внутриклеточной химической сигнализации передачу информации от плазмалеммы к органеллам на примере реакции хлоропластов на биомедиаторы. Для этого вспомним симбиотическую теорию происхождения пластид. Хлоропласт — потомок цианобактерий, который был захвачен эукариотической клеткой путем эндоцитоза, что привело к своеобразному симбиозу двух ранее самостоятельных организмов. Естественно, сенсорные спо-

способности хлоропласта должны проявляться внутри клетки подобно реакции одноклеточного организма на внешний химический стимул. Это предположение согласуется со структурой пластиды: хлоропласт окружен двойной мембраной (оболочкой). Внешняя мембрана хлоропласта малопроницаема к различным соединениям, и в нее встроены специальные транспортные белки. Между внешней и внутренней мембранами находится узкое межмембранное пространство. Внутренняя мембрана окружает большую центральную область — строму, содержащую множество растворенных ферментов. В строме находятся тилакоиды, окруженные тилакоидной мембраной. В отличие от тилакоидной мембраны внутренняя мембрана хлоропласта не содержит пигментов и переносчиков электронов. Напротив, тилакоидная мембрана включает в себя реакционные центры, компоненты ЭТЦ и АТФ-синтетазу. Внутренние полости тилакоидов сообщаются между собой и образуют внутренний компартмент хлоропласта, называемый тилакоидным пространством. Таким образом, в хлоропласте существуют три типа мембран — три зоны приема внутриклеточных сигналов.

Показателями приема химических сигналов наружной мембраной хлоропласта, или тилакоидной мембраной, могут быть изменения ионной проницаемости или фотохимической активности соответственно, что позволяет характеризовать хлоропласт как биологическую структуру, подчиняющуюся единым закономерностям химической сигнализации.

О пользе возможного участия АХ и биогенных аминов во внутриклеточной сигнализации в растительной клетке свидетельствуют следующие факты: эффекты экзогенных биомедиаторов проявляются в низких концентрациях (10^{-10} – 10^{-7} М), присутствие эндогенных аминов и АХ, наличие фермента ХЭ и др.

Возникает вопрос, каким образом АХ и биогенные амины могут перемещаться в клетке и проходить через мембраны? Поскольку молекулы этих соединений слишком гидрофильны, то их прохождение через мембраны затруднено.

В клетках животных большинство гормонов и медиаторов заключено в специальные везикулы, для которых характерно наличие клатриновой оболочки. Эти везикулы путем эндо- и экзоцитоза осуществляют внутриклеточный транспорт между органеллами и мембранное рециклирование. Преодолевая мембрану, гормон, медиатор или другой лиганд индуцирует образование везикул. Затем последние «отпочковываются» от мембраны, перемещаются и трансформируются внутри клетки. После слияния с мембраной, к которой везикулы транспортируются, содержимое (биомедиатор) выходит из пузырька и везикула освобождается от клатрина. В этом процессе участвует АТФаза.

Биологический смысл формирования одетых клатрином везикул остается до конца неясным. Предполагают, что клатриновая оболочка предохраняет везикулы от лизиса. Возможно, она способствует сцеплению везикул с цитоскелетом и последующему транспорту в нужном направлении.

Одетые клатрином пузырьки найдены в растительных клетках. Они обнаружены у многих клеток водорослей и высших растений. У высших растений эти везикулы присутствуют в тканях меристемы, активно растущих и дифференцирующихся клетках, в корневых волосках, развивающейся пыльце, дифференцирующейся сосудистой ткани и др. Вероятно, распространение таких везикул имеет всеобщий характер. Предполагают, что существует несколько путей перемещения специфических крупных молекул и низкомолекулярных медиаторов в клатриновых пузырьках. Первый путь — между внутренними компартментами, второй — из внутренних компартментов к плазмалемме и обратно. Транспортные пути везикул показаны на рис. 8.1.

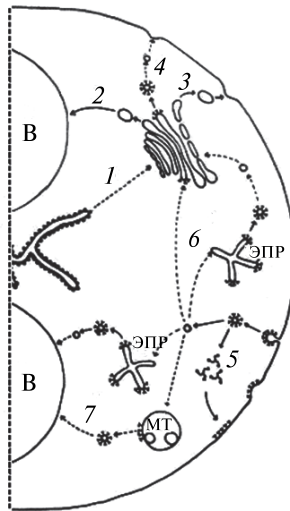


Рис. 8.1. Известные (—) и возможные (---) пути везикулярного транспорта в клетках растений:

- 1 — поток синтезированных макромолекул из шероховатого эндоплазматического ретикулума до цистерн Гольджи; 2 — транспорт запасных белков из пузырьков Гольджи до вакуоли (В); 3 — экзоцитоз веществ в большие везикулы гладкого аппарата Гольджи; 4 — экзоцитоз веществ из аппарата Гольджи в покрытых клатрином везикулах; 5 — эндоцитоз в покрытых клатрином везикулах; 6 — транспорт эндоцитозного вещества к аппарату Гольджи через гладкий ЭПР; 7 — транспорт эндоцитозного вещества в вакуоль через ЭПР или МТ (В. В. Рощина, 1991)

Перемещению клатриновых пузырьков внутри клетки способствует организация цитоскелета, включающая сократительные системы микротрубочек и микрофиламентов. Микрофиламенты, содержащие актин и миозин, найдены в растительных клетках. Наличие микротрубочек установлено не только в цитоплазме, но и внутри хлоропластов. Это дает возможность везикулам перемещаться и внутри пластид. Поскольку в хлоропластах обнаружены АХ и катехоламины, это может также свидетельствовать в пользу внутриклеточной медиации.

В растениях связь между клетками происходит симпластическим путем, по которому не только осуществляется передвижение ионов и метаболитов, но идет передача электрических сигналов и циклоза. Однако нет прямых доказательств об участии АХ и биогенных аминов в межклеточной сигнализации у растений.

Биоэлектрическая реакция и возможная роль биомедиаторов. Одним из путей электрической регуляции АХ и биогенных аминов у животных является управление открыванием ионных каналов, приводящим к изменению мембранных потенциалов вплоть до возникновения распространяющихся ПД.

Распространение по клеткам животных волны возбуждения в виде электрического импульса – хорошо известное явление. У растений также существует подобное явление. Хотя скорость распространения волны возбуждения у растений значительно ниже, чем у животных (см. гл. 2). АХ и биогенные амины играют важную роль в распространении волны возбуждения. Указанные соединения оказывают влияние в концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М на электрические параметры и ионную проницаемость мембран растительных клеток в покое. В интервале приведенных концентраций происходила деполяризация мембраны. Обработка клетки АХ приводила к увеличению коэффициента $\alpha = P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$; таким образом, отмечается падение селективности мембраны. Аналогичная биоэлектрическая реакция характерна для клеток корней гороха. АХ (10^{-5} М) способен также вызывать увеличение калиевой и протонной проводимостей плазмалеммы. В концентрации 10^{-6} М АХ индуцировал Ca^{2+} -зависимое набухание клеток мезофилла листа этиолированных проростков пшеницы.

АХ оказывал влияние на характеристики ПД в интактных растительных клетках. Отмечено пролонгирование нисходящей фазы ПД на плазматической мембране клеток водорослей *Chara corallina* и *Nitellopsis obtuse*.

В настоящее время исследователи пытаются выявить влияние биомедиаторов на функционирование отдельных каналов мембран растительных клеток. Так, показано, что хлорный канал тонопласта клеток *Chara corallina* (проводимость 45 пСм) отвечал на действие АХ. Эффект АХ изменился в присутствии никотина: вероятность открытого состояния канала

увеличивалось от 0,05 в присутствии АХ до 0,3 при добавлении в раствор никотина. Предполагается, что этот канал ацетилаktivируемый и отвечает за передачу АХ-сигнала.

Биогенные амины (10^{-6} – 10^{-3} М) вызывали также падение мембранного потенциала в клетках харовых водорослей и корней высших растений. Адреналин оказывал заметное влияние на биоэлектрические процессы в проводящей системе тыквы. Изменения проницаемости плазмалеммы растительных клеток под действием катехоламинов связывают со сдвигом Ca^{2+} -проницаемости. В клетках корнеплода свеклы серотонин угнетает активный транспорт Na^{+} через плазмалемму.

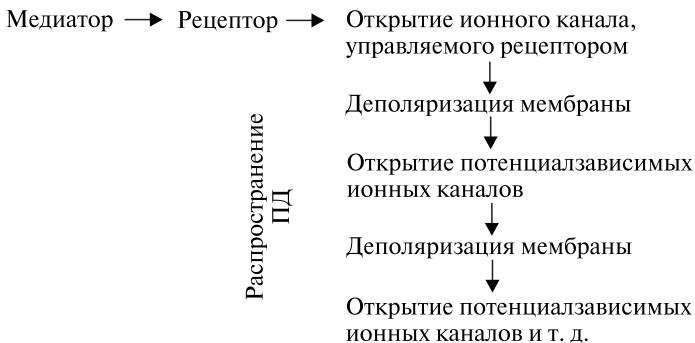
Быстрое складывание листьев и листовых черешков обусловлено передачей электрического сигнала по растению в виде волны возбуждения (ПД или ВП). ПД в животных клетках и тканях в ряде случаев сопровождается выходом АХ и биогенных аминов в синаптическую щель. Однако в проводящих органах растений не обнаружено изменения содержания эндогенного АХ при возбуждении.

Считают, что более вероятным является участие норадреналина в двигательных реакциях растений, поскольку его содержание в подушечках больше, чем в листовой пластинке.

АХ и биогенные амины в низких концентрациях (10^{-9} – 10^{-7} М) модифицировали свойства мембран хлоропластов, влияя на потоки ионов.

Известно, что существуют два типа ионных каналов – управляемые медиаторами (рецепторные) и потенциалом (потенциалзависимые). Взаимодействие медиатора с рецептором приводит к открыванию ионного канала, управляемого рецептором.

Это, в свою очередь, вызывает падение мембранного потенциала на данном участке мембраны ниже пороговой величины и открывание потенциалзависимых ионных каналов. Деполяризация, вызванная открытием этих каналов, приводит к открыванию новых потенциалзависимых каналов и т. д. Так происходит распространение ПД:



В настоящее время один из механизмов действия медиаторов в животных и растительных клетках основывается на регуляции ионных потоков. Изменения мембранных потенциалов обусловлены сдвигами ионной проницаемости мембран путем открытия или закрытия ионных каналов. В работах с алейроновыми клетками ячменя идентифицированы ионные каналы, зависящие от циклических нуклеотидов. В структуре каналов обнаружены компоненты, соединяющие циклические нуклеотиды и КМ.

С функционированием ионных каналов связаны механизмы возникновения и распространения ПД у животных и растительных клеток. В животных клетках — это Na^+/K^+ -каналы, контролируемые АХ, и Ca^{2+} -каналы, чаще зависящие от биогенных аминов. В растительных клетках возникновение и распространение ПД связывается с кальциевыми, калиевыми и хлорными каналами.

Предположение о передаче внешнего раздражения от плазмалеммы к другим органеллам и между органеллами с участием медиаторов представляется вполне вероятным.

Вспомним, что ПП клетки определяется разностью концентраций ионов в наружной среде и внутри клетки, а ПП любой органеллы — разностью концентраций между цитоплазмой и внутренним содержимым органеллы. В величину ПП могут вносить вклад и электрогенные системы транспорта, а также поверхностный потенциал, обусловленный заряженными группами на мембране. Величина мембранного потенциала растительных клеток в большинстве случаев составляет от -100 до -250 мВ, оболочки хлоропластов клетки листа *Peperomia metallica* — порядка -60 мВ в темноте и -80 мВ на свету, а митохондрий, например клеток листа пшеницы, приблизительно -130 и -160 мВ в темноте и на свету соответственно. Следовательно, отрицательное значение РЭП способствует взаимодействию катионов, в том числе АХ и биогенных аминов с плазмалеммой и мембранами органелл.

Как уже отмечалось, под влиянием экзогенного АХ наблюдается выход в среду ионов Na^+ и K^+ из интактных хлоропластов. Внутри хлоропластов гороха концентрация этих ионов выше, чем в цитоплазме, но оболочка пластиды непроницаема для них. Открывание ионных каналов под действием АХ, по-видимому, способствует пассивному транспорту ряда ионов по градиенту электрохимического потенциала. Однако протон в этом случае по-разному поступает в отдельные компартменты органелл.

Если сравнить рН цитоплазмы (7,0), стромы хлоропласта (7,8–8,0), тилакоида (5,9), то окажется, что в интактных пластидах движение протонов идет по градиенту концентраций, а в тилакоидах против него (рассчитать электрохимический градиент для тилакоидной мембраны не представляется возможным), скорее всего, в антипорте с K^+ наружу.

На примере хлоропласта видно, что АХ, находящийся в цитоплазме и строме пластиды, может вызвать открывание ионных каналов и уменьшение мембранного потенциала, который при распространении по мембране может представлять собой внутриклеточный ПД. Аналогичное явление, вызванное открыванием Ca^{2+} -каналов, при действии катехоламинов и серотонина также выявлено в хлоропластах.

Возможно, гипотеза об участии медиаторов в механизме возбуждения находит некое подтверждение при изучении импульсной электрической активности у высших растений. Предположение о том, что деполяризация способна приводить к высвобождению возбуждающей раневой субстанции при распространении ВП, может соответствовать реальной ситуации.

Циклоз и биомедиаторы. Биомедиаторы участвуют в двигательных реакциях животных, контролируемых холинэргической и адренэргической системами. Эти движения связаны с их влиянием на сократительные белки. Движение цитоплазмы в растениях также связано с функционированием сократительных белков в клетке (см. гл. 3). Более того, сократительные элементы (фибриллы, филаменты) растительных клеток оказались чувствительными к действию биомедиаторов.

Подтверждением действия биомедиаторов на сократительные структуры являются опыты, в которых показана, как отмечалось, чувствительность протопластов отдельных клеток корней *Phaseolis* к экзогенному АХ. Сокращение протопластов, индуцируемое АХ, подавлялось его антагонистами атропином и мускарином.

Биомедиаторы – возможные триггеры систем вторичных посредников. Обязательным условием работы систем регуляции является восприятие (рецепция или перцепция), передача и преобразование (трансдукция) сигнала, а также формирование биологического ответа клетки при взаимодействии медиатора со специальным рецептором.

Конформационные изменения рецепторов, вызванные взаимодействием с медиаторами или гормонами, реализуются либо в клетке путем синтеза вторичных посредников – цАМФ, цГМФ, инозитолтрифосфата, либо изменением проницаемости мембран к ионам Ca^{2+} , которые также выполняют функцию вторичных посредников.

Синтез цАМФ и цГМФ из АТФ и ГТФ, как указывалось, осуществляется в клетке с помощью ферментов циклаз – АЦ или ГЦ. Для того чтобы циклические нуклеотиды могли выполнять роль внутриклеточных медиаторов, их концентрация (обычно $< 10^{-6}$ М) в клетке должна строго контролироваться.

Как показывают многочисленные исследования, постоянная активация АЦ не только не нужна, но и небезопасна для клетки. Так, течение одного из особо опасных заболеваний – холеры связано с необратимой ак-

тивацией АЦ. Для нормальной жизнедеятельности клетки ингибирование АЦ может стать не менее важным моментом, чем ее активация. Поэтому чрезмерное накопление цАМФ, вызываемое активацией АЦ, предотвращается с помощью ФДЭ циклических нуклеотидов, которые катализируют гидролитическое превращение цАМФ в нециклический АМФ. Реакция расщепления протекает в присутствии Mg^{2+} , оптимум pH составляет 7,5–8,5. Показано, что активность фермента модулируется такими гормонами, как адреналин, простагландины и др. Механизм действия эффектора окончательно не выяснен, скорее всего, он является опосредованным, поскольку зависит от присутствия Ca^{2+} , состава фосфолипидов и других соединений.

Воздействие на фермент позволяет изменять внутриклеточную концентрацию цАМФ, поскольку имеются ингибиторы ФДЭ (например, метилксантины – кофеин и теофиллин).

Механизм сопряжения рецептора с синтезом циклических нуклеотидов лучше всего изучен для аденилатциклазной системы, которая с участием тМАЦ представлена на рис. 8.2.

Этот процесс происходит следующим образом. Рецептор, воспринимающий сигнальные молекулы (медиаторы), находится на внешней стороне мембраны, а АЦ – на внутренней. Такое расположение создает условия для передачи внешнего сигнала внутрь клетки, где при участии

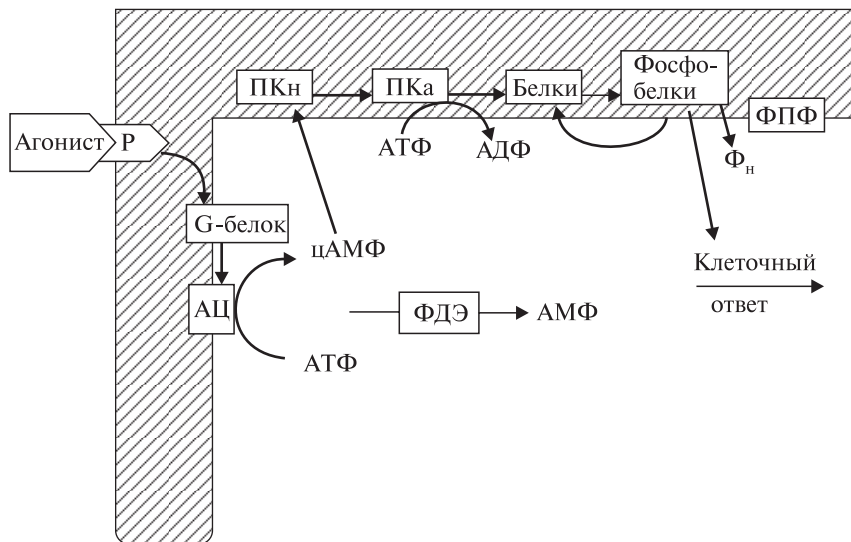


Рис. 8.2. Аденилатный путь регуляции внутриклеточных процессов (В. В. Рошина, 1991)

вторичных посредников осуществляется регуляция внутриклеточных процессов. АЦ активируется через разнообразные рецепторы не менее чем шестью медиаторами и гормонами, в том числе адреналином, норадреналином, дофамином, серотонином и гистамином.

АХ может также включать и гуанилатциклазную систему. Активация АЦ осуществляется через целую цепь биохимических реакций, начиная с конформационных изменений рецептора, который в результате взаимодействия с медиатором приобретает способность взаимодействовать с регуляторным белком (G-белком), связывающим ГТФ. G-белки играют центральную роль в механизмах передачи сигнала с поверхности внутрь клеток.

Взаимодействие медиатора с рецептором индуцирует сопряжение в аденилатциклазной системе, в результате чего в клетках изменяется содержание цАМФ — универсального вторичного посредника.

Вторичные посредники не только способствуют передаче внешнего сигнала во внутриклеточный, но и обеспечивают значительное его усиление. Каждая молекула рецептора, присоединившая сигнальную молекулу, активирует много молекул АЦ, которые, в свою очередь, катализируют образование множества молекул цАМФ. В итоге по всей цепи от рецептора до клеточной реакции происходит усиление сигнала в 10^7 – 10^8 раз. Таким образом, несколько сигнальных молекул эффектора могут изменять функциональную или метаболическую активность всей клетки.

Циклический АМФ регулирует внутриклеточные реакции всех изученных прокариотических и эукариотических клеток. Действие его основано на активации специфических ферментов цАМФ-зависимых протеинкиназ, которые фосфорилируют многие белки, в частности белки рибосом, ряда ферментов, транспортные мембранные белки и др. Фосфорилирование белков есть способ их активации. В неактивное состояние они возвращаются путем дефосфорилирования с помощью ФПФ.

Гормоны и медиаторы могут проявлять свое действие не только через синтез цАМФ, но и через других внутриклеточных посредников. Для некоторых гормонов животных вторичным посредником является цГМФ. Его концентрация в 10 раз меньше, чем цАМФ. Подобно цАМФ, цГМФ действует главным образом через активацию соответствующих протеинкиназ.

Кальций также участвует во внутриклеточной регуляции в комбинации с двумя другими вторичными посредниками (рис. 8.3) — ИФ₃ и ДАГ.

Эффектор связывается с рецептором, который через ГТФ-связывающие белки активирует ФДЭ ФИФ₂. При расщеплении ФИФ₂ образуется ИФ₃ и ДАГ.

ИФ₃ растворим в воде, поэтому он диффундирует в цитоплазму, где вызывает высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточного депо — ЭПР.

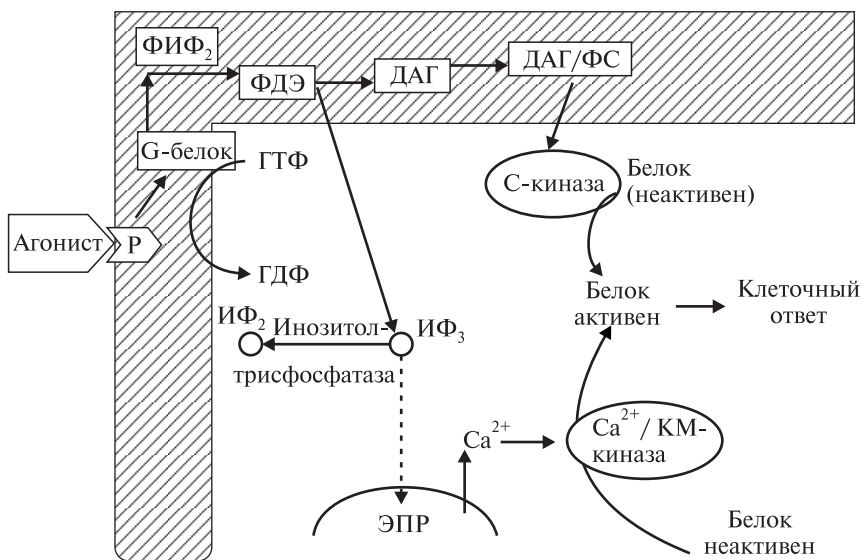


Рис. 8.3. Схема регуляции с участием кальция (Ф. Г. Каримова, О. И. Тарчевская, 1990)

Высвобожденный кальций активирует кальмодулинзависимую протеинкиназу (Ca^{2+} /КМ-киназа), которая фосфорилирует белки-мишени, вызывая клеточный ответ.

ДАГ, будучи гидрофобным, остается в мембране, где активирует Ca^{2+} -фосфолипидзависимую протеинкиназу, которая, в свою очередь, фосфорилирует другие белки, вызывая клеточный ответ. Таким образом, обе ветви фосфоинозитидного пути ведут к фосфорилированию двух различных наборов белков, что приводит к реализации клеточного ответа.

Происходит ли подобная регуляция в растениях? Для ответа на этот вопрос вспомним еще раз основные сведения о компонентах регуляторных систем и их функциях в растениях. Так, в растениях идентифицированы АХ и ряд биогенных аминов, которые оказывают влияние на физиологические функции.

О том, что циклические нуклеотиды и в растениях могут выполнять функцию вторичных посредников, свидетельствуют полученные к настоящему времени результаты. Так, экзогенный АХ (10^{-11} моль/л) и цАМФ (10^{-9} – 10^{-4} моль/л) снижали содержание АТФ в бобах фасоли, которое происходило, вероятно, в результате стимуляции АЦ. Напротив, блокатор холинорецептора атропин (10^{-4} М) резко повышал количество АТФ,

так как, по-видимому, не происходило образования цАМФ. В этом случае атропин нарушал сопряжение холинорецептора с АЦ. Действительно, в растениях выявлен такой фермент, как АЦ. Он обнаружен у растений в плазматической мембране, фракциях хлоропластов, ядер, митохондрий, тонопласте. Можно предполагать присутствие и рецепторов, связанных с АЦ. G-белки, играющие важную роль в передаче сигнала у животных, обнаружены в плазмалемме клеток высших растений (например, клетках корневой системы).

В растительных клетках осуществляется фосфорилирование различных белков, в основном ферментов, управляющих мембранными процессами, такими, например, как открывание ионных каналов на плазмалемме, активирующих работу реакционных центров фотосистем и компонентов электрон-транспортной цепи и т. д. Протеинкиназная активность в растениях найдена в плазмалемме, тонопласте, хлоропластах. В пластидах протеинкиназная активность обнаруживается в оболочке и тилакоидах. ПК участвует в фосфорилировании реакционных центров фотосистем, АТФ-синтазы, цитохромов b_6 и f .

Было доказано, что цАМФ в концентрациях 10^{-6} – 10^{-5} моль/л участвует в эндогенном фотофосфорилировании белков диализованного кокосового молока.

Избыток цАМФ может разрушаться ФДЭ, которая обнаружена у растений разных видов (горох, картофель, соевые бобы, артишок и т. д.). В тканях животных ФДЭ находится в свободном и связанном состояниях в плазматических, ядерных, митохондриальных мембранах, но в основном в цитозоле. Для высших растений (проростки гороха) и микроорганизмов (пекарские дрожжи) также показано двойственное распределение фермента – в цитозоле и во фракциях органелл и плазмалеммы.

В растениях установлено наличие цГМФ, обнаружены компоненты инозитолфосфатной системы вторичных посредников – фосфатидилинозитолфосфодиэстераза, или просто фосфолипаза С, которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат с образованием ДАГ и ИФ. Получено прямое доказательство влияния в микромолекулярных концентрациях инозитол-1,4,5-трифосфата на выделение Ca^{2+} в цитоплазму из внутриклеточного депо.

Как уже отмечалось, кальций участвует в регуляции клеточного метаболизма посредством локального изменения концентрации его свободных ионов в цитоплазме.

В растениях установлено наличие инозитолов, один из которых (инозитол-1,4,5-трифосфат) мобилизует Ca^{2+} из внутриклеточного депо. Например, показано, что ИФ₃ вызывает выход Ca^{2+} из микросом гипокоттиля тыквы. В опытах с суспензионной культурой выявлено изменение

количества фосфатидилионизитола-4,5-дифосфата (ФИФ₂) в зависимости от фазы клеточного цикла, что свидетельствует о возможной регуляции пролиферации клеток высших растений продуктами превращения фосфоинозитидов.

Весомым доказательством функционирования Ca²⁺ в качестве вторичного посредника стало обнаружение в растениях Ca²⁺-связывающего белка КМ и его почти полная идентичность с таковым в клетках животных. Ca²⁺, связываясь с КМ, регулирует активность в растениях ряда ферментов: ПК плазматических мембран, растворимая цитоплазматическая НАД⁺-оксиредуктаза, ферментов, принимающих участие в разложении воды при фотолизе, деполяризацию мембран, секрецию материалов клеточной стенки, движение хлоропластов и листьев, рост, индуцированный гормонами, и т. д.

Информация с помощью ионов кальция, как отмечалось, передается волновым способом. Кальциевые волны и кальциевые осцилляции, инициируемые в определенных участках клеток, являются основой кальциевой сигнализации в растениях.

Зашифрованная информация для достижения нужных белков-мишеней, определяющих ответ на стимул, осуществляется путем образования комплексов кальция со связывающими белками КМ, Ca²⁺-зависимыми протеинкиназами.

Передача Ca²⁺-сигнала на белки-мишени может происходить как с участием первичных сенсоров (КМ, протеинкиназы), так и по более длинным каскадным путям. Белками-мишенями являются Ca²⁺-каналы, Ca²⁺-АТФазы и другие ионные каналы и помпы. Мишенями для сигналов, передаваемых по различным Ca²⁺-зависимым сигнальным путям, могут быть отдельные ферментные системы, белки цитоскелета, транскрипционные белки и др. (рис. 8.4).

Возможность индукции Ca²⁺-обмена как мессенджера с участием КМ можно предположить в растительной клетке и на уровне органелл, с которыми связываются биогенные амины. Например, норадреналин, адреналин и серотонин стимулируют выход ионов кальция из интактных хлоропластов.

Поскольку компоненты холинэргической и адренэргической систем регуляции обнаружены в растительных клетках и даже отдельных органеллах, то можно предположить существование механизма подобного животным клеткам и тканям: включение АХ и биогенными аминами синтеза цАМФ, цГМФ и процесса обратимого освобождения – связывания ионов Ca²⁺. При этом принцип сигнализации с участием биомедиаторов и вторичных посредников, таким образом, может быть распространен и

на внутриклеточные органеллы. Мы отмечали, что клеточные органеллы, в частности хлоропласты, произошли от самостоятельных организмов со сложной внутренней организацией и сохранили ее будучи включенными в эукариотическую клетку. В плазмалемме, тонопласте и мембранах многих органелл обнаружены АЦ, ГЦ и ПК.

При передаче внешнего сигнала выделяют три этапа внутриклеточного сигналинга:

- 1) внешний фактор → плазмалемма → вторичные посредники;
- 2) вторичные посредники → органеллы → медиаторы внутри органеллы;
- 3) медиаторы внутри органелл → внутренние структуры органеллы.

Попытаемся представить эти этапы на основании полученных для растений закономерностей.

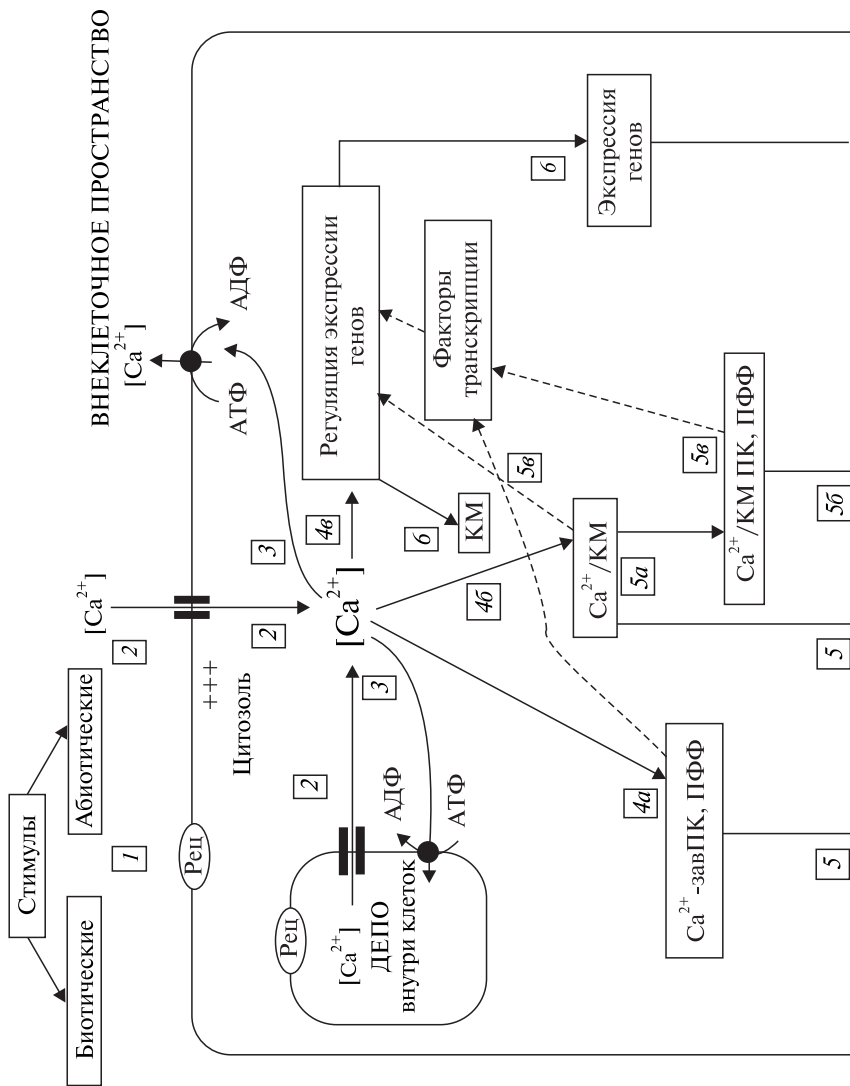
В животных клетках при взаимодействии АХ с рецепторами происходит освобождение Ca^{2+} у мест связывания. По аналогии для растений в рассматриваемом опыте таким местом должна быть внутренняя поверхность плазмодесм. Действительно, при тепловом стрессе наблюдалось увеличение концентрации АХ и Ca^{2+} в эндодермальных клетках мезокотила между стелой и корой.

Исходя из имеющихся результатов была выдвинута следующая концепция межклеточной холинэргической системы регуляции в мезокотиле проростков кукурузы (рис. 8.5):

- АХ находится на границе кора/стела;
- экзогенные стимулы вызывают изменения мембранного потенциала;
- клетки стелы с внутренней стороны эндодермы действуют подобно пресинаптическим клеткам и освобождают кальций;
- освободившийся кальций служит триггером для выхода АХ из пузырька вблизи пресинаптической клетки;
- распространяющийся потенциал открывает клапан (ворота) в плазмодесменном канале;
- вышедший АХ диффундирует из стелы в кору через эндодерму и связывается с рецептором АХ в постсинаптической клетке;
- освободившийся из мест связывания АХ гидролизует АХЭ до холина и ацетата, что и приводит систему в первоначальное состояние.

АХЭ может действовать как регулятор движения веществ через плазмодесмы.

Исследовалось и возможное участие G-белков, ПК и ПФФ в передаче сигнала внутрь клетки при стимулирующем действии адреналина на водонагнетающую деятельность корня (экссудация) проростков кукурузы.



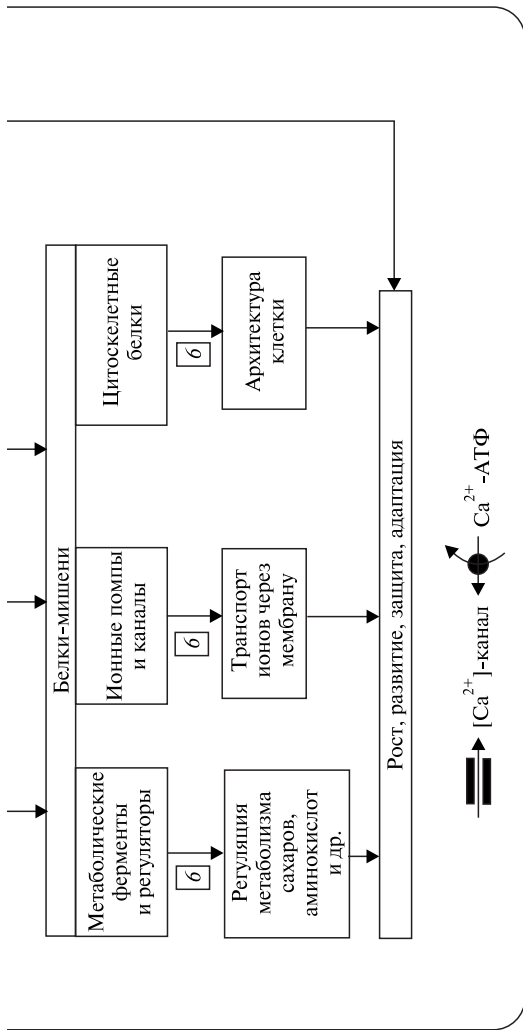


Рис. 8.4. Общая схема путей передачи Ca^{2+} -сигнала на мишени и ответная реакция растительной клетки на разные стимулы: Рец. – рецепторы на плазмалемме и эндомембранах; $[\text{Ca}^{2+}]$ – концентрация Ca^{2+} ; КМ и $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ – кальмодулин и его комплекс с Ca^{2+} ; Ca^{2+} -завПК, ПФФ – Ca^{2+} -зависимые ПК и ПФФ; $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ ПК, ПФФ – кальций и кальмодулинзависимая протеинкиназа, ПФФ; $(+++)$ – деполаризация мембран; I – δ – последовательность событий при восприятии стимула, возникновении Ca^{2+} -сигнала и путей его передачи; I – рецепция различных абиотических (свет, холод, температура, гипоксия, засуха, ветер, механические воздействия) и биотических (фитогормоны, патогены, симбионты и др.) стимулов, изменение мембранного потенциала $(+++)$ и активация Ca^{2+} -каналов; 2 – вход Ca^{2+} через каналы в цитозоль из внешней среды и внутриклеточных депо и кратковременное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цитр}}$; 3 – выкачивание Ca^{2+} благодаря работе Ca^{2+} -помп, окончание переходного состояния $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цитр}}$; 4 – связывание Ca^{2+} с первичными сенсорами ($4a$ – Ca^{2+} -завПК и ПФФ; $4b$ – образование комплекса $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$; $4c$ – индукция синтеза КМ); 5 – активация белков-мишеней ($5a$, $5b$ – при каскадной передаче через активацию $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ ПК или ПФФ; $5c$ – регуляция экспрессии генов через $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ -комплекс или с участием $\text{Ca}^{2+}/\text{КМ}$ ПФФ); 6 – общие ответные реакции на стимул (быстрые или более медленные при включении генома)

(Н. Д. АLEXИНА [и др.], 2005)

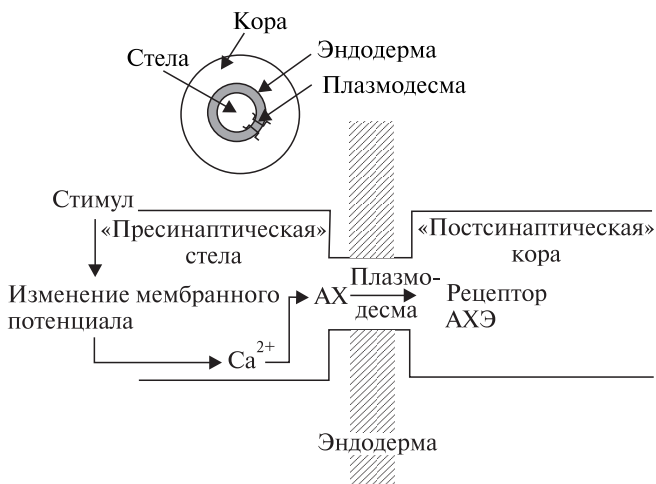
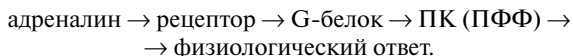


Рис. 8.5. Схематическое представление роли холинэргической системы в регуляции проводимости между стелой и корой мезокотилля проростков кукурузы (А. Третун, R. E. Kendrick, 1991)

Результаты опытов по влиянию ГТФ — стимулятора ГТФ-связывающей активности G-белков и ингибитора этой активности, а также ингибиторов активности ПФФ и ПК укладываются в приводимую нами выше схему:



Детализация наблюдаемых закономерностей проведена на рис. 8.6.

Адреналин в тканях коры связывается с рецепторами на внешней стороне плазматической мембраны. Связавшись с α - и β -рецепторами, приводит к передаче сигнала на внутреннюю сторону мембраны (G-белки), активирует АЦ, ГЦ и запускает синтез вторичных посредников (цАМФ, цГМФ, Ca^{2+}). Кроме передачи сигнала через вторичные посредники, адреналин может влиять на ионные каналы, изменяя проницаемость мембраны к ионам Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . В результате изменения ионной проницаемости происходит деполяризация мембранного потенциала, возникновение распространяющейся волны ПД и наблюдается суммарный физиологический ответ.

Мы отмечали, что клеточные органеллы, в частности хлоропласты, произошли от самостоятельных организмов со сложной внутренней организацией и сохранили ее будучи включенными в эукариотическую клетку.

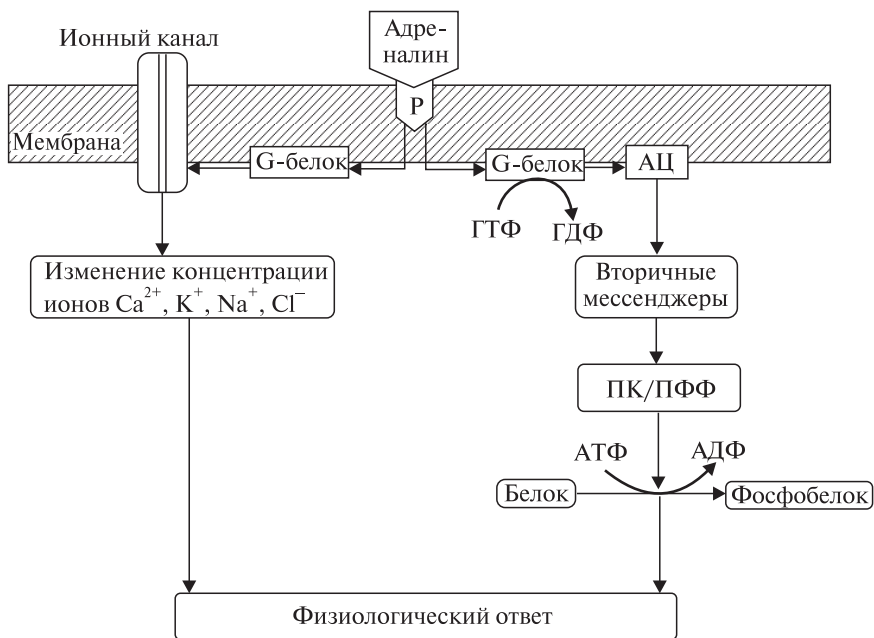


Рис.8.6. Схема изменения параметров воднонагнетающей деятельности корневой системы этиолированных проростков *Zea mays* при действии адреналина (Н. В. Жуковская, 2009)

Внутриклеточные посредники (медиаторы) транспортируются в секреторных везикулах. Получив сигнал от плазмалеммы или других органелл, пузырьки (везикулы) встраиваются или сливаются с поверхностными мембранами органелл, и происходит высвобождение медиатора. Затем медиатор реагирует с доступными ему рецепторами, в результате включаются системы вторичных посредников и происходит передача сигнала от плазмалеммы к хлоропластам (рис. 8.7).

Биомедиаторы, находящиеся в цитоплазме, могут взаимодействовать с предполагаемыми рецепторами наружной мембраны хлоропласта (других пластид), в результате чего происходят изменения Na^+/K^+ - (АХ) и Ca^{2+}/Mg^{2+} - (катехоламины, серотонин) проницаемостей и включение систем вторичных посредников путем активации АЦ на внутренней стороне мембраны оболочки хлоропласта. Внутри хлоропласта АХ и биогенные амины могут связываться с рецепторами мембран тилакоидов, что также вызывает включение систем вторичных посредников (рис. 8.8).

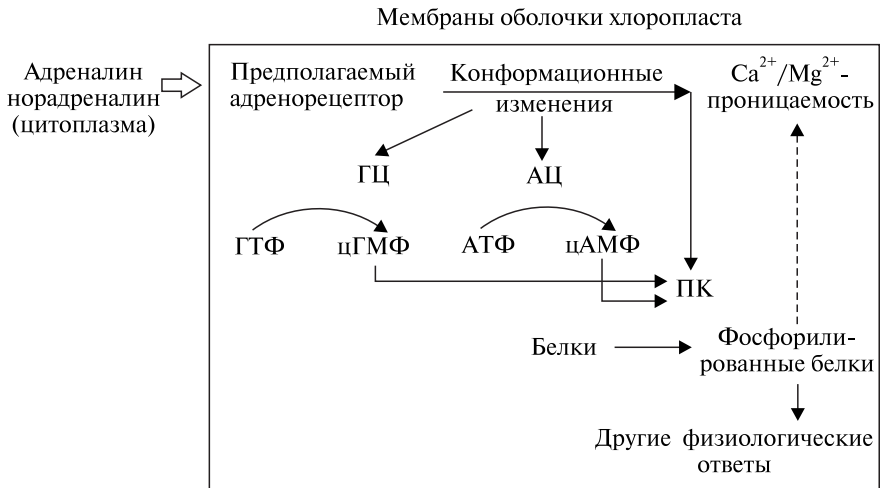
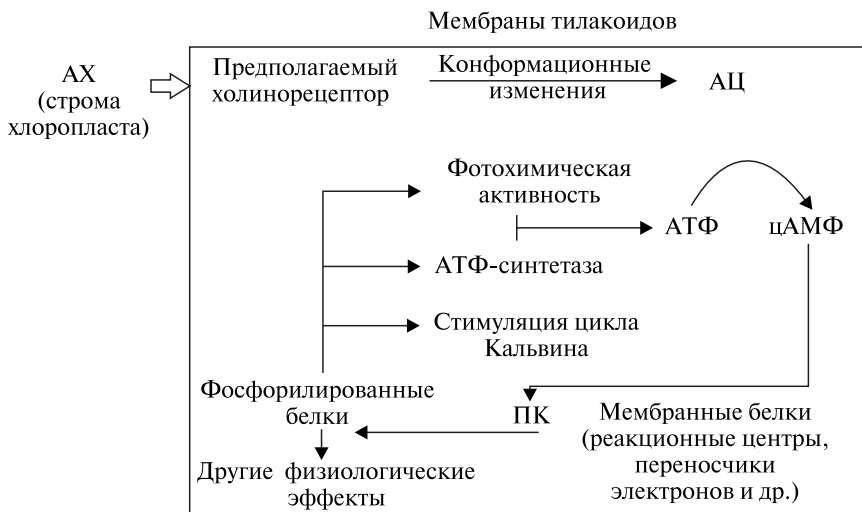
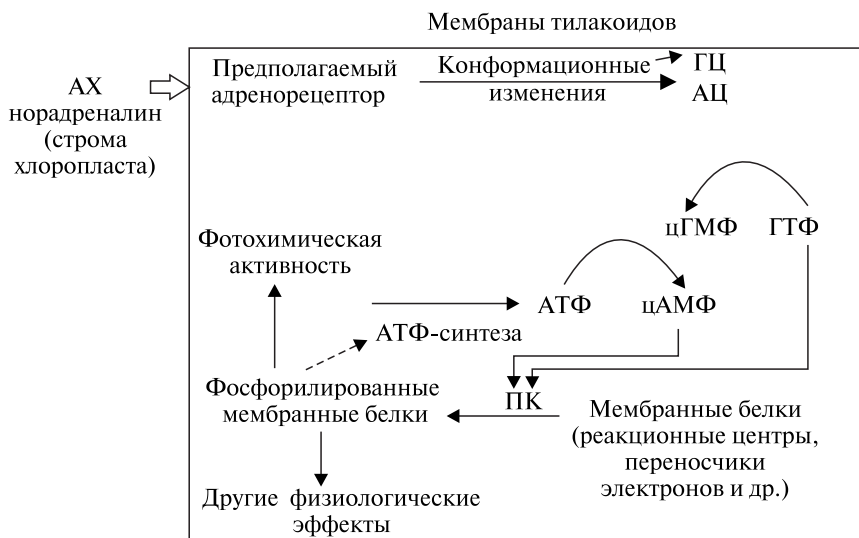


Рис. 8.7. Схема предполагаемого взаимодействия ацетилхолина (а) и катехоламинов (б) с мембраной оболочки хлоропласта (В. В. Рощина, 1991)



а



б

Рис. 8.8. Схема предполагаемого взаимодействия ацетилхолина (а) и катехоламинов (б) с мембраной тилакоидов (В. В. Рощина, 1991)

Еще раз подчеркнем, что элементы подобных схем у растений основываются на экспериментальных данных — присутствие биомедиаторов и предполагаемых рецепторов, наличие ферментов синтеза и катаболизма, стимуляция низкими концентрациями ряда физиолого-биохимических процессов и т. д.

8.2. НЕМЕДИАТОРНЫЕ ФУНКЦИИ

К немедиаторным функциям относят регуляцию АХ и биогенными аминами энергетических и метаболических функций, ростовых и морфогенетических процессов, а также их протекторные свойства.

Энергетические и метаболические процессы. АХ и биогенные амины способны регулировать в клетках животных энергетические и метаболические реакции.

В растительных клетках АХ, адреналин, дофамин и норадреналин стимулируют фосфорилирование в хлоропластах. Адреналин и АХ стимулируют также субстратное и окислительное фосфорилирование в выделенных из клеток животных митохондриях (табл. 8.1).

Таблица 8.1

Стимуляция фосфорилирования (в % от контроля)
при действии биомедиаторов
(В. В. Рощина, 1991)

Объект	Органелла	Биомедиатор	Синтез АТФ	Вид фосфорилирования
<i>Pisum sativum</i>	Хлоропласт	АХ	50	ФФ
		Адреналин	50	ФФ
		Дофамин	30	ФФ
		Норадреналин	50	ФФ
<i>Phaseolus aures</i>	Митохондрии из клеток корня	АХ	0	
<i>Ratus</i>	Митохондрии	АХ	36–86	СФ
		Адреналин	23–30	ОФ

Примечание. ФФ — фото-, СФ — субстратное и ОФ — окислительное фосфорилирование.

Образование АТФ является источником энергии для многих клеточных реакций, в том числе и для активного транспорта ионов через биологические мембраны, а также субстратом для синтеза вторичного посредника — цАМФ.

Функция АХ и биогенных аминов состоит в стимуляции энергетических процессов. В норме они часто служат катионами для поддержания физиологического рН.

В высоких концентрациях дофамин, адреналин и норадреналин принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях хлоропластов. Судя по стандартным потенциалам катехоламинов и переносчиков электронов (табл. 8.2), а также доноров и акцепторов электронов искусственной природы, дофамин может быть наиболее эффективным донором в цепи переноса электронов между фотосистемами. В паре с аскорбатом он способен восстанавливать цитохром *f* и пластоцианин.

Норадреналин и адреналин из-за одинакового потенциала с указанными переносчиками электронов не являются для них эффективными донорами, хотя и восстанавливают цитохром *f* и пластоцианин в модельных опытах на очищенных белках.

Таблица 8.2

Стандартные потенциалы катехоламинов и известных доноров и акцепторов электронов
(В. В. Рощина, 1991)

Соединение	Форма	Величина потенциала, В
Адреналин	Восст./окисл.	+0,39
Дофамин	Восст./окисл.	+0,10
Аскорбиновая кислота/дигидроаскорбиновая кислота	—	-0,054
НАДФ ⁺ / НАДФН	—	-0,32
Феррицианид	Восст./окисл.	+0,42
2,6-Дихлорфенолиндофенол	—	+0,217
Цитохром <i>f</i>	Окисл./восст.	+0,365
Пластоцианин	Окисл./восст.	+0,375

АХ и биогенные амины могут регулировать активность ферментов или включаться в метаболизм как субстраты. Например, гистамин ингибирует лизоцимную активность латекса *Asclepias syriaca*, норадреналин на 10–20 % угнетает активность рибулезодифосфаткарбоксилазы гороха. Регуляция активности ферментов может проявляться через синтез вторичных мессенджеров цАМФ и цГМФ, которые фосфорилируют важнейшие белки клетки.

На основании того, что у некоторых видов биогенные амины содержатся в составе секрета и служат средством защиты или нападения,

роль медиаторов в метаболизме животных и растений ранее рассматривалась как вероятный конечный продукт обмена. Однако идентификация в растениях ХЭ и холиноксидазы позволяет предположить активное участие АХ в метаболизме как субстрата для образования холина. Он быстро включается в биосинтез бетаина и синапихолина. Катехоламины, серотонин и гистамин еще более активно участвуют в метаболизме, являясь субстратом для многих реакций биосинтеза алкалоидов у видоспецифичных растений.

У многих растений в стрессовых условиях наряду с алкалоидами образуются весьма токсичные амины. Катехоламины служат субстратами для образования фенольных соединений, таких как ванилиновая кислота, ванилиновый альдегид и диоксиминдальная кислота. Примечательно, что в некоторых растениях из дофамина образуются алкалоиды, которые являются блокаторами холинрецептора или агонистами АХ, а при конденсации с серотином получают алкалоиды – адреноблокаторы. Среди таких веществ следует отметить атропин, ареколин, *d*-тубокурарин, капсаицин, резерпин и т. д. Есть и алкалоиды, обладающие антихолинэстеразным действием – эзерин или физостигмин. Участие катехоламинов в синтезе таких продуктов является примером обратной связи; в этом случае стимуляторы процессов – предшественники образования ингибиторов тех же реакций.

Ростовые и морфогенетические реакции. Известно, что адреналин, норадреналин и серотонин у животных могут выступать в качестве гормонов. В этом случае, синтезируясь в одном органе, они перемещаются по организму к клеткам-мишеням, где и выполняют гормональные функции; в качестве медиаторов они действуют там же, где синтезируются.

Стимуляция или угнетение роста растений происходят только при высоких концентрациях АХ (10^{-4} – 10^{-3} М). Серотонин также влияет на процессы роста.

Серотонин и гистамин образуются в значительных количествах в семенах и могут играть роль регуляторов прорастания. Так, в более низких концентрациях они оказывают заметное действие на прорастание семян (рис. 8.9).

Действие биомедиаторов на морфогенетические реакции мало изучено. Однако АХ принимает участие в этом процессе. Прежде всего, КС увеличивает уровень эндогенного АХ в тканях растений, что оказывает влияние на морфогенез. АХ в ряде случаев имитирует действие КС на некоторые управляемые фитохромом процессы (табл. 8.3).

Как видно, оба эффлектора увеличивают поглощение кислорода и выход ионов H^+ вторичными корнями, прорастание семян разных растений, биоэлектрическую реакцию и т. д.

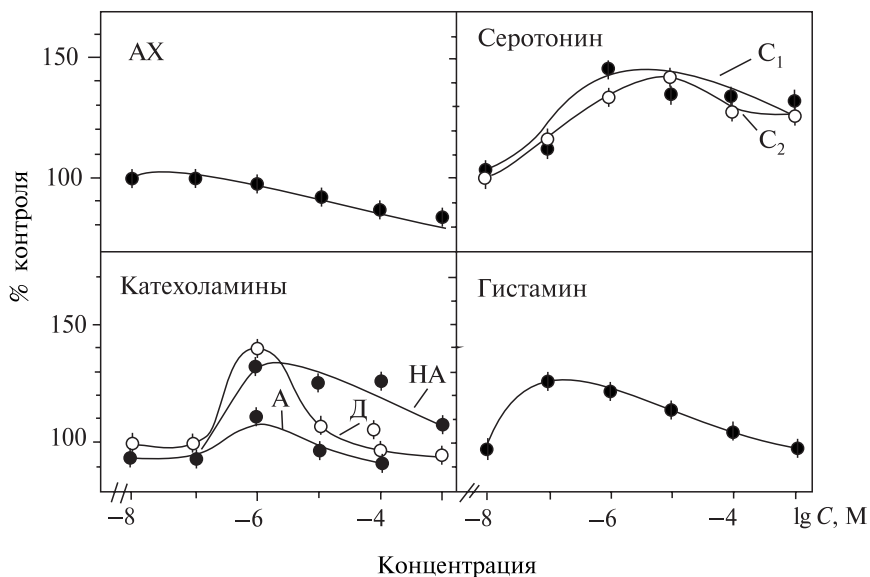


Рис. 8.9. Концентрационные кривые действия ацетилхолина и биогенных аминов на прорастание семян редиса: С₁ и С₂ – серотонин сульфат и серотонин HCl; Д – дофамин; НА – норадреналин; А – адреналин (В. В. Рощина, 2010)

Таблица 8.3

Эффекты ацетилхолина и красного света на управляемые фитохромом процессы
(В. В. Рощина, 2010)

Растение	Процесс	АХ	КС
<i>Phaseolus aureus</i> Вторичные корни	Поглощение кислорода	Увеличение	Увеличение
	Образование АДФ и Φ_n	Увеличение	Увеличение
	Выход H^+	Увеличение	Увеличение
<i>Echinochloa grusgalli</i>	Прорастание семян	Увеличение	Увеличение
<i>Brassica kaber</i>	Прорастание семян	Увеличение	Увеличение
<i>Setaria viridis</i>	Прорастание семян	Увеличение	Увеличение

Растение	Процесс	АХ	КС
<i>Agropyron repens</i>	Прорастание семян	Увеличение	Увеличение
<i>Trichoderma viride</i>	Споруляция	Увеличение	Увеличение
<i>Spinacia oltracea</i>	Биоэлектрическая реакция	Увеличение	Увеличение

Сравнение эффектов АХ и КС указывает на стимуляцию обоими факторами ряда реакций. ДКС действует противоположным образом. Однако не все управляемые фитохромом процессы регулируются АХ, аналогично КС.

Опыты со светом различного спектрального состава показали активирующее влияние КС на цГМФ-связывающую активность в гомогенате ткани и КС/ДКС-обратимость эффекта. Влияние синего света обнаружено не было. Следовательно, данное явление контролируется светом, по всей видимости, с участием фитохрома.

В последние годы получены доказательства того, что цГМФ играет важную роль в светоиндуцированных процессах в хлоропластах, действии фитогормонов и т. д.

С помощью техники микроинъекций показано, что цГМФ вызывает аналогичную фитохрому активацию синтеза антоцианов, а вместе с Ca^{2+} контролирует развитие хлоропластов и экспрессию *fnr* и *cab* генов.

Протекторные свойства. Большинство адаптационных реакций направлено на стабилизацию и защиту клеточных структур путем формирования химических соединений – стабилизаторов и протекторов. Роль стабилизаторов и протекторов могут играть АХ, биогенные амины и их производные, например глицинбетаин, который накапливается при засолении, гистамин – при засухе. Дофамин присутствует в определенных сортах сахарной свеклы и придает устойчивость к поражению некоторыми грибами.

Серотонин ингибирует рост опухолей в клубнях картофеля и способен выполнять функцию протектора против УФ- и X-лучей. Механизм защиты пока не выяснен. Однако установлено, что серотонин легко окисляется на свету, и продукты его окисления могут стабилизировать мембрану. Механизм такой фотозащиты у клеток дрожжей состоит в связывании серотонина с ДНК, что ведет к повышению выживаемости клеток на 50 % по сравнению с контролем. Обработка серотонином при после-

дующем X-облучении в 400 рад полностью сохраняла способность к образованию вторичных корней кормовыми бобами.

У животных АХ и катехоламины могут выполнять функцию радиопротекторов, а катехоламины – еще и противовирусную и противоопухолевую функции. Возможно, что в основе этих действий лежат антиоксидантные свойства, которые проявляются в модельных опытах.

При γ -облучении плодов банана полифенолоксидаза в 10–50 раз быстрее окисляет норадреналин и дофамин по сравнению с другими фенолами.

Исследование протекторных свойств катехоламинов и серотонина могут дать ключ к пониманию механизмов стресса у растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основной

- Денисенко, П. П.* Роль холинреактивных систем в регуляторных процессах / П. П. Денисенко. М., 1980.
- Ониани, Д. А.* Регуляция циклозиса клеток водорослей / Д. А. Ониани. Тбилиси, 1997.
- Рощина, В. В.* Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и биогенные амины / В. В. Рощина. Пушино, 1991.
- Рощина, В. В.* Нейротрансмиттеры – биомедиаторы и регуляторы растений / В. В. Рощина. Пушино, 2010.
- Юрин, В. М.* Биомедиаторы в растениях / В. М. Юрин. Минск, 2004.
- Юрин, В. М.* Биоэлектрогенез растений / В. М. Юрин. Минск, 2008.
- Юрин, В. М.* Регуляция функций мембран растительных клеток / В. М. Юрин, В. М. Иванченко, С. Г. Галактионов. Минск, 1979.

Дополнительный

- Бабаков, А. В.* GTP-связывающие белки в плазматических мембранах высших растений / А. В. Бабаков, Н. Ю. Абрамычева // Биологические мембраны. 1989. Т. 6. С. 262–266.
- Медведев, С. С.* Электрофизиология растений : учеб. пособие / С. С. Медведев. СПб., 1998.
- Овчинников, Ю. А.* Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. М., 1987.
- Федоров, Н. А.* Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов / Н. А. Федоров. М., 1979.
- Харборн, Д.* Введение в экологическую биохимию / Д. Харборн. М., 1985.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Основные обозначения	3
Введение	4
Глава 1. Содержание, синтез и катаболизм биомедиаторов	9
1.1. Ацетилхолин	9
1.2. Биогенные амины	17
Глава 2. Электрические явления у растений	31
2.1. Потенциал покоя растительной клетки	31
2.2. Возбудимость растительных клеток	35
2.3. Типы и природа распространяющихся биоэлектрических реакций у высших растений	40
2.4. Особенности восстановительного периода высших растений	41
2.5. Пути распространения и механизмы генерации потенциала действия у высших растений	43
Глава 3. Движения растений	53
3.1. Внутриклеточные движения	54
3.2. Локомоторные движения	71
Глава 4. Действие биомедиаторов на растения	84
4.1. Рост и развитие	84
4.2. Фотосинтез и водообмен	90
4.3. Движения растений	92
4.4. Барьерно-транспортные свойства мембран	95
4.5. Энергетические и метаболические процессы	103
Глава 5. Система циклических нуклеотидов	109
Глава 6. Физиологическая и регуляторная роль Ca^{2+}	124
Глава 7. Системы регуляции с участием медиаторов	139
7.1. Общие положения. Концепция рецепторов	139
7.2. Холинэргическая система регуляции	141
7.3. Системы регуляции с участием биогенных аминов	159
Глава 8. Функциональная роль биомедиаторов в растениях	172
8.1. Медиаторные функции	173
8.2. Немедиаторные функции	192
Список литературы	198

Учебное издание

Юрин Владимир Михайлович

БИОМЕДИАТОРЫ В РАСТЕНИЯХ

Учебное пособие

Редактор *А. Г. Терехова*

Художник обложки *Т. Ю. Таран*

Технический редактор *Т. К. Раманович*

Компьютерная верстка *О. В. Гасюк*

Корректор *О. С. Сафронова*

Подписано в печать 31.10.2013. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 11,62. Уч.-изд. л. 13,8.

Тираж 100 экз. Заказ 700.

Белорусский государственный университет.

ЛИ № 02330/0494425 от 08.04.2009.

Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие

«Издательский центр Белорусского государственного университета».

ЛП № 02330/0494178 от 03.04.2009.

Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.