

УДК 581.192.7(042.4)
ББК 28.57я73
Ю72

*Печатается по решению
Редакционно-издательского совета
Белорусского государственного университета*

Р е ц е н з е н т ы:
академик НАН Беларуси *Н. А. Ламан*;
кандидат биологических наук,
доцент *Н. А. Лемеза*

Юрин, В. М.
Ю72 Биомедиаторы в растениях : курс лекций / В. М. Юрин. – Мн. :
БГУ, 2004. – 128 с. : ил.
ISBN 985-485-305-5.

Основная задача курса лекций – расширение и углубление знаний студентов о значении биомедиаторов и их роли как сигнальных веществ и посредников в растениях.

Общебиологическая роль веществ, являющихся химическими передатчиками возбуждения у высших животных, становится очевидной после открытия в растениях ацетилхолина и биогенных аминов. В пособии излагаются данные о наличии указанных соединений-биомедиаторов и приводится вероятная интерпретация механизмов их действия в растениях.

Предназначено для студентов, аспирантов биологических специальностей.

УДК 581.192.7(042.4)
ББК 28.57я73

ISBN 985-485-305-5

© Юрин В. М., 2004
© БГУ, 2004

Лекция 1

БИОМЕДИАТОРЫ, ИХ СИНТЕЗ И КАТАБОЛИЗМ

Биомедиаторы (ацетилхолин, норадреналин, адреналин, серотонин) являются трансдукторами сигнала между клетками в синапсах. Эти соединения способны регулировать 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 в связи с их обнаружением в растениях, а также в связи с предположением о существовании в растительных мембранах химических мест связывания (сенсоров), напоминающих рецептор.

1.1. Ацетилхолин

Ацетилхолин был впервые выявлен, экстрагирован и идентифицирован около 100 лет назад в препаратах гриба спорыньи *Claviceps purpurea* Эвансом, т. е. прежде, чем медиатор был открыт в животных тканях.

Интерес к ацетилхолину был вновь проявлен в связи с изучением нервной системы у животных. Леви в 20-е гг. открыл ацетилхолин и гидролизующий его фермент в тканях сердца амфибии.

Только спустя 30 лет после открытия Эвансом ацетилхолина в препаратах гриба спорыньи *Claviceps purpurea* начали появляться работы по изучению содержания ацетилхолина в растениях. Было обнаружено, что большое количество ацетилхолина содержится в волосках и тканях крапивы. Это соединение (АХ) было идентифицировано в составе консервированной капусты и силоса, а также в бактериях, которые были способны аккумулировать большое количество ацетилхолина.

Ацетилхолин обнаружен примерно в 60 видах 31 семейства многоклеточных растений, а также у синезеленой водоросли *Oscillatoria*, одного вида мха семейства *Fumariaceae* и т. д. Количество ацетилхолина в органах и тканях значительно варьирует в зависимости от вида растений.

Больше всего ацетилхолина содержится в секреторных тканях жгучих волосков крапивы – 10^{-2} М, или 120–180 нмоль · г⁻¹ сырой массы. Вместе с присутствующим в составе секрета гистамином ацетилхолин может вызывать болевую реакцию и образование волдырей при контакте с кожей человека. Особенно сильные ожоги вызывают жгучие волоски австралийского вида лапортеи. В XIX в. ожоги, вызванные этим растением

ем, 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 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 ацетилхолина, 0,025–0,05 мкг гистамина и 0,001 мкг серотонина в расчете на один волосок.

Таблица 1.1

Содержание ацетилхолина в растениях

Вид	Орган	К-во, мкг·г ⁻¹ , 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	120–180
	Волоски	
	Стебли	
	Корни	

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

Нижний предел содержания ацетилхолина в тканях животных сопоставим с величинами, полученными для растений, а верхний – в 100 и даже 1000 раз выше. Локализация ацетилхолина в растительной клетке неизвестна. У животных он хранится в секреторных пузырьках, отделяемых от аппарата Гольджи. Иногда пузырьки покрыты особым белком

клатрином. Аналогичные везикулы, покрытые клатрином, найдены также у растений. Предполагают, что местом синтеза и первоначальной локализации ацетилхолина в растительных клетках являются мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР).

У животных значительное количество ацетилхолина найдено во фракциях митохондрий. Была сделана попытка обнаружить ацетилхолин в хлоропластах листьев растений. Однако не у всех исследованных растений удалось обнаружить в пластидах ацетилхолин (табл. 1.2).

Таблица 1.2

**Содержание холиновых эфиров в хлоропластах
(нмоль·2⁻¹ сырой массы листьев)**

Растение	Ацетилхолин	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, ацетилхолин и бутирилхолин растворимы в воде и могут легко вымываться из пластид при их выделении и т. д.

Содержание ацетилхолина и бутирилхолина зависит от возраста, фазы развития, условий выращивания и других условий.

Синтез ацетилхолина. Предшественниками ацетилхолина в растениях, как и у животных, является ацетил-КоА и холин.

Синтез ацетил-КоА происходит из ацетата с участием ацетил-КоА-синтетазы или из пирувата с помощью пируват-дегидрогеназного комплекса. Синтез самого ацетилхолина осуществляется с участием фермента ацетилхолинтрансферазы.

Холин образуется двумя путями: из аминокислоты серина или фосфатидилхолина мембран.

Фермент ацетилхолинтрансфераза был обнаружен впервые в листьях крапивы *Urtica dioica* и даже в ее отдельном жгучем волоске.

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

В целом же активность ацетилхолинтрансферазы, как и содержание ацетилхолина, значительно выше в тканях животных.

Реакция синтеза протекает по схеме (рис. 1.1).

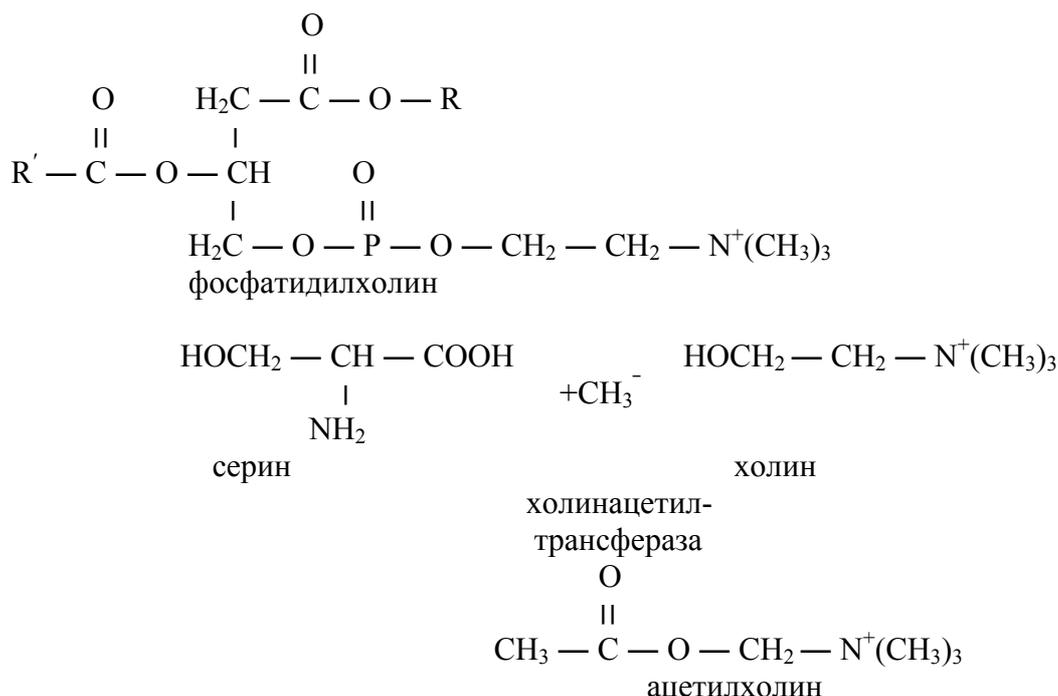


Рис. 1.1. Синтез ацетилхолина

Однако у некоторых групп растений, как, например, у крапивы, активность его столь же велика. Наличие фермента у синезеленой бактерии *Oscillatoria agardhii* показывает, что ацетилхолин, возможно, синтезировался даже у древних форм растений.

Содержание холина в растениях в 100–1000 раз превышает содержание ацетилхолина (табл. 1.3).

Таблица 1.3

Содержание ацетилхолина и холина (нмоль/г сырой массы) в 7-дневных проростках *Phaseolus aureus*, выращенных при непрерывном освещении или в темноте

Органы	Ацетилхолин	Холин
Свет		
Листья	53,0 ± 6,6	3740 ± 200
Стебли	0,77 ± 0,09	1440 ± 73
Корни	4,7 ± 2,6	2160 ± 218
Темнота		
Листья	21,0 ± 7,6	6800 ± 170
Стебли	2,4 ± 0,7	1080 ± 35
Корни	4,6 ± 2,5	2270 ± 278

Как видно, синтез ацетилхолина (содержание) в листьях стимулируется светом, поэтому полагают, что он зависит от фотосинтеза.

Метаболизм ацетилхолина. Гидролиз ацетилхолина до холина и уксусной кислоты осуществляется ферментом холинэстеразой. Холинэстеразная активность у растений была впервые обнаружена в 1962 г. у одноклеточной водоросли *Nitella*, затем у лишайников и у высших растений. Кроме специализированного фермента способностью гидролизовать ацетилхолин, 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. Холин является источником бетаина (или глицинбетаина), предохраняющего растения от соевого стресса. Образование бетаина идет в хлоропластах ряда растений, произрастающих в районах с засушливым климатом (например, ячмень, свекла, шпинат). Реакции идут с участием фермента – бетаинальдегиддегидрогеназы. Активация этого фермента вызывается увеличением засоления, причем для синтеза бетаина необходим свет и O_2 , а также восстановленный ферредоксин.

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

Схема метаболизма ацетилхолина в растениях выглядит следующим образом (рис. 1.2).

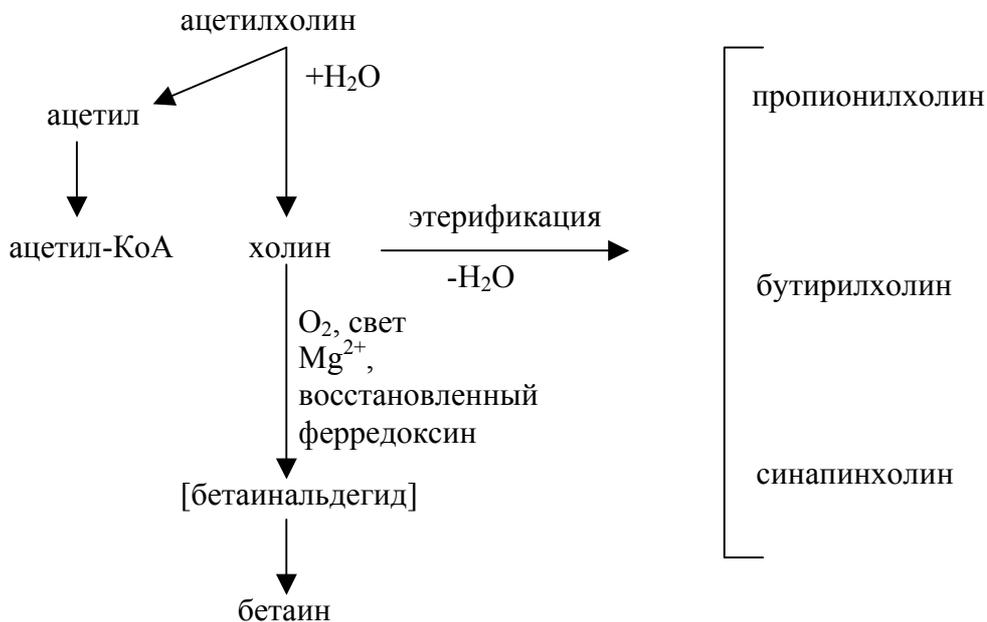


Рис. 1.2. Метаболизм ацетилхолина в растениях

Большое влияние на метаболизм ацетилхолина оказывают экзогенные факторы.

Свет непосредственно влияет на уровень ацетилхолина в тканях, регулируя активность ферментов его синтеза и распада. Роль света подтверждается в опытах с этиолированными проростками овса. Показано, что уровень эндогенного ацетилхолина в 2–3 раза повышается по мере их зеленения как на белом, так и на красном свете.

Стимуляция светом синтеза ацетилхолина отмечена не для всех растений, что, по-видимому, связано с метаболическими особенностями.

Имеются сведения, что накопление ацетилхолина в тканях зависит от длины волны света. Дальний красный свет ($\lambda \geq 730$ нм) вызывает уменьшение уровня ацетилхолина. Красный свет ($\lambda \approx 660$ нм), наоборот, увеличивает синтез ацетилхолина путем стимуляции активности холин-ацетилтрансферазы в присутствии холина и ацетил-КоА.

По некоторым данным, красный свет эффективнее, чем белый. На белом свете содержание ацетилхолина в каллюсе мха *Funaria hygrometrica* составляло 27 % (35 нмоль · г⁻¹ сырой массы) от количества в растениях, выросших на красном свете (124,1 нмоль · г⁻¹ сырой массы); последовательное облучение каллюса красным светом, а затем дальним красным светом резко подавляло синтез холинового эфира (2,2 нмоль · г⁻¹ сырой массы).

В везикулах шероховатого эндоплазматического ретикулума из клеток корней на красном свете синтез АХ увеличивался по сравнению с темнотой в 2–20 раз, тогда как на дальнем красном свете 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 дальнему красному, либо к красному свету.

В последнее время появились данные о том, что фитохром принимает участие в эффекте Эммерсона при фотосинтезе.

С этой точки зрения высокая эффективность синтеза ацетилхолина на красном свете определяется работой обеих фотосистем, тогда как снижение процесса на дальнем красном свете объясняется низкой активностью фотосинтеза, связанной с работой только одной ФСІ. Отмечено также, что накопление ацетилхолина под действием света связано с фотопериодизмом. У некоторых растений ацетилхолина накапливалось больше в условиях короткого дня, по сравнению с теми, что росли в условиях длинного дня или непрерывного освещения.

Кислород. Концентрация O₂ в тканях, вероятно, определяет скорость синтеза холиновых эфиров, хотя этот вопрос изучен недостаточно.

Температура в первую очередь влияет на активность ацетилхолинтрансферазы, а также на активность гидролизующего холиновый эфир фермента холинэстеразы. Оптимум температуры для ацетилхолинтрансферазы находится в пределах 25–30 °С. Холинэстеразы многих животных имеют более высокий температурный оптимум – 37 °С.

Влияние рН. Оптимум рН для выделенных из растений холинэстераз составляет 7,0–7,8, т. е. он такой же, как и для холинэстераз животных. При изменении рН от 7,6 до 8,0 скорость неферментативного гидролиза ацетилхолина значительно повышается

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

Пестициды. Фосфорорганические соединения (хлорофос, фтафос и др.) ингибируют холинэстеразную активность растений. Некоторые ретортанды также оказывают ингибирующее действие на холинэстеразы растений. Это подтверждает гипотезу об ингибировании прорастания злаковых инсектицидами вследствие угнетения активности холинэстераз. Именно в основе токсического действия ФОП лежит их взаимодействие с холинэстеразой, ведущее к торможению ее активности. Ингибирование холинэстеразной активности с последующим быстрым нарушением метаболизма ацетилхолина привело к тому, что ФОП рассматривают как синаптические яды, поскольку они подавляют передачу нервного импульса в холинреактивных системах.

1.2. Биогенные амины, их классификация и метаболизм

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.

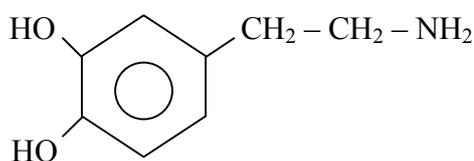
Так наряду с производными аминокислот «магического» набора к биогенным аминам относят также соединения, получающиеся декарбоксилированием «небелковых» аминокислот орнитина (путресцин) или цистеиновой кислоты (таурин).

Биогенные моноамины являющиеся биорегуляторами, и их важнейшие синтетические производные подразделяются на четыре группы: катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин), группа гистамина, группа серотонина, группа гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК).

Амины играют значительную роль в азотном обмене растений и животных. Содержание биогенных аминов в тканях высших растений и водорослях может колебаться от 30–700 нмоль · г⁻¹ сырой массы в норме и до 3000 нмоль · г⁻¹ сырой массы и выше в стрессовых условиях.

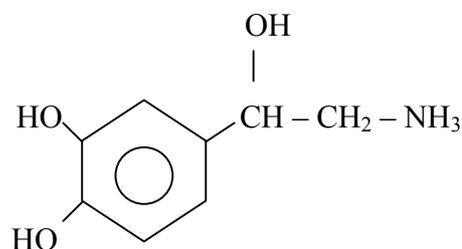
Катехоламины – особая группа физиологически активных веществ животных, выполняющая роль нейротрансмиттеров. Они выполняют в ряде случаев и гормональную функцию, например адреналин. В растениях катехоламины были найдены в 1958 г. в плодах банана. В настоящее время катехоламины идентифицированы в 28 видах растений из 18 семейств.

Дофамин



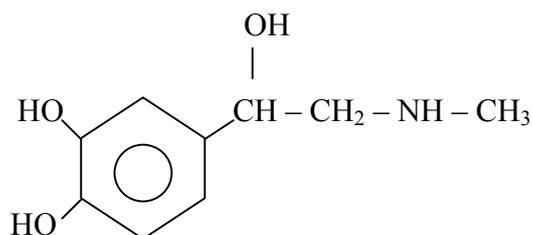
найден у 18 видов высших растений и зеленой водоросли *Monostroma fussum*. Отмечено увеличение дофамина в 1,5 раза в местах ранения у кактуса *Carnegieia gigantea*. Дофамин присутствует в растениях не только в свободной форме, но и в гликозидированной форме, например у семян *Entada pursaetha*.

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 пяти видах из 4 семейств. Особенно много адреналина накапливается в листьях кукурузы. Некоторые данные по содержанию катехоламинов в растениях приводятся в табл. 1.4.

Таблица 1.4

Содержание катехоламинов в растениях

Вид	Орган	Содержание мкг·г ⁻¹ сырой массы
<i>Дофамин</i>		
<i>Carnegiea gigantea</i>	Надземная часть	3000–000
Musa	Плод (кожура)	700
	Плод (мякоть)	8
<i>Норадреналин</i>		
<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
Musa	Плод (кожура)	122,0
	Плод (мякоть)	2,0
<i>Portulaca oleracea</i>		2500
<i>Адреналин</i>		
<i>Pisum sativum</i>	Листья	0–34,2
<i>Phaseolus aureus</i>	Листья	0,22–284,0
<i>Zea mays</i>	Листья	3833,0

Места субклеточной локализации биогенных аминов в растительной клетке мало изучены. Имеются только сообщения о том, что дофамин найден в вакуолях латекса отдельных видов мака.

Недавно норадреналин и адреналин идентифицированы в изолированных хлоропластах растений из семейства *Leguminosae* и *Urticaceae* (табл. 1.5).

Таблица 1.5

**Содержание катехоламинов в изолированных хлоропластах
(нмоль · г⁻¹ сырой массы листьев)**

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

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

Метаболизм катехоламинов. Моноамины (дофамин, норадреналин и адреналин) – часть системы азотного метаболизма растений. Путь их биосинтеза включает в себя реакции декарбоксилирования и гидроксирования соответствующих аминокислот.

Схема образования моноаминов из фенилаланина выглядит следующим образом:

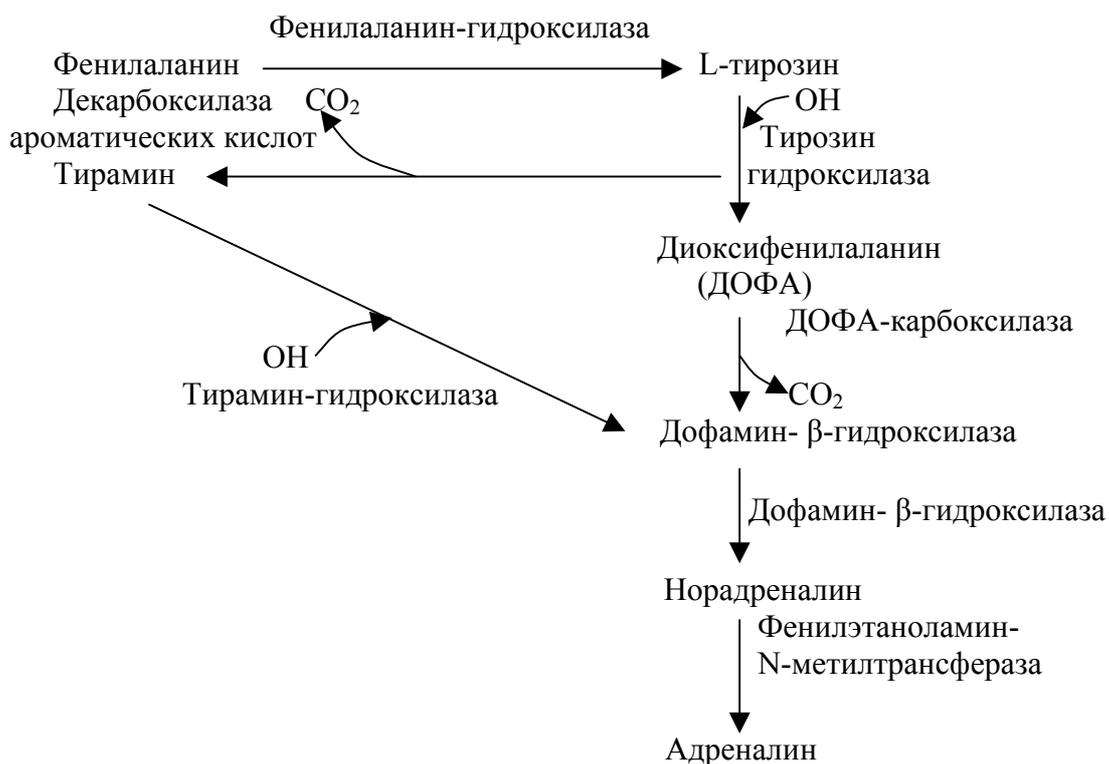
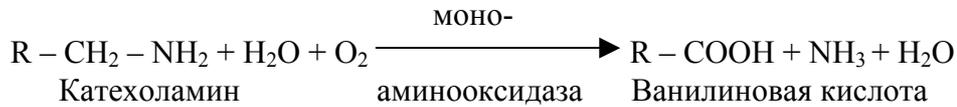


Рис. 1.3. Образование моноаминов из фенилаланина

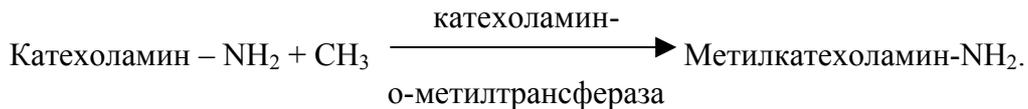
Локализация места синтеза катехоламинов в растительной клетке также не установлена. У животных образование этих веществ идет в цистернах аппарата Гольджи.

Катаболизм (распад) катехоламинов в растениях в общих чертах имеет сходство с распадом этих соединений в животных тканях. Существуют два основных пути катаболизма катехоламинов:

1. Окислительное дезаминирование:



2. О-метилирование.



Реакция дезаминирования протекает с участием моноаминоксидаз или диаминоксидаз – медьсодержащих ферментов в реакционный центр пиридоксоль и (или) флаavin. Эти ферменты, ответственные за быструю утилизацию катехоламинов, сосредоточены в митохондриях животных.

Реакция о-метилирования протекает с участием катехоламин-о-метилтрансфераз. Фермент присутствует у животных во всех тканях, особенно в нервных клетках. Пути катехоламинов показаны на рис. 1.4.

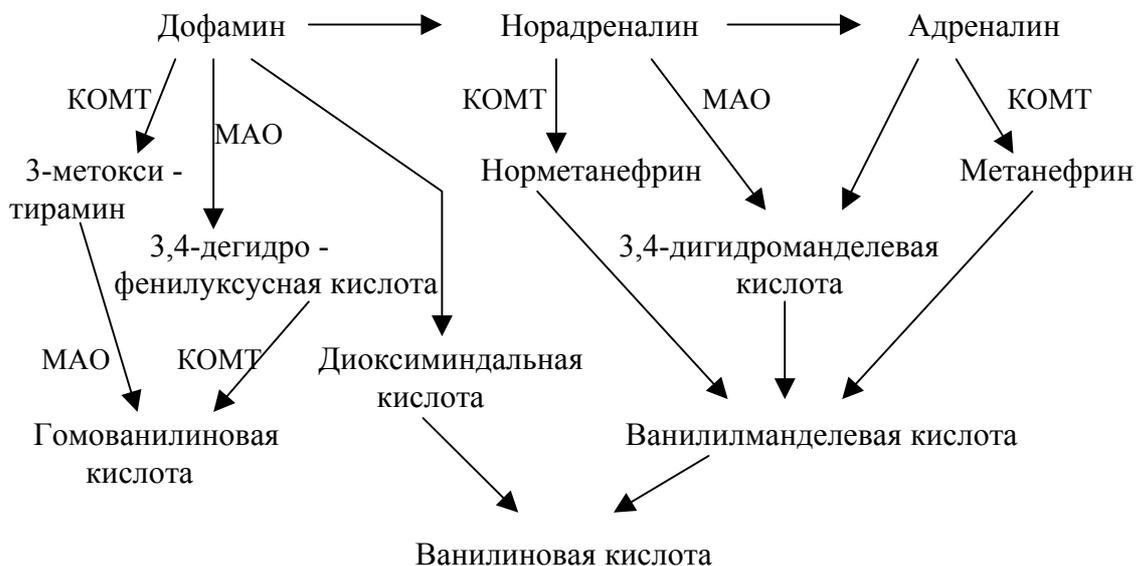


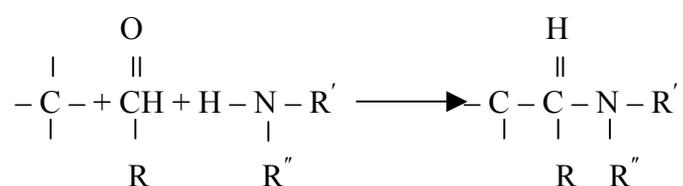
Рис. 1.4. Катаболизм катехоламинов до ванилиновой кислоты: MAO – моноаминоксидаза, КОМТ – катехоламин-о-метилтрансфераза

Основа этого процесса состоит в том, что с помощью моноаминоксидаз (MAO) и катехоламин-о-метилтрансфераз (КОМТ) катехоламины окисляются, дезаминируются и метилируются до физиологически неак-

тивных веществ – норметанефрина, метанефрина, ванилинового альдегида и в конечном итоге до диоксиминдальной и ванилиновой кислот.

Два последних соединения и ванилиновый альдегид являются обычными продуктами метаболизма растений, поэтому не исключено, что указанная схема применима и к растениям. В отличие от животных моноаминооксидазы, хотя и присутствуют в растениях, но играют меньшую роль в окислительном дезаминировании катехоламинов, чем диаминооксидазы.

Катехоламины способны метаболизироваться не только до ванилина и ванилиновой кислоты, но и превращаться в алкалоиды (токсичные продукты, часто видоспецифические). Основной путь образования алкалоидов из аминов и альдегидов – реакция Манниха.



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

На рис. 1.5 показано образование алкалоидов папаверина, морфина и дофамина и продукта дезаминирования ДОФА (диоксифенилацетальдегид) или ДОФА-альдегида в млечниках мака *Papaver somniferum* и *Papaver bracteatum*.

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.

Метилированием дофамина образуются такие алкалоиды, как мескалин, ангаламин, пеллотин, лофофорин. Они образуются в мексиканских кактусах.

Мескалин является галлюциногенным ядом, т. к. 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 простого метилирования этого катехоламина.

Из продуктов катаболизма катехоламинов ванилина и ванилиновой кислоты образуются алкалоиды капсаицин, d-тубокурарин и, возможно, атропин.

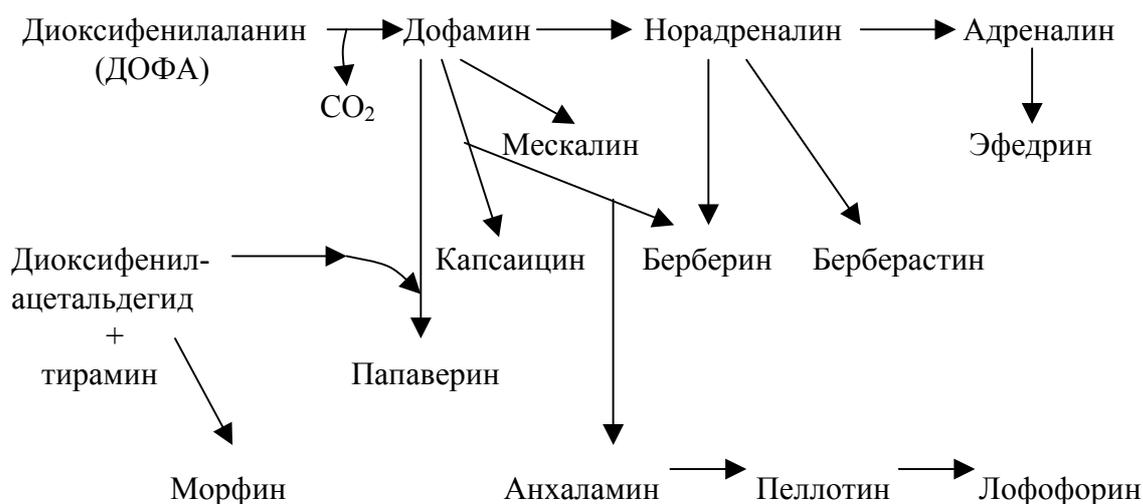
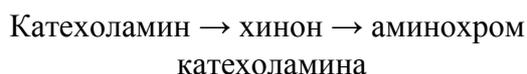


Рис. 1.5. Образование алкалоидов из катехоламинов

D-тубокурарин и атропин являются блокаторами соответственно никотиновых и мускариновых холинорецепторов животных и оказывают антимиаторное действие на постсинаптическую мембрану.

Помимо этого катехоламины окисляются кислородом воздуха с образованием окисленных продуктов – красных пигментов аминокхромов и бурых пигментов меланинов. Это окисление может быть неэнзиматическим и энзиматическим (полифенолоксидазы и др.).



Перенос электронов на кислород воздуха вызывает образование перекиси водорода, и собственно механизм окисления связан с образованием супероксид радикала – активного кислорода O_2^{2-} . Аминохром на воздухе превращается в меланины.

Энзиматическое окисление катехоламинов в меланины полифенолоксидазой показано в плодах банана.

Серотонин. Серотонин обнаружен в 37 видах растений из 17 семейств. Отдельные примеры содержания серотонина в растениях приведены в табл. 1.6.

Во многих растениях (арахис, орехи кокосовые, земляника, вишня, малина, яблоки, лимоны, картофель и т. д.), определить серотонин не удалось. Возможно, это связано с недостаточной разрешающей способ-

ностью методов измерения серотонина. Количество серотонина варьирует в зависимости от таксономического положения растения.

Содержание серотонина для многих растений приблизительно такое же, как и у млекопитающих, а у некоторых плодов и семян высокое содержание его коррелирует с содержанием у некоторых видов моллюска *Ostopus*.

Таблица 1.6

Содержание серотонина в растениях

Вид	Орган	Содержание мкг·г ⁻¹ сырой массы
<i>Серотонин</i>		
<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>Reganum harmala</i>	Листья (культура ткани)	18200
<i>Musa sapientum</i>	Плод (кожура)	1–41
	Плод (мякоть)	40–150
<i>Urtica dioica</i>	Жгучие волоски	3,5

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

Полагают, 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, локализованном в пластидах (рис. 1.6).

На первой стадии биосинтеза происходит декарбоксилирование триптофана, превращающего в растениях триптамин с помощью фермента триктофандекарбоксилазы 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* и требует присутствия O₂.

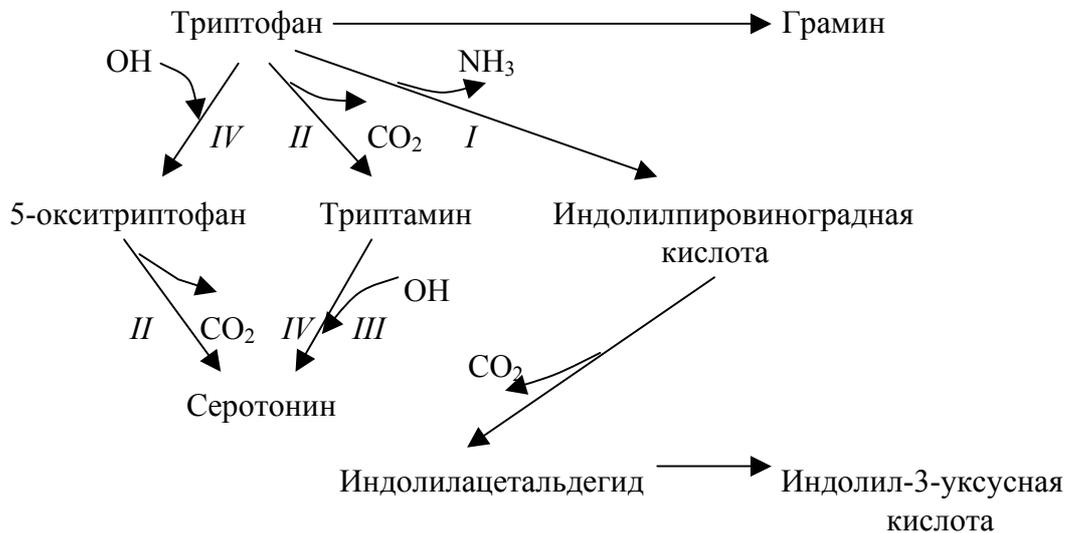


Рис. 1.6. Образование серотонина и ИУК из триптофана:
 I – триптофандекарбоксилаза; II – декарбоксилаза ароматических кислот;
 III – триптамин-5-гидроксилаза; IV – L-триптофан-5-гидроксилаза

Для животных в большей мере характерен другой путь, хотя он также имеет место и у растений, а именно: гидроксилирование (I) триптофана приводит к образованию 5-окситриптофана при участии триптофан-5-гидроксилазы. Затем 5-окситриптофан декарбоксилируется декарбоксилазой ароматических кислот (II), превращаясь в серотонин. У растений ИУК образуется из той же аминокислоты триптофана через индолилпироват и индолилацетальдегид. Полагают, что метаболизм триптофана, неспособного аккумулироваться в клетке, направлен на образование серотонина и ИУК, как форм детоксикации аммония. Кроме того, триптофан служит предшественником алкалоида грамина, который был обнаружен в ячмене.

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

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

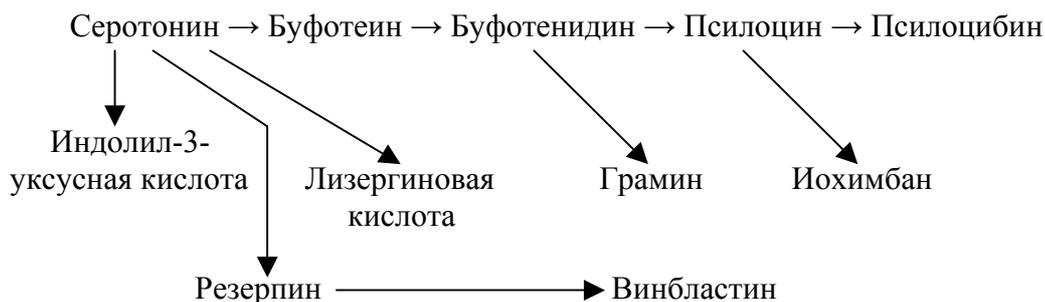


Рис. 1.7. Метаболизм серотонина в растениях

Метилированные производные серотонина: буфотеин, буфотенидин, псилоцин, псилоцибин найдены у амфибий, грибов и растений. Буфотеин найден у гриба поганки *Amanita mappa*, в семенах растений рода *Piptadenia*. Так, 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 эти алкалоиды образуются эндогенно и у человека, 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 барвинка розового *Vinca rosea*, или *Catharanthus roseus*, и применяется как противовирусный и противоопухолевый агент.

Гистамин. В растениях содержится значительное количество гистамина. Впервые этот амин был обнаружен у гриба спорыньи *Claviceps*

purpurea в 1910 г. Гистамин найден у 48 видов из 27 семейств, начиная от базидиомицетов до покрытосеменных растений (табл. 1.7).

Таблица 1.7

Содержание гистамина в растениях

Семейство и вид	Орган	мкг · г ⁻¹ сырой массы
Mimosa	Листья	2,7–13,3
Citrus vulgaris	Листья	17,3
Laportea	Листья, плоды	2,2–50
Urtica dioica	Листья	11,3–43,6
Urtica urens	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, 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).

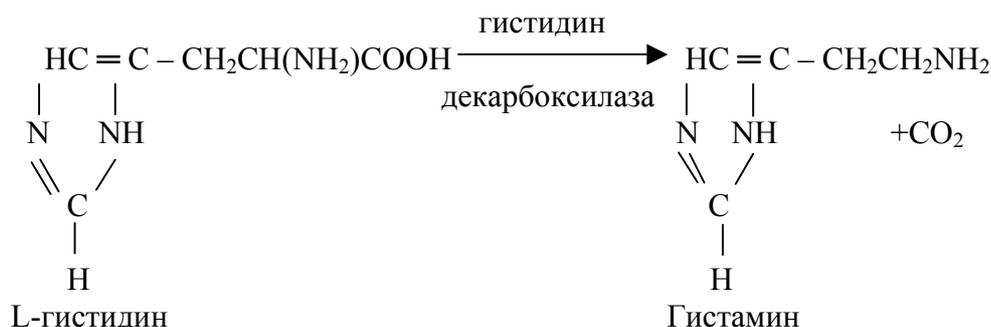


Рис. 1.8. Образование гистамина

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. Моноаминооксидазы обычно присутствуют в митохондриях, а диаминооксидаза – в пузырьках из аппарата Гольджи и ЭР. Моноаминооксидаза участвует в катаболизме первичных, вторичных и третичных аминов, а диаминооксидаза – чаще всего инактивирует гистамин и диамины (путресцин, спермидин, кадаверин). У бактерий катаболизм гистамина происходит при метилировании или ацетилировании с участием гистамин-N-метилтрансферазы.

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

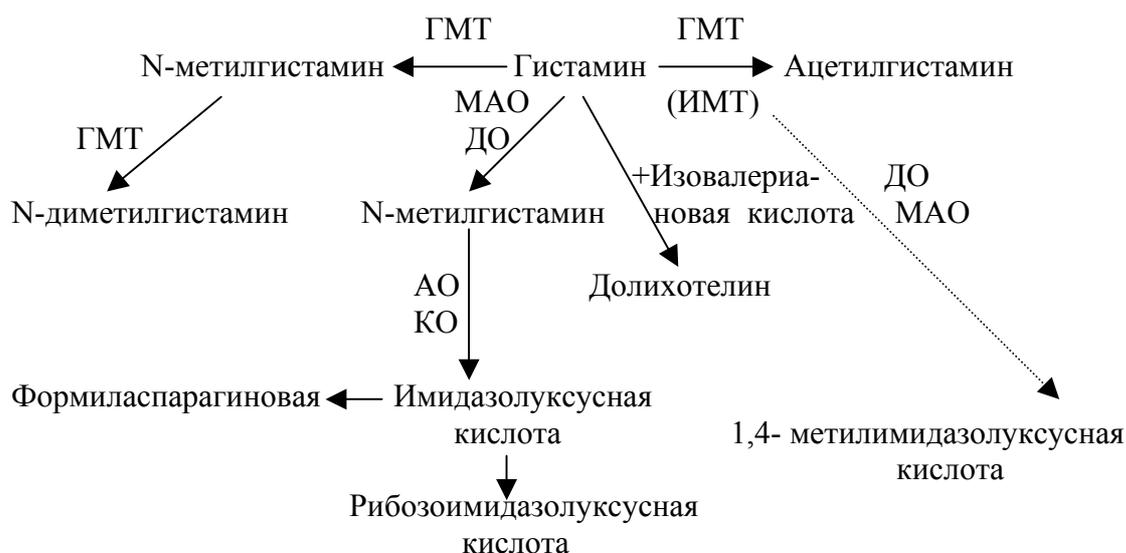
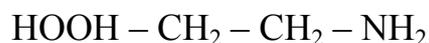


Рис. 1.9. Схема катаболизма гистамина
(АО – альдегидоксидаза, ГМТ – гистамин-N-метилтрансфераза,
ДО – диаминооксидаза, КО – ксантинооксидаза, МАО – моноаминооксидаза,
ИМТ – имидазол-N-метилтрансфераза)

Иминоазот кольца может подвергаться метилированию с образованием 3-метилгистамина или конъюгироваться с рибозой с образованием рибозида и гистамин-динуклеотида. Аминогруппа боковой цепи может подвергаться метилированию с образованием N-метилгистамина и N', N'-диметилгистамина. Гистамин является предшественником в синтезе

имидазольного алкалоида долихотелина, который образуется конденсацией биогенного амина и изовалериановой кислоты или изовалерил-СоА 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 ацетилхолина.

Она выполняет и ряд других регуляторных функций, прежде всего в мозговой ткани: оказывает влияние на транспорт и утилизацию глюкозы, процессы дыхания, окислительного фосфорилирования. Важную роль играет ГАМК 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).

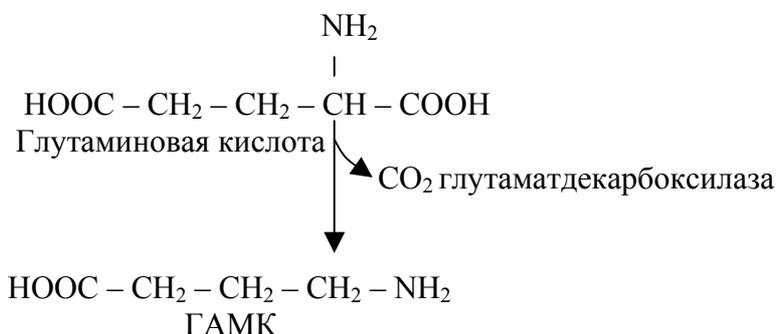


Рис. 1.10. Схема синтеза ГАМК

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

Лекция 2

РЕАКЦИЯ РАСТЕНИЙ НА ДЕЙСТВИЕ БИОМЕДИАТОРОВ

Биомедиаторы (ацетилхолин, дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин, гистамин, ГАМК) у животных, выполняя важные регуляторные функции при передаче внешнего раздражения в виде электрического импульса от одной клетки к другой, являются факторами регуляции роста и развития, а также регулируют энергетические и метаболические процессы.

В настоящее время мы все же имеем мало сведений о влиянии этих веществ на физиологические процессы растений.

2.1. Рост и развитие растений

Рост. Из всех перечисленных биологически активных веществ наиболее изучено действие ацетилхолина. Физиологическая роль ацетилхолина в растениях связана с действием его на ростовые процессы. В таблице 2.1 приведены эффекты ацетилхолина на рост.

Таблица 2.1

Влияние ацетилхолина на ростовые реакции растений

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

Чаще всего под действием ацетилхолина наблюдается стимуляция элонгации колеоптилей и гипокотилей проростков. На элонгацию этиолированных проростков ацетилхолин не оказывал действия. Следует подчеркнуть, что заметный сдвиг ростовых процессов вызывался только высокими концентрациями $> 10^{-3}$ М. Эффект составляет не более 20–30 % от контроля. Недавно установлено, что ацетилхолин стимулирует разворачивание листьев у этиолированных проростков

пшеницы и его действие аналогично действию красного света, регулирующего активность фитохрома.

Эффект катехоламинов на рост растений исследовался значительно меньше. Тем не менее показано, что дофамин в концентрациях выше 5 мг/л ($3,2 \cdot 10^{-5}$ М) подавляет рост каллусной ткани банана и полностью блокирует его при 50 мг/л ($3,2 \cdot 10^{-4}$ М). Норадреналин и адреналин синергически усиливали стимулированную гиббереллином элонгацию проростков салата.

Еще в 1958 году было высказано предположение о том, что серотонин, имея близкое с ИУК строение, может оказывать гормональное действие. Серотонин вызывал ростовой изгиб на биотестах – колеоптилях овса. Ауксинподобный эффект серотонина показан и на гипокотиллях люпина. Серотонин оказывает стимулирующее действие на образование корней в культуре ткани листа гибрида тополя даже в большей мере, чем ИУК. Серотонин ингибировал образование ризосферы на корнях тополя и в то же время стимулировал рост вторичных корней. Биомедиатор ингибирует образование и рост галловых опухолей на дисках клубней картофеля.

Прорастание семян, пыльцы. Ацетилхолин оказывает в основном стимулирующее действие на прорастание семян и пыльцы растений (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Действие ацетилхолина на прорастание семян и пыльцы

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

Однако для некоторых видов растений не было обнаружено влияние ацетилхолина на пыльцу. Опять следует подчеркнуть, что эффективные концентрации ацетилхолина довольно высоки – $> 10^{-3}$ М. Тем не менее в ряде работ отмечается ингибирующее действие ацетилхолина на указанные процессы. Результаты по действию биогенных аминов на прорастание семян довольно противоречивы, хотя и показано стимулирующее действие норадреналина, серотонина, гистамина на прорастание (10^{-5} – 10^{-6} М) семян редиса *Raphanus sativus* (после 24 часов) табл. 2.3.

Таблица 2.3

Действие ацетилхолина и биогенных аминов на прорастание семян редиса (в процентах от контроля)

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

Развитие растений. Исторически интерес к биомедиаторам возник в связи с исследованиями механизмов фотоморфизма в 70-е гг.

В 1977 г. Кандлер установил, что в условиях постоянного освещения ацетилхолин препятствует цветению растений длинного дня *Lemna gibba*, но в том же самом световом режиме ускоряет цветение короткодневного растения *Lemna perpusilla*. Это нашло подтверждение и для некоторых других видов растений.

Факторы внешней среды в сильной мере влияют на проявление эффектов, вызываемых медиаторами.

Свет не только влияет на синтез ацетилхолина, но и играет важную роль в физиологическом действии холиновых эфиров. Обнаружена зависимость ингибирования ацетилхолином образования вторичных корней у *Pisum sativum* от экспозиции на свету. Стимуляция ацетилхолином прорастания семян *Rumex obtusifolius* также наблюдалась преимущественно на свету.

В ряде случаев эффекты, вызываемые ацетилхолином (ингибирование образования вторичных корней, стимуляция споруляции у некоторых грибов, стимуляция прорастания семян, ингибирование роста гипокотилей и стимулирование роста эпикотилей), аналогичны тем, что вызывает красный свет с $\lambda < 680$ нм. Была выдвинута гипотеза об участии фитохрома в индукции ацетилхолином ростовых процессов. Эта гипотеза до настоящего времени не нашла всеобщего признания, поскольку многие экспериментально полученные зависимости не удается повторить. Но пока нет оснований полностью отбросить эту гипотезу. Кроме фитохрома неизвестно, какие еще рострегулирующие белки активируются ацетилхолином.

Стимуляция ацетилхолином образования конидий у мицелия гриба *Trichoderma viride*, выросшего в темноте, была подобна эффекту, вызываемому синим светом. Эти факты легли в основу дискуссии о механизме действия света различного качественного состава. Предполагалось, что механизм действия красного света опосредован ацетилхолином. Однако пока этот вопрос еще окончательно не решен.

Предпринимаются попытки связать ростовой эффект ацетилхолина с функционированием фермента холинэстеразы, найденной у растений.

В отличие от ацетилхолина, катехоламины проявляют большую активность в регуляции процессов развития и морфогенеза. Правда, в одних случаях они подавляют, а в других стимулируют цветение одного и того же растения.

pH среды также обуславливает влияние ацетилхолина. Например, ацетилхолин в концентрациях 10^{-3} – 10^{-2} М стимулировал рост проростков *Triticum vulgare* только при pH 7,5.

При рассмотрении механизма действия биомедиаторов необходимо учитывать их возможное влияние на генетический аппарат клетки. У животных допускается возможность прямого действия ацетилхолина 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 происходят в конечном итоге из триптофана. В других случаях фитогормоны и медиаторы могут иметь разных предшественников, но синтезироваться одновременно и проявлять сходную активность.

Еще одна возможность взаимосвязи между биомедиаторами и фитогормонами может заключаться в синергическом действии этих веществ. С другой стороны, возможны и конкурентные взаимодействия. Так, ацетилхолин (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 ацетилхолина, а антагонист ацетилхолина атропин ($> 10^{-6}$ М) нивелирует действие ауксина на рост.

Всегда считалось, что биомедиаторы могут действовать только на организменном уровне, в частности ацетилхолин. Однако есть основания предполагать его участие во взаимоотношениях между организмами. Об этом говорят следующие факты. Во-первых, ацетилхолин 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 ацетилхолинэстераза, гидролизующий ацетилхолин. Однако нет доказательств, что фермент принадлежит собственно бактериям, а не клеткам

растений. Во-вторых, ацетилхолин, гистамин, серотонин являются распространенными продуктами выделений растений и могут, как экзогенные продукты оказывать аллелопатическое влияние в фитоценозе. Например, ацетилхолин и др. 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 может оказывать влияние на сопутствующие организмы.

2.2. Движение растений

Биомедиаторы участвуют в двигательных реакциях животных, контролируемых холинэргической и адренэргической системами. Ацетилхолин может влиять (подавлять) на хемотаксис у бактерий. При концентрации $1,5 \cdot 10^{-3}$ М ацетилхолин на 30 % ингибировал подвижность некоторых видов синтезирующих бактерий. В растениях движение цитоплазмы отдельных органов, также связывают с наличием сократительных элементов, чувствительных к биомедиаторам.

О влиянии биомедиаторов на различного рода движения у растений мы поговорим более обстоятельно в последующих разделах.

2.3. Мембранные процессы

Основной механизм действия биомедиаторов в животных клетках состоит в модификации транспортных свойств мембран.

Как оказалось, и в растительных клетках действие биомедиаторов также связано с изменением ионной проницаемости плазмалеммы и сдвигом мембранного потенциала. Ацетилхолин и биогенные амины влияют на ряд процессов и на уровне отдельных органелл. Первые исследования в этом направлении были выполнены на изолированных митохондриях, выделенных из различных органов животных. Например, обнаружено торможение набухания митохондрий (10^{-3} М). Ацетилхолин тормозил также набухание и хлоропластов в изотонической среде, причем в большей мере на свету, чем в темноте. Поскольку высокие концентрации (10^{-3} М) тормозят процесс, то можно предположить, что холиновый эфир увеличивает проницаемость хлоропластов для ионов. Но об этом подробнее мы также поговорим в последующих разделах.

2.4. Энергетические и метаболические реакции

Влияние химического вещества на рост и развитие растений может быть опосредовано стимуляцией или ингибированием реакций обмена веществ и энергий. Показано, что ацетилхолин в очень низких концентрациях (10^{-9} М) вызывает падение уровня эндогенной АТФ в стеблях *Phaseolus vulgaris*. В этиолированных зародышевых почках фасоли био-медиатор в концентрациях 10^{-11} – 10^{-3} М и в темноте и на красном свете снижает уровень АТФ. Как мы уже отмечали, в проявлении эффектов ацетилхолина большую роль играет свет. Красный свет сам по себе увеличивает уровень АТФ в зародышевых почках фасоли, а ацетилхолин почти наполовину снижал его уровень (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Действие ацетилхолина и красного света на содержание АТФ в этиолированных зародышевых почках фасоли

Концентрация ацетилхолина, М	Содержание АТФ, в % от контроля
6 мин темнота	100
10^{-3}	31
10^{-7}	22
10^{-11}	29
5 мин красного света +1 мин темнота	198
10^{-3}	126
10^{-7}	110
10^{-11}	128

В изолированных митохондриях корней бобов *Phaseolus aurus* также наблюдалось снижение уровня АТФ и возрастание АДФ и Φ_n под влиянием ацетилхолина.

Ацетилхолин стимулирует поглощение кислорода целыми и изолированными митохондриями корней *Phaseolus aurus*, но практически не влияет на отношение Φ/O и утилизацию неорганического фосфата. Ацетилхолин регулирует синтез АТФ в хлоропластах: в низких концентрациях ($< 10^{-5}$ М) – стимулирует фотофосфорилирование в хлоропластах гороха по сравнению с контролем, причем чем выше освещенность и температура, тем эффективнее низкие концентрации, а в более высоких – угнетает.

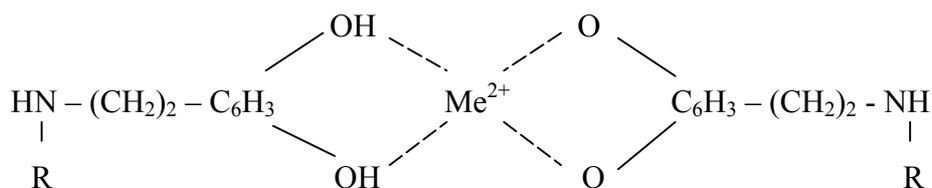
Сегодня нет однозначного мнения о механизме влияния ацетилхолина на синтез АТФ. Одни считают, что стимуляция синтеза на свету в хлоропластах обусловлена непосредственным влиянием на АТФ-синтазу. Другие считают, что возможно опосредованное рецепторное действие на фотофосфорилирование.

Биогенные амины катехоламины и гистамин стимулируют фотофосфорилирование. Серотонин не проявляет активности в этих реакциях. Максимальная стимуляция синтеза АТФ (в 2 раза) катехоламина наблюдалась при концентрациях 10^{-8} М. Как уже отмечалось, примерно в тех же концентрациях повышал скорость фотофосфорилирования и ацетилхолин. При использовании дофамина в присутствии кислорода воздуха синтез АТФ повышается слабо, но при отсутствии (откачивании воздуха) наблюдается стимуляция, сравнимая с действием других катехоламинов. Это может быть связано с тем, что в присутствии кислорода дофамин легко превращается в окисленные продукты. Это, вероятно, и приводит к снижению активности.

Действительно, дофамин, 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, мы уже об этом говорили, происходит при переносе электронов на молекулярный кислород воздуха, с возможным образованием перекиси. Она значительно ускоряется в присутствии ионов металлов Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , которые образуют комплексы с катехоламинами (К – Ме) и реагируют с кислородом (перекисью водорода) согласно уравнению Фентона:

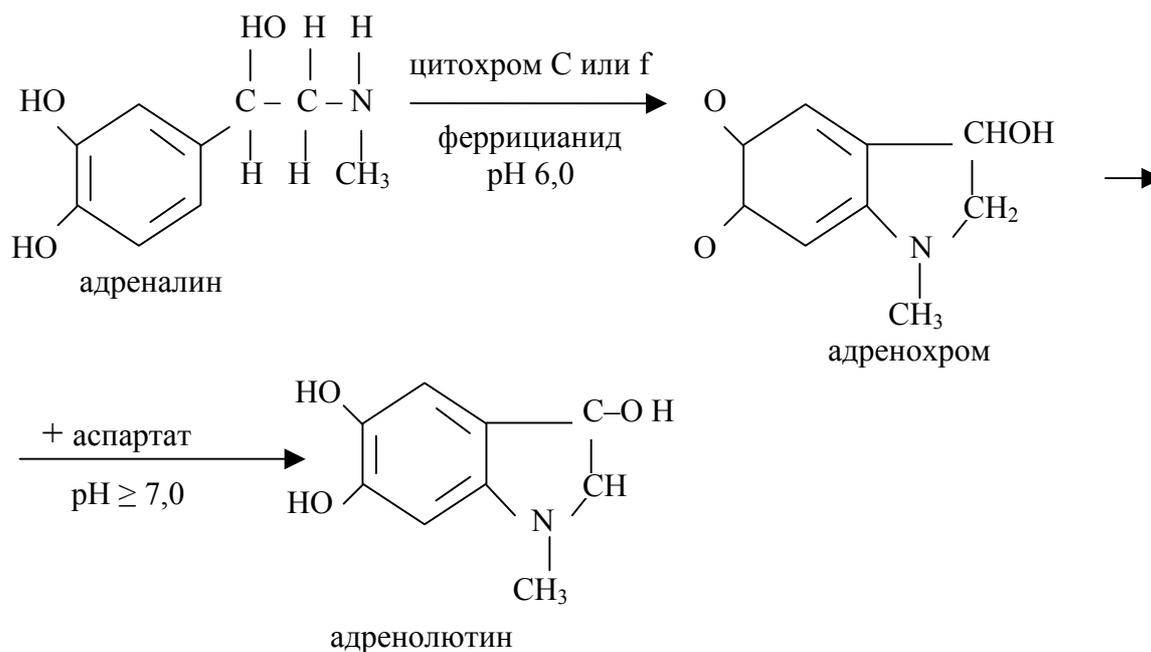


В бескислородной среде медь и железо образуют комплекс в соотношении 1 : 2, например с адреналином:



Адреналин легко превращается в адренохрол, а затем в щелочной среде в присутствии аскорбата – в адренолютин.

Адренохрол является токсичным продуктом для тканей животных и в ряде случаев служит причиной заболеваний при накоплении катехоламинов организмом в стрессовых условиях. Он образуется в присутствии ионов Fe^{3+} и Cu^{2+} и с еще большей скоростью (в 2–3 раза) железосодержащих белков – ферритина, метгемоглобина, окисленного цитохрома С:



Эксперименты с изолированными переносчиками электронов (ферредоксином, ферредоксин-НАДФ-редуктазой, пластахионином из гороха, а также цитохром f (C₅₅₃) из хлореллы показали, что адреналин, норадреналин и дофамин способны вступать в окислительно-восстановительные реакции с переносчиками электронов, расположенными между фотосистемами.

Ацетилхолин и биогенные амины могут влиять на метаболизм растительных клеток путем регуляции активности ферментов или (и) включения в отдельные реакции в качестве субстратов. В концентрациях 10^{-4} – 10^{-3} М ацетилхолин стимулирует пероксидазную активность в растительных тканях, а в более высоких – угнетает, при этом ингибирование достигает 50 %. Имеются данные об ингибировании ацетилхолином, адреналином и норадреналином активности светоиндуцируемой Mg²⁺-зависимой АТФазы хлоропластов гороха.

Ацетилхолин и биогенные амины, как мы уже с вами отмечали, могут включаться в метаболизм клетки. Ацетилхолин служит предшественником алкалоидов и 5-гидроксииндолилуксусной кислоты. Ацетилхолин может также включаться в метаболический путь биосинтеза этилена и ингибировать тем самым образование этого газа.

Лекция 3

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 циклическому аденозинмонофосфату (цАМФ) и циклическому гуанадинмонофосфату (цГМФ), которые играют важную регуляторную роль у животных и микроорганизмов.

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

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

Синтез цАМФ или цГМФ осуществляется в клетке из АТФ или ГТФ с помощью ферментов – циклаз – соответственно аденилатциклазы (АЦ) и гуанилатциклазы.

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

Аденилатциклаза осуществляет и передачу гормонального сигнала внутрь клетки. Гормон активирует АЦ, уровень цАМФ в клетке повышается, что приводит к реализации биологического ответа. Аденилатциклаза является компонентом мембраны и для нее характерна прочная связь с цитоплазматическими мембранами, а также способность активироваться некоторыми гормонами и NaF. Уровень аденилатциклазы в тканях животных составляет $0,5-1,5 \cdot 10^{-6}$ М.

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

Активация АЦ требует обязательно наличия ГТФ. Показано, что в систему АЦ-комплекса входит ГТФ-связывающий белок, который осуществляет сопряжение, например, β -адренэргических 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.

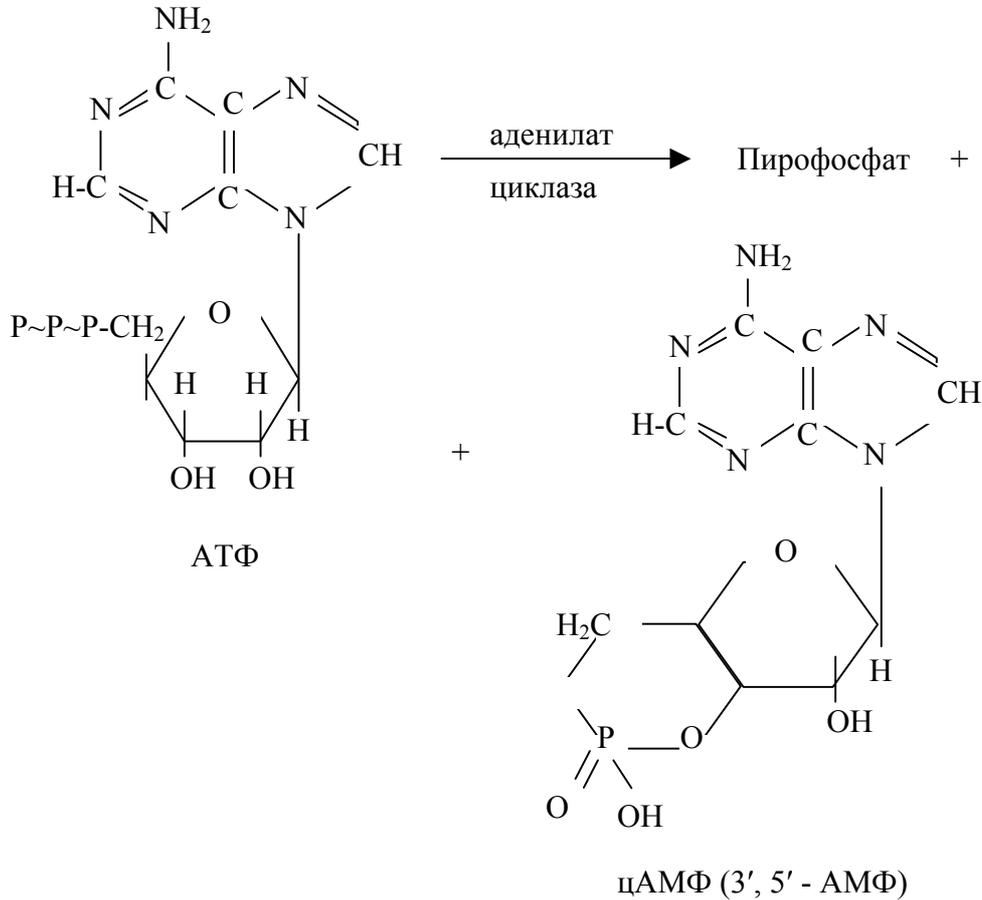


Рис. 3.1. Схема синтеза цАМФ

Ни гормон, ни рецептор гормона не взаимодействуют непосредственно с К-единицей АЦ. Комплекс с К-единицей АЦ способна образовывать только форма G-белка.

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

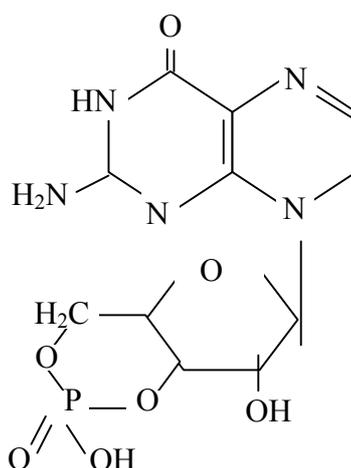
При активации АЦ гормонами ГТФ и свободные ионы Mg^{2+} взаимодействуют с G-белком циклазного комплекса.

Таким образом, как считают в настоящее время, АЦ имеет трехкомпонентную структуру. Регуляторная субъединица находится на 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:

- наличие их в растениях;
- 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 цАМФ должна изменяться в ответ на стимулы, которые вызывают биологический ответ, как и в случае фитогормонов;
- ферменты синтеза, катаболизма и молекулы-мишени цАМФ должны присутствовать в клетке.

Что сегодня известно о циклических нуклеотидах в растениях? Циклические нуклеотиды – цАМФ:



недавно и цГМФ идентифицированы в растениях.

По данным ряда авторов, цАМФ найден в различных тканях растений: в паренхиме табака, семенах ячменя, семенах фасоли, проро-

стках бобовых, клубнях картофеля, водорослях *Chlamydomonas reinhardtii*, *Euglena gracillis*, *Nitella flexilis* и т. д.

Циклический гуаназин – 3'-5'-монофосфат обнаружен в корешках прорастающих бобов в количестве 0,40–20 пикомолей/г сырого веса. Содержание его в меристематической ткани и в области образования вторичных корешков в 2–10 раз выше, чем в зоне растяжения.

Присутствие цАМФ и цГМФ обнаружено и в изолированных хлоропластах фасоли *Phaseolus aureus* (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Содержание цАМФ и цГМФ, ферментов синтеза и катаболизма в изолированных хлоропластах *Phaseolus*

Нуклеотиды	Условия	Содержание, н·моль·г ⁻¹ сырой массы	Ферменты синтеза		Ферменты катаболизма	
			н·моль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка		н·моль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	
			АЦ	ГЦ	цАМФ ФЭ	цГМФ ФЭ
цАМФ	свет	38,3	1,0		1,13	
	темнота	12,2				
цГМФ		20,0		294		4,9

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. Недавно (1987) было показано, что цАМФ в концентрации 10⁻⁵–10⁻⁶ М участвуют в эндогенном фотофосфорилировании белков диализированного 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 дегградации в растениях и животных подобны, то в растительных клетках должны присутствовать аденилатциклаза и фосфодиэстераза. В последние годы появились сообщения об аденилатциклазной активности, обнаруженной в экстрактах из корней *Medicago* (люцерна), клеццивины, гороха, листьев овса и т. д. Аналогичная активность обнаружена в плазматических мембра-

нах, во фракциях ядер, хлоропластов, митохондрий. Также установлено наличие у растений разных видов и ФЭ: в тканях гороха, картофеля, артишока и т. д. Для высших растений (проростки гороха) ФЭ идентифицирована в цитозоле, во фракции органелл и в плазмалемме.

Вообще выделяют четыре типа фосфодиэстераз, различающихся по субстратной и реакционной специфичности:

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

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

Во-первых, оптимальный для фермента растений рН (5–6) в кислой области. Во-вторых, ингибирование фосфодиэстераз метилксантинами происходит слабее и наблюдается не на всех растительных объектах. Тем не менее у водоросли *Chlamydomonas* отмечалось характерное ингибирование активности фосфодиэстеразы 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 – это то, что растительные фосфодиэстеразы 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.

Хотя приведенных данных относительно системы циклических нуклеотидов в растениях, казалось бы, достаточно, однако до настоящего времени дискуссии о его роли в растительных клетках продолжаются.

Присутствует ли цАМФ в растениях? Основная полемика касается реальной концентрации цАМФ в тканях высших растений. Ранее был ус-

тановлен предел от 10^{-12} до $1,5 \cdot 10^{-9}$ М/г сырого веса, или приблизительно от 10^{-9} до $1,5 \cdot 10^{-5}$ М. Поскольку техника для измерения биологических метаболитов совершенствуется, многие из этих ранних оценок были пересмотрены. Это было связано с тем, что ранее применявшаяся техника анализа не различала формы 2', 3' цАМФ и 3', 5' цАМФ. В 1989 году была разработана новая методика. После устранения искусственных источников цАМФ и возможных посторонних веществ уровень цАМФ во всех растительных тканях, которые были протестированы, составлял всего 0,5 пикомоль/г сырого веса ткани. Эти данные 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 пикомолей/г сырого веса. С другой стороны, следует более внимательно подойти к рассмотрению этих результатов:

1. Найденный уровень 0,5 пикомоль/г сырого веса соответствует концентрации 500 пикомолей, т. е. 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. Существование таких форм установлено для различных фитогормонов, причем известно, что, например, гликолизированные цитокинины более активны, чем их свободные формы.

2. Многие описываемые эффекты в растительных системах требуют, как мы уже отмечали, миллимолярных концентраций цАМФ. Эти эффекты, вероятно, являются неспецифическими или отражают наличие подобных с цАМФ других регуляторов, первыми кандидатами на эту роль могут быть аденинподобные цитокинины. В последние несколько лет показано действие микромолярных концентраций. Например, на действие микромолярных концентраций цАМФ стимуляция открытия устьиц в *Vicia faba* установлена активация поглощения Ca^{2+} культивируемыми клетками моркови, набухание этиолированных 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 дибутрил-цАМФ в концентрации 100 нМ и выше стимулировала придаточное почкование в сегментах стебля *Torenia*. Более того, на корнях люцерны на действие пикомолярных концентраций цАМФ наблюдалось утолщение образовавшихся клубеньков.

3. Ряд коллективов, проводивших анализы содержания цАМФ, получили более высокие концентрации цАМФ: для сегментов стебля *Torenia* 36 пикомолей/г сырого веса, для суспендированных клеток *Phaseolus vulgaris* 5 пикомолей/г сырого веса. Получены уровни от 70 до 80 пикомоль/г сырого веса в стерильной культуре *Lemna*. Эти данные показывают, что уровень цАМФ может сильно варьировать и зависеть от вида растений и тканей. Это может оказаться полезным для пересмотра в настоящее время систем в растениях, проявляющих биологический ответ на экзогенный цАМФ в соответствии с их концентрацией *in vivo*.

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

5. Концентрация цАМФ может быть в отдельных компартментах, т. е. эффективная концентрация цАМФ может быть выше, чем общая.

6. В некоторых случаях при применении экзогенного цАМФ концентрация цАМФ, которая в действительности достигает клеточных мишеней может быть ниже, чем применяемая экзогенная концентрация. Например, концентрации экзогенной цАМФ от 50 нМ до 5 мМ было достаточно, чтобы увеличить поток K^+ наружу в мезофильных протопластах *V. faba*, но только в присутствии изобутиллитаксантина – ингибитора фосфодиэстеразы. Эти результаты дают возможность предполагать, что экзогенный цАМФ может быстро метаболизироваться растительными тканями, и дают объяснение тому, почему эффективные экзогенные концентрации могут быть выше, чем эндогенные. Кроме того, цАМФ плохо проникает через мембраны, т. е. опыты с экзогенным цАМФ требуют более высоких доз.

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

Таким образом, 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 аденилатциклазу. С другой стороны, хотя данные о фосфодиэстеразной активности, которая специфически гидролизует цАМФ и

ингибируется метилксантинами, нет окончательного мнения о ее присутствии в растениях, аналогично 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. Имеются данные и о том, что добавление цАМФ к растительным экстрактам стимулирует фосфорилирование специфических белков – киназ. Однако выделенная из растений протеинкиназа все еще не очищена. Растительные киназы не стимулируются одним только цАМФ, но и ингибирование протеинкиназы животных различными регуляторами облегчается при участии цАМФ. Следовательно, можно говорить, что каталитическая субъединица растительной киназы подобна животной, но ее регуляция цАМФ *in vivo* происходит за счет какого-то растительного фермента. Но можно также и сказать, что цАМФ не является для растений регулятором *in vivo*. В тканях растений цАМФ приписывается и роль медиатора гормонального действия.

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. 3.2). 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 фосфодиэстеразы, при этом предполагается, что происходит повышение эндогенного цАМФ.

Таблица 3.2

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	–

Знак «–» означает, что фитогормон не влияет на уровень цАМФ.

Возможны и другие пути взаимосвязи цАМФ и фитогормонов. Например, нельзя исключить и возможности АЦ в определенных условиях 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 ЦН выполняет важную роль: согласование эффектов фитогормонов с общим функциональным состоянием клеток, как это имеет место при действии стероидных гормонов на клетки животных.

Вторичными мессенджерами, образование которых может индуцироваться медиаторами, являются диацилглицерол и инозитолфосфаты. В растениях *Apium graveolens*, *Brassica oleracea*, *Allium cepa*, *Narcissus* и др. были обнаружены компоненты инозитолфосфатной системы вторичных посредников – фосфотидилинозитол фосфодиэстераза, или просто фосфолипаза, которая гидролизует фосфотидилинозитол-4,5 дифосфат с образованием диацилглицерола и инозитолфосфатов.

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

Таким образом, уровень цАМФ в клетках может регулироваться активностью аденилциклазы и фосфодиэстеразы. 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 достаточно факторов, позволяющих считать кальций также основным внутриклеточным посредником действия различных специфических и неспецифических сигналов.

Лекция 4

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ Ca^{2+}

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

Ионы кальция оказывают большое влияние на мембранные структуры. На необходимость ионов Ca^{2+} для стабилизации мембран указывалось достаточно давно. 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} М и особенно 10^{-2} М. 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 2-дневный 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, анаэробнозису, 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, дегидрогеназ, пектиностеразы и др.).

Ca^{2+} необходим также для поддержания нормального цикла в растительных клетках.

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

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.

Концентрация свободного кальция в цитозоле растительных и животных клеток низка – 10^{-8} – 10^{-7} М, тогда как концентрация общего содержания кальция в растительной клетке составляет $2 \cdot 10^{-2}$ М.

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.

Кальциевые каналы обнаружены и в мембранах растительных клеток. Показана регуляция входа $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 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. 4.1, 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.

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. Существует три основных механизма его поддержания.

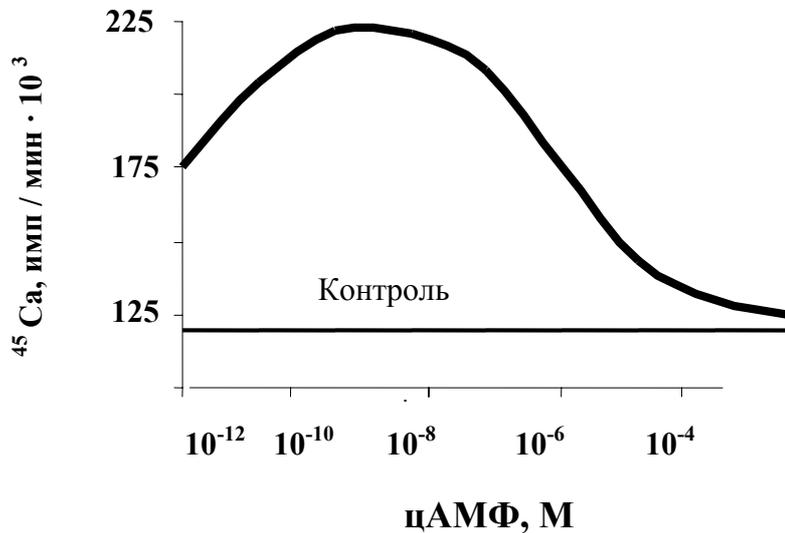


Рис. 4.1. Влияние экзогенного цАМФ на поглощение Ca^{2+} клетками *Chlamydomonas reinhardtii* (мутант без клеточной стенки)

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 – это белки с высоким сродством к кальцию и осуществляющие его перенос. Одна молекула белка может осуществлять 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} М, и обеспечивает его низкий уровень в состоянии покоя. В растительных клетках идентифицированы два типа транспорта Ca^{2+} : стимулируемая кальмодулином Ca^{2+} -транспортирующая АТФаза, подобная по свойствам АТФазе животных клеток и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипорт, схожий с таковым для бактериальных клеток. Эти механизмы транспорта Ca^{2+} относятся к разным мембранам: Ca^{2+} -транспортирующая АТФаза доминирует в плазматических мембранах, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипорт – в тонопластных.

Ca^{2+} -активируемая АТФаза идентифицирована также в мембранах хлоропластов, митохондрий, тонопласте. Установлена зависимость активности

Ca^{2+} -АТФазы корней от наружной концентрации ионов натрия. Фитогормоны и свет регулируют активность 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.

Итак, имеющиеся данные дают основание считать, что активное удаление избытка свободного Ca^{2+} из цитозоля растительных клеток происходит при участии мембранных Ca^{2+} -АТФаз.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник включается при резком увеличении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме животных клеток для его удаления. Транспорт Ca^{2+} осуществляется с помощью локализованного в плазматических мембранах белка – в обмен на Na^+ . Мощность этого переносчика довольно высока, однако он работает эффективно только при достаточно высокой внутриклеточной концентрации кальция – выше 10^{-6} М, так как 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 энергии. 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 животных. Видимо, 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 пиридиновых нуклеотидов, расположенных на плазмалемме.

Тем не менее в литературе 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.

Существенное влияние на изменение концентрации Ca^{2+} в клетке оказывает **буферная система цитозоля**. Это 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.

Эти Ca^{2+} -связывающие белки (СаСБ) имеют высокое сродство к Са ($K \sim 10^{-8}-10^{-6}$), они имеют высокую степень гомологии. Химические свойства Ca^{2+} -связывающих сайтов таковы, что, например, селективность их в 1000 раз выше к ионам Ca^{2+} по сравнению с Mg^{2+} . СаСБ функционально инертны в отсутствие связанного Ca^{2+} .

Кальмодулин (КМ) – наиболее известный и наиболее распространенный СаСБ во многих эукариотических клетках. Кальмодулин в животных и растительных тканях был открыт в 1970 г. двумя независимыми группами исследователей как белок, активирующий фосфодиэстеразу циклических 3', 5'-нуклеотидов. Впоследствии была показана роль этого белка во многих других ферментативных процессах. Действуя на ряд ферментов (протеинкиназы, АТФазы, фосфодиэстеразы и т. д.), он регулирует такие важнейшие клеточные процессы, как деление, рост, секреция гормонов, а также обуславливает форму клеток. Изучено распределение кальмодулина в субклеточных структурах: он обнаружен в митохондриях (5–9 %), хлоропластах (1–2 %), микросомах (< 1 %) и даже клеточных стенках, 90 % его находится в цитозоле от общего КМ – это полифункциональный белок. Концентрация КМ в клетках растений составляет $10^{-6}-10^{-5}\text{M}$.

Очищенный кальмодулин из растений имеет в присутствии и отсутствии Ca^{2+} разную ММ, соответственно 17–19 кДа и 14,5 кДа. Активируется он так же, как и в животных тканях, при уровне Ca^{2+} в клетке 10^{-6}M . В растениях он активирует Ca^{2+} -АТФазу, НАД-киназу, протеинкиназу. Кальмодулин – это кислый низкомолекулярный термостабильный белок. При нагревании до 95–100 °С устойчив в течение 5–10 мин. Физико-химические свойства кальмодулина зависят от различных факторов, в частности от связывания его с кальцием и т. д. Кальмодулин способен связывать до 4 атомов Ca^{2+} на одну молекулу белка. Переход от биологи-

чески неактивного комплекса к активному происходит после связывания третьего иона Ca^{2+} . Только после связывания с кальцием кальмодулин приобретает способность взаимодействовать с многочисленными природными и синтетическими соединениями. Кальмодулин состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 148 аминокислотных остатков. Кальмодулин 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 и 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 фосфодиэстеразой из млекопитающих.

Аминокислотный состав кальмодулина растений и животных подобен. Подобие 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 содержит только один такой остаток. Отсутствие цистеина и гидроксипролина в «животном» КМ является положительным моментом, поскольку это позволяет КМ принимать весьма гибкую третичную структуру, что определяет способность взаимодействовать с различными сигнальными белками. Значимость присутствия цистеина в КМ растений пока неизвестна. Аминокислотная последовательность КМ шпината, зародыша пшеницы, *Dictyostelium* и *Chlamydomonas* имеет малое различие с КМ позвоночных. Сравнение аминокислотного состава КМ шпината с КМ крысы показало, тем не менее, различия в ряде аминокислотных последовательностей. Девять отличий найдены в С-терминальной половине молекулы. Две отличительные позиции 26 (Thr-Cys) и 96 (Gly-Glu) находятся в Ca^{2+} -связывающих петлях.

Аминокислотный состав и их последовательность в КМ *Chlamydomonas* показали четыре отличительные черты в структуре, которые отсутствуют в КМ других растений и животных. Они включают вытянутый 11-й остаток КМ *Chlamydomonas*, уникальные единственные остатки на позиции 81 и 118 и метилированный лизин вместо триметиллизина на позиции 115. Поскольку КМ из этого вида может активировать НАД-киназу растений в большей степени, чем позвоночных или высших рас-

тений, то возможно, что уникальные структурные особенности (преимущественно неметилованный лизин – на 115-й позиции) могут оказаться важными для определения максимальной массы НАД-киназы.

Выявлено, что КМ входит в качестве субъединиц в состав НАД-киназы и киназы фосфоорилазы 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. В гомогенате тканей растений распределяется как в растворимой, так и в структурных фракциях. В клетках листьев пшеницы, как установлено, в цитоплазме находятся от 89 до 93 % общего КМ, тогда как в митохондриальной, хлоропластной и микросомальной фракциях содержится соответственно от 5 до 9, от 1 до 2 и < 1% от общего КМ. Концентрация КМ в этиолированных тканях гороха выше в растущих клетках кончика корня, в которых происходят активные метаболические процессы. Однако в зеленых частях гороха содержание КМ выше в листовой ткани. Другие авторы указывают на более высокое содержание КМ в кончике корня кукурузы по сравнению с основанием корня.

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 спираль – петля – спираль – домен. 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 итоге биологический ответ.

Механизм активации ряда ферментов КМ происходит в две стадии: (1) Ca^{2+} связывается с КМ, вызывая изменение конформации его молекулы и (2) активная конформация КМ взаимодействует с неактивным или частично активным ферментом, вызывая его активацию. Показано, что существует четыре конформационных состояния Ca^{2+} -КМ комплекса, 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 и нечувствительные к Ca^{2+} .

В *Ficus* обнаружены изменения в свойствах СаСБ во время развития. Ряд авторов выделили несколько СаСБ из экстракта эмбриональных тканей моркови. Некоторые из них были найдены во время эмбриогенеза и начального развития. СаСБ с ММ 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 кальцийсвязывающего белка, как считает ряд исследователей, может выполнять и ферредоксин.

После реализации клеточного ответа на внешний сигнал Ca^{2+} из цитозоля у одних клеток удаляется через плазматическую мембрану во внешнюю среду, у других – транспортируется преимущественно во внутриклеточное депо. Так, в мышечных клетках большую роль играет саркоплазматический ретикулум (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 накоп-

ление 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 стромах хлоропластов низкая, но увеличивается при освещении. Система регуляции концентрации Ca^{2+} в хлоропластах, возможно, включает АТФазу мембран хлоропластов, стимулируемую Ca^{2+} , Mg^{2+} и кальмодулином. Функционирование Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой АТФазы предполагается также в ядрах растительных клеток.

В свою очередь, Ca^{2+} может участвовать в регуляции уровня цАМФ, влияя на активность ферментов его обмена. С другой стороны, мы уже отмечали, что цАМФ также участвует в регуляции уровня Ca^{2+} . Как уже указывали, Ca^{2+} стимулирует активность протеинкиназ.

Протеинкиназы (ПК) обладают цАМФ-связывающими и фосфорилирующими свойствами. Эти ферменты (ПК) состоят из четырех субъединиц – двух регуляторных и двух каталитических. Связывание цАМФ с ПК обеспечивается SH-группами белка.

Существуют две формы цАМФ-зависимых ПК, которые различаются своими регуляторными субъединицами. Протеинкиназы локализованы главным образом в цитозоле, однако есть данные, что имеются мембран-связанные ПК.

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, ПК переносятся в ядро.

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

Протеинкиназная активность в растениях найдена в плазмалемме, тонопласте, хлоропластах, в цитозоле. В пластидах ПК обнаружили в

оболочках и тилакоидах, из которых она выделена и очищена. Это – пептид с ММ 64 кДа. 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. Недавно показано, что в колеоптилях кукурузы, на которые действовали далеким красным светом увеличивалось соотношение НАДФ(Н)/НАД(Н). Это отражает активацию, локализованной на наружной митохондриальной мембране НАД-киназы 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 подтверждают, 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 кальмодулина. Эти ферменты перечислены в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Ca^{2+} -кальмодулинзависимые энзимы

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

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

Открытие кальмодулина в растениях и Ca^{2+} -кальмодулинзависимых энзимов внесли 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.

Лекция 5

СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ С УЧАСТИЕМ МЕДИАТОРОВ

В тканях животных функционируют сложные системы регуляции – холинэргическая, серотонинэргическая, дофаминэргическая, гистаминэргическая, система ГАМК. В состав компонентов каждой из систем регуляции включен низкомолекулярный медиатор, ферменты его синтеза и катаболизма, чувствительный к нему рецептор. Они участвуют в оперативном восприятии и передаче внешнего возбуждения по организму и реализации быстрой ответной реакции. Направленная передача сигнала осуществляется в особых контактах–синапсах, состоящих из двух клеток, разделенных узкой синаптической щелью, с помощью диффундирующих ацетилхолина и биогенных аминов.

Медиатор синтезируется в аппарате Гольджи пресинаптической клетки и хранится в секреторных пузырьках, из которых при возбуждении экскретируется в синаптическую щель, и затем диффундирует к плазматической мембране постсинаптической клетки – приемнику сигнала. Соединяясь с рецептором плазматической мембраны, медиатор передает информацию. При этом активированный рецептор претерпевает конформационные изменения, в результате чего происходит изменение проницаемости этой мембраны путем открывания ионных каналов или включения системы синтеза вторичных внутриклеточных посредников – регуляторов физиологических процессов. И в том, и в другом случае формируется быстрая ответная реакция клетки на раздражение.

В клетках животных имеются все структурные элементы указанных систем регуляции. Одним из таких элементов в клетках тканей животных является регуляторный белок (G-белок), способный связывать ГТФ (гуанозинтрифосфат). G-белки играют центральную роль в механизмах передачи сигнала с поверхности внутрь клеток животных. Подобные белки обнаружены в плазмалемме корней высших растений. Молекулярная масса (ММ) ГТФ-связывающих белков у растений и животных примерно равны 90 кДа. Содержание этих протеидов в плазмалемме корней кукурузы составляет ~ 0,4 % всего мембранного белка.

В клетках животных обнаружены G_s и G_i -белки. При определенных условиях рецепторный белок G_s взаимодействует с каталитическим компонентом аденилатциклазы и активирует ее, при взаимодействии с G_i -белком активность снижается.

Общая схема действия медиаторов представлена на рис. 5.1.

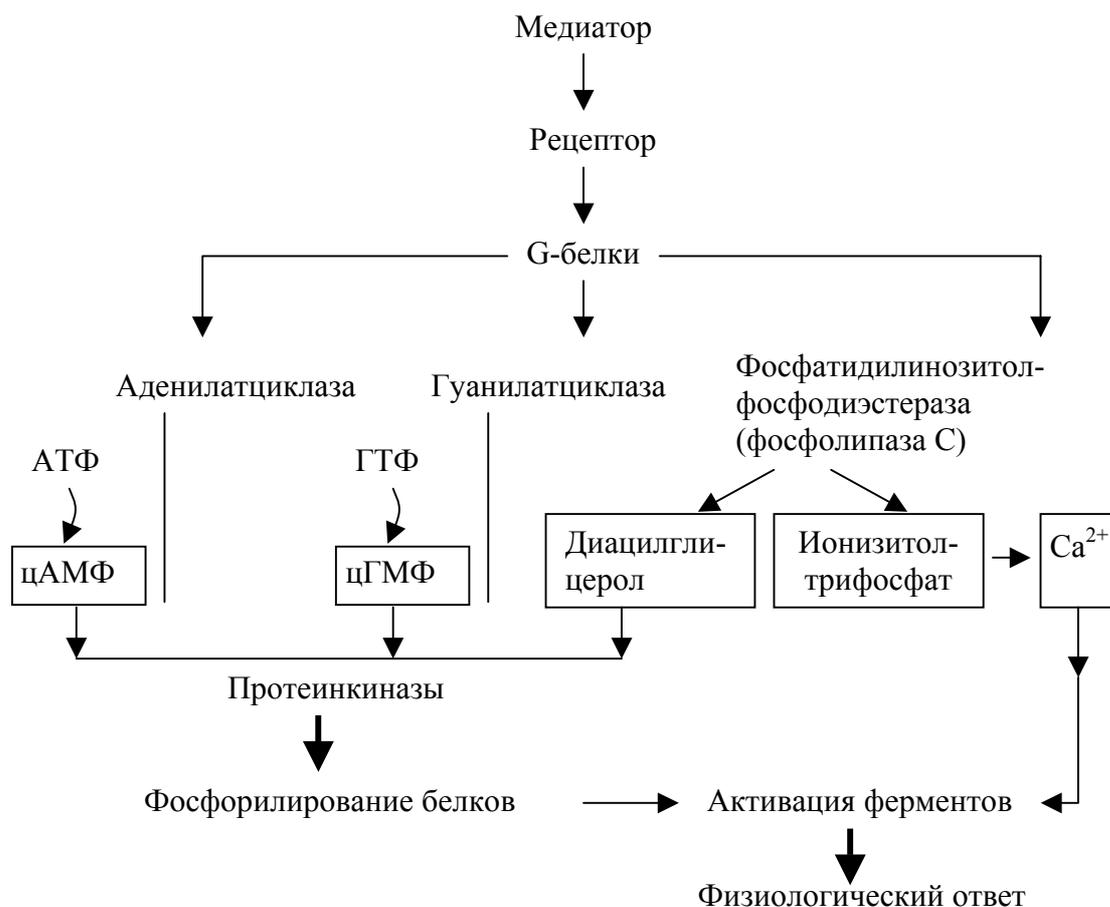


Рис. 5.1. Общая схема действия биомедиаторов

В отличие от животных, в растениях нет нервной системы и синапсов, а следовательно, специализированной передачи нервного импульса. Однако в них присутствуют соединения, которые являются медиаторами у животных, т. е. могут вызывать заметные физиологические изменения. Аналогичное явление характерно для низкоорганизованных животных организмов, не обладающих нервной системой. Это позволяет предполагать присутствие компонентов холинэргической, адренэргической, дофаминэргической и серотонинэргической систем в любой живой клетке.

5.1. Холинэргическая система регуляции

Эта система регуляции животных включает в себя четыре компонента – ацетилхолин, холинорецептор, фермент синтеза ацетилхолина, ацетилхолинтрансферазу и фермент гидролиза холинэстеразу.

Холинорецептор животных представляет собой пентамерный гликопротеин, имеющий сродство к ацетилхолину и определенным фармакологическим агентам, которые могут блокировать физиологическое действие ацетилхолина (антагонисты) или, наоборот, имитировать его (агонисты). Рецептор состоит из трансмембранных полипептидов четырех разных типов, каждый из которых кодируется отдельным геном.

Для изучения свойств изолированного или связанного в мембране рецептора используются несколько методов: наиболее часто фармакологический, метод радиоактивных меченых лигандов или их комбинаций. Методы основаны на изучении процессов взаимодействия лиганда с рецептором.

Лиганды – это соединения, связывающиеся с соответствующим рецептором, причем одни из них являются агонистами, другие – антагонистами. Агонистами ацетилхолина являются: мускарин, ареколин, никотин, а антагонистами – атропин, d-тубокурарин, α -бутаротоксин.

Итак, фармакологический метод состоит в получении концентрационных кривых действия ацетилхолина, его агонистов (имитаторов) и антагонистов на отдельные реакции исследуемого органа, ткани, клетки, органеллы, управляемых холинорецепторами. В физиологии животных обычно исследуются изменения мембранных потенциалов, ПД и Na^+/K^+ обмен.

Метод радиоактивных лигандов заключается обычно в выделении рецепторов или обогащении ими препаратов с последующим изучением кинетических характеристик их связывания с лигандом. Характерными признаками наличия рецепторов для медиаторов и гормонов в мембранах животных и растений считаются следующие:

1. Рецептор должен проявлять высокую избирательность и специфичность в отношении лиганда и должен различать вещества по структуре.

2. Эффект должен вызываться низкими концентрациями (10^{-10} – 10^{-7} М) агониста и быть избирательно чувствительным именно к этим соединениям.

3. Кинетика связывания лиганда должна описываться кривой с насыщением, т. к. число рецепторов на мембране ограничено.

4. Антагонисты агента эффектора, связываясь с рецептором, должны препятствовать проявлению индуцированной эффектором реакции.

5. Тканевая специфичность.

Одним из основных отличий рецепторного связывания от нерепторного является быстрый физиологический ответ на гормональный или

медиаторный эффектор и соответствующие величины констант связывания (10^{-9} М и ниже).

Ацетилхолиновый рецептор был впервые выделен в начале 70-х гг. из электрического ската *Torpedo* с помощью полипептидных нейротоксинов из яда змей.

При взаимодействии с ацетилхолином рецептор претерпевает конформационные изменения, ведущие к образованию трансмембранного ионного канала или управлению работой существующих ионных каналов.

По чувствительности к некоторым агонистам ацетилхолина – никотину или мускарину – различают никотиновые и мускариновые холинорецепторы. Эти два типа холинорецепторов блокируются разными антагонистами ацетилхолина: никотиновые – d-тубокурарином, а мускариновые – атропином.

Никотиновый холинорецептор (рис. 5.2) представляет собой сложный белок с молекулярной массой 250–300 кДа и состоит из 5–6 субъединиц с молекулярной массой примерно 40, 48, 58 и 66,5 кДа, которые образуют ионный канал.

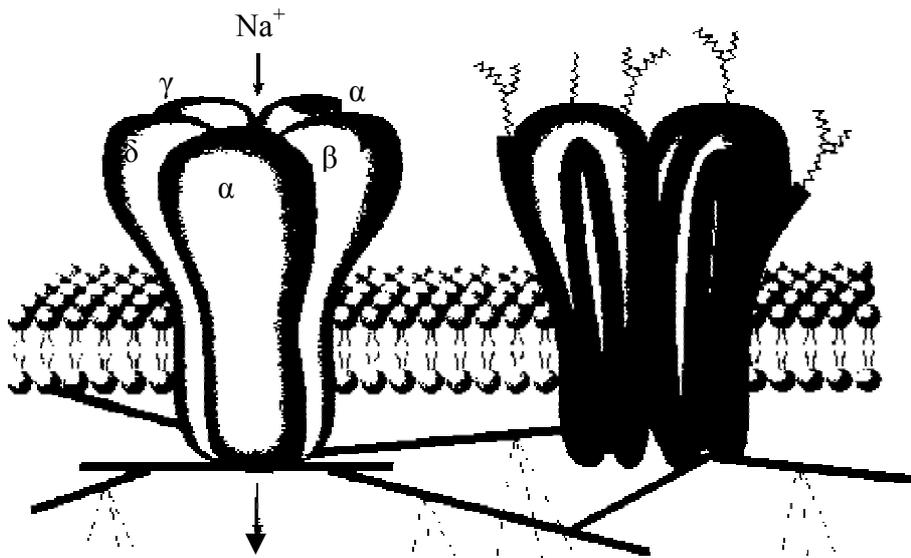


Рис. 5.2. Схема расположения никотинового холинорецептора в мембране животных клеток. Отдельные субъединицы рецептора образуют натриевый канал

При возбуждении нервной клетки α -субъединица связывает ацетилхолин, 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 ацетилхолина. Первый – отрицательно заряженный анионный центр, который определяется карбоксильными группами глутамата или аспартата. Этот участок рецептора вступает во взаимодействие с положительно заряженной «головкой» молекулы ацетилхолина. Второй – эстерофильный положительно заряженный центр 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. Рецептор действует как ионофор, открывая ацетилзависимый ионный канал, что ведет к импульсному поступлению Na^+ в клетку и выходу из нее K^+ .

Ацетилзависимый канал имеет несколько дискретных альтернативных конформаций и в присутствии лиганда переходит из одного состояния в другой, внезапно открываясь или закрываясь. Связав ацетилхолин и перейдя в открытое состояние, канал остается в течение некоторого времени открытым; это время варьирует и составляет в среднем 1 мс. Ток через канал создают в основном ионы Na^+ и K^+ , а также некоторое количество ионов Ca^{2+} . При этом мембранный потенциал резко снижается. Когда деполяризация достигает определенного уровня, возникает ПД, вызывающий открывание потенциалзависимых ионных каналов. ПД распространяется в виде электрического импульса по мембране. Ионы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} в качестве регуляторов и вторичных посредников оказывают решающее влияние на эффективность процессов обмена. Превращение энергии, образование АТФ и потребление АТФ контролируется соответствующими ионами.

Другой путь действия рецептора состоит в том, что он включает пусковые механизмы систем синтеза вторичных посредников. При этом происходит активация аденилатциклазы, катализирующей образование вторичного мессенджера цАМФ на внутренней стороне плазмалеммы, что, в свою очередь, вызывает целый каскад реакций внутри клетки. Скорость обычной реакции в этом случае ниже, чем ионофорного механизма.

Наряду с открыванием ионных каналов связывание ацетилхолина с мускариновым рецептором сопровождается увеличением концентрации цАМФ и цГМФ и образуемых при гидролизе фосфатидилинозитол фос-

фата диациглицерола и инозитолфосфата. Взаимодействие с никотиновым рецептором приводит только к открыванию ионных каналов.

Наличие компонентов ацетилхолинэргической системы (ацетилхолина, холинацетилтрансферазы и холинэстеразы) инициировало исследования, направленные на поиски холинового рецептора в растениях. Был проведен ряд работ по выяснению реакции растений на действие ацетилхолина и его агонистов и антагонистов.

Целенаправленные поиски холинорецептора у растений показали, что d-тубокурарин – антагонист ацетилхолина – ингибирует стимулированное красным светом (< 700 нм) поглощение ацетата натрия корнями *Phaseolus aureus*; но, с другой стороны, d-тубокурарин слабо ингибировал корневое давление у подсолнечника *Helianthus annuus*, которое обычно стимулируется ацетилхолином.

Ацетилхолин ингибирует выделение этилена дисками листьев сои, тогда как его антагонист атропин – стимулирует. Таким образом, эти данные в какой-то степени могут свидетельствовать о возможном присутствии рецептора ацетилхолина в растительных клетках.

Предполагалось, что у растений рецептором ацетилхолина может быть хромпротеид – фитохром. Это связано с тем, что в ряде опытов ацетилхолин имитировал действие красного света на управляемые фитохромом процессы. Последнее тем более вероятно, что светочувствительный белок может управлять ионной проницаемостью. Однако ряд исследователей отрицают прямое действие ацетилхолина на фитохром, поскольку не обнаружили эффектов его действия на такие управляемые фитохромом процессы, как синтез антоциана и никтинастические движения листьев ряда растений.

В последние годы польскими исследователями показано, что разветвление листьев этиолированными проростками пшеницы стимулируется как ацетилхолином, так и его агонистами – мускарином и никотином (1 мкМ) в присутствии ионов Ca^{2+} и Na^+ . Напротив, антагонисты ацетилхолина атропин и d-тубокурарин (10 мкМ) 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. 5.3). Помещенные в раствор $0,5$ мМ CaCl_2 , $0,1$ мМ KCl или $0,1$ мМ NaCl , протопласты не изменялись в объеме после 3-минутного освещения дальним красным светом. Однако протопласты, освещенные дальним красным светом, а затем обработанные АХ в темноте, достигали объема протопластов, облученных одномоментным импульсом красного света. В противоположность с фитохром-контролируемым набуханием эффекты наблюдались не только в присутствии Ca^{2+} , но и K^+ или Na^+ .

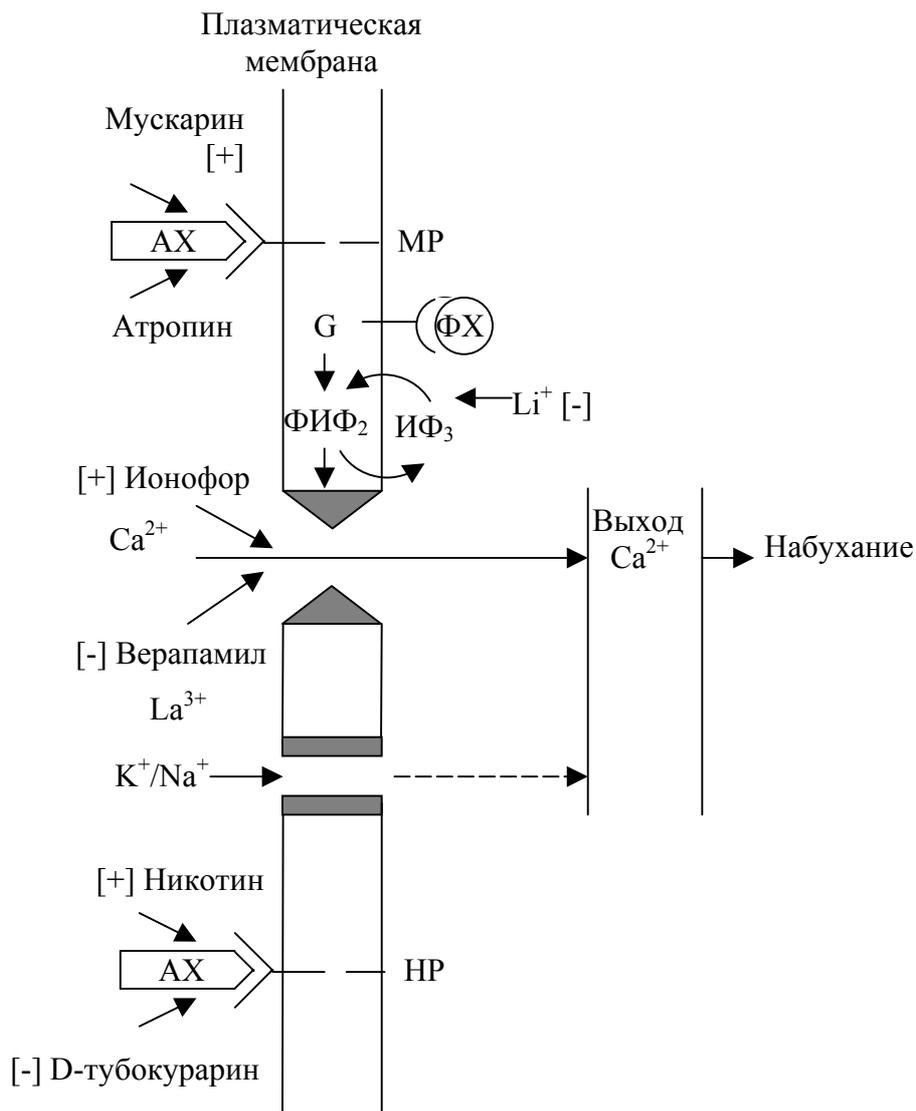


Рис. 5.3. Схема действия АХ на набухание протопластов

Максимальное набухание протопластов отмечалось в растворе, содержащем 1 мкМ АХ, сразу же после его введения в среду. Кроме АХ только карбомоилхолин стимулирует набухание. Все это дает возможность заключить, что АХ специфически действует на набухание этиолированных протопластов мезофилла листа пшеницы.

Далее блокаторы кальциевых каналов (нифедипин и La^{3+}) ингибировали АХ-стимулируемое Ca^{2+} -зависимое набухание протопластов. Такое же влияние оказывали Li^{+} , ингибиторы кальмодулина и ингибитор Гр-белка. Ни одно из указанных веществ, за исключением ингибиторов кальмодулина, не влияло на АХ-стимулирующее $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$ -зависимое на-

бухание. При изучении действия агонистов и антагонистов рецепторов АХ в средах, содержащих Ca^{2+} , K^+ или Na^+ , было установлено следующее. Никотин в концентрации 0,1 мкМ 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 МР) в концентрациях от 1 до 10 мкМ в средах с K^+ или Na^+ не влияет на объем протопластов. Однако в присутствии Ca^{2+} атропин нейтрализовал стимулирующее действие АХ. D-тубокурарин (антагонист НР) в присутствии Ca^{2+} незначительно подавлял набухание, тогда как в средах с K^+ или Na^+ полностью блокировал эффект АХ.

Присутствие ацетилхолина в хлоропластах и его эффекты на некоторые реакции фотосинтезирующих мембран послужили основанием для поиска в хлоропластах рецепторов ацетилхолина.

Данные, полученные по изучению влияния ацетилхолина, его агонистов и антагонистов на мембранные реакции хлоропластов, приведены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Характеристика холинорецепторных свойств мембран хлоропластов

Реакция	Минимальная концентрация агониста, вызываемый эффект, М				Антагонист, блокирующий эффект, индуцируемый АХ	Насыщение концентрационной кривой АХ
	АХ	М	АР	КХ		
Фосфорилирование	+	–	++	+	Атропин, α -бунгаротоксин, хинуклидинилбензилат	Есть
Na^+ -поток (выход)	++	++	++	+	Атропин, d-тубокурарин, α -бунгаротоксин	Есть

Примечание: АХ – ацетилхолин, М – мускарин, АР – ареколин, КХ – карбамоилхолин, ++ – сильная стимуляция, + – слабая стимуляция, – ингибирование.

Как видно из табл. 5.1, подобно ацетилхолину, его агонисты мускарин и ареколин стимулируют выход натрия и калия из интактных хлоропластов гороха и поглощение тилакоидами ионов H^+ .

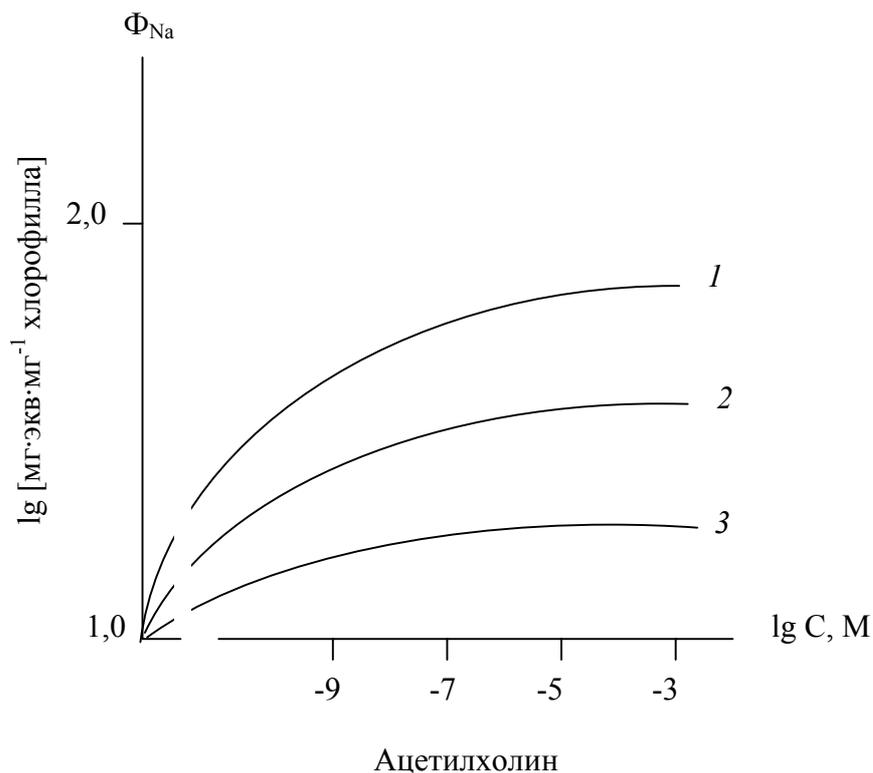


Рис. 5.4. Влияние агонистов ацетилхолина на выход ионов Na^+ из хлоропластов гороха, предварительно обработанных АХ: 1 – без блокаторов; 2 – атропин 10^{-6} М; 3 – d-тубокурарин 10^{-6} М

Антагонисты ацетилхолина (атропин 10^{-6} М, d-тубокурарин 10^{-6} М и др.) подавляли выход ионов Na^+ (рис. 5.4).

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 какой мере функциональный аналог напоминает холинорецептор животных? Сравнивая описанные физиологические ответы с участием холинорецептора у животных с данными, полученными на растительных клетках, можно отметить определенное сходство. Ацетилхолин и его агонисты вызывают в растениях изменения K^+/Na^+ проницаемости и деполяризацию плазмалеммы или внешней мембраны хлоропластов, это напоминает реакции с участием никотинового холинорецептора животных.

Как и в клетках животных, ацетилхолинтрансфераза в клетках растений локализована, главным образом, в цитоплазме и легко ассоциируется с клеточными мембранами в средах с низкой ионной силой.

Холинэстераза впервые была идентифицирована в 20-х гг. Леви в экспериментах, проводимых на сердце амфибий. В 1938 году фермент был обнаружен и у низших растений. Затем фермент был найден в плодовых телах шампиньонов, в бактериях. Таким образом, стало ясно, что фермент присутствует не только в организмах животных, обладающих нервной системой.

Для животных установлено два типа холинэстераз. Фермент, специфичный к ацетилхолину, называют истинной холинэстеразой, или ацетилхолинэстеразой.

Фермент, гидролизующий с высокой скоростью не только ацетилхолин, но и другие холиновые сферы – бутирилхолин, пропионилхолин и т. д., называют псевдохолинэстеразой или просто холинэстеразой.

Активность истинных холинэстераз 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 ацетилхолина с одной каталитически активной субъединицей ацетилхолинэстеразы, которые мешают друг другу принять правильную ориентацию в активном центре фермента. Возможно также взаимодействие избыточных молекул субстрата с аллостерическими центрами ацетилхолинэстеразы.

Также следует отметить, что антитела против ацетилхолинэстеразы не связываются с псевдохолинэстеразой. Холинэстеразы различаются по субстратной специфичности, чувствительности, это видо-, тканеспецифические ферменты.

Начало систематическим исследованиям холинэстераз растений было положено в 60-е гг. Холинэстеразная активность была обнаружена вначале у низших растений в экстрактах харовой водоросли нителлы. В дальнейшем было показано, что это явление присуще многим высшим растениям (табл. 5.3).

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 холинэстеразы. Самая высокая активность в листьях и зародышевых почках, например, для гороха $7 \text{ нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ сырой массы; особенно часто холинэстеразная активность обнаруживается у представителей семейства *Leguminosae*, в основном в корнях. Холинэстеразная активность обнаружена 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.

Таблица 5.3

Наличие холинэстеразной активности в экстрактах разных органов растений

Растения	Орган
<i>Nitella sp.</i>	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>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>Albizzia julibrissin</i>	Листья

Имеются сведения о том, что холинэстеразная активность обнаруживается даже у эмбриона и в клетках алейронового слоя семян пшеницы, 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 холинэстеразы растений в узнавании пыльцы своего вида рыльцем пестика цветков *Pharbitis nil*.

Относительно локализации холинэстераз в клетке известно, что в синапсах ацетилхолинэстераза находится преимущественно в постсинаптической мембране. Ацетилхолинэстеразная активность также обнаружена в ЭР и аппарате Гольджи нейронов, в ядрах и митохондриях клеток мозга.

В растениях холинэстераза содержится в плазмалемме, клеточной стенке и частично в цитоплазме клеток. У лишайника *Parmelia caperata* ацетилхолинэстераза сосредоточена в клеточных стенках или (и) плазматических мембранах обоих симбионтов – гриба и водоросли. К настоящему времени накоплены сведения о локализации фермента в различных клеточных компартментах в зависимости от органа и ткани растения (табл. 5.4).

Таблица 5.4

Локализация холинэстеразы в растительной клетке

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 ацетилхолина фракциями гомогената листьев 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 тилакоидов. 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 ацетилхолин, гидролизующий белок из корней *Phaseolus aureus*, отличается от неспецифических эстераз более высокими скоростями реакции ($K_m = 0,84 \cdot 10^{-4}$ М) и способностью ингибироваться эзерином и прозерпином. Неспецифические эстеразы имеют более высокие $K_m > 1$ М, чем холинэстеразы и отличаются по молекулярной массе.

Согласно некоторым данным, различают слабосвязанные (вымываемые буфером) и прочносвязываемые с мембранами (вымываемые буфером, содержащим 4,5 % сульфата аммония) фракции холинэстераз в растениях. Холинэстераза в экстрактах из проростков и корней гороха, а также из семян *Allium* имела несколько изоформ. Множественные формы обнаружены в слабосвязанной фракции ацетилхолинэстераз, 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.

Холинэстеразу удалось выделить не только из сформированных хлоропластов, но и из этиопластов гороха. В этиолированных пластидах содержание холинэстераз 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 ацетилхолин и ацетилтиохолин по сравнению с другими холиновыми эфирами. Кажущиеся константы K_m , характеризующие скорость гидролиза субстрата и сродство к нему активного центра холинэстераз растений, были одного порядка, что и для холинэстераз 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. 5.5).

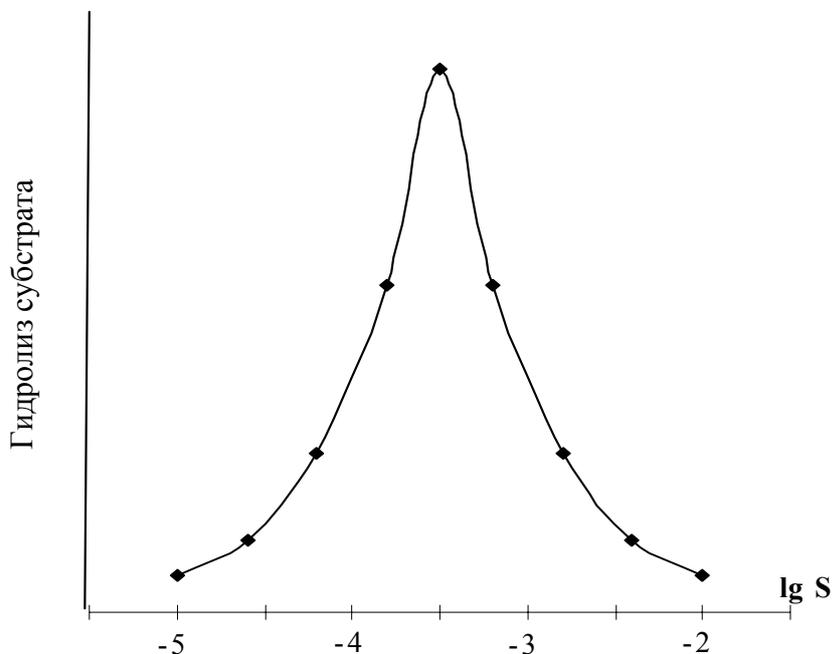


Рис. 5.5. Гидролиз АХ препаратами холинэстеразы из листьев гороха

Аналогичную форму имеет кривая гидролиза субстрата ацетилхолинэстеразой из нервной ткани, эритроцитов млекопитающих, электрического органа рыб. Специфический ингибитор псевдохоллинэстераз действует в экстрактах растений в высоких концентрациях ($\geq 10^{-3}$ М), тогда как ингибиторы ацетилхолинэстеразы – в концентрациях в 100 и более раз низких.

Следовательно, на основании полученных данных можно заключить, что холинэстеразы растений представляют собой в основном истинные холинэстеразы, или ацетилхолинэстеразы. Как и ферменты из животных тканей, они имеют у ряда растений оптимумы рН 8,0–8,3 и температуры 37–40 °С, но у большинства растений эти показатели все же более низкие: соответственно рН 7,8–8,0 и температура 30 °С, как и для псевдохоллинэстераз животных; есть данные, что в семенах *Allium altaicum* наряду с ацетилхолинэстеразами есть и псевдохоллинэстераза.

Пример аминокислотного состава очищенной холинэстеразы хлоропластов гороха приведен в табл. 5.5.

Таблица 5.5

**Аминокислотный состав очищенной холинэстеразы
из хлоропластов гороха**

Аминокислота	К-во 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 ацетилхолинэстеразой, 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, про-

лин – 38,5, глицин – 54). Отличия наблюдались главным образом в минорных остатках аминокислот.

Холинэстеразы из хлоропластов большинства исследованных растений имели молекулярную массу субъединиц 31–63 кДа, что сопоставимо с холинэстеразой из микросом кролика (65–70 кДа). Высокомолекулярные формы холинэстераз из листьев иногда разделялись на субъединицы с меньшими молекулярными массами, хотя считают, что белки с молекулярной массой 63,1 кДа являются мономерными. Более мелкие пептиды (< 60), как считают исследователи холинэстераз животных, являются продуктами автопротеолиза самого фермента. В отличие от большинства холинэстераз, молекулярные массы эстераз других растений (например, плодов тыквы) составляют 36 и 18 кДа.

Субстратная специфичность холинэстераз растений проявляется по отношению к ацетилхолину и ацетилтихолину. Скорость гидролиза других холиновых и нехолиновых эфиров с участием ферментов представлена в табл. 5.6.

Таблица 5.6
Скорость гидролиза некоторых эфиров
(в % от варианта с ацетилхолином)

Эфир	% к контролю
Пропионилтихолин	41
Бутирилтихолин	0–38
Индоксилацетат	67
Индофенилацетат	62
α -нафтилацетат	0–17
Аденозинтрифосфат	0,13

При хранении холинэстеразы 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 холинэстераз с их субстратами (холиновыми эфирами) можно представить следующим образом (рис. 5.6).

Субстрат обычно связывается с двумя участниками холинэстеразы. Карбо (–CO – O) группа холиновых эфиров присоединяется водородными связями к эстеразному центру фермента, выполняющему собственно гидролизующую функцию, а –N– группа ацетилхолина (катионная головка) соединяется с анионным центром холинэстеразы, который выполняет лишь функцию правильной ориентации субстрата.

Холинэстеразы растений, как и холинэстеразы животных, чувствительны к производным карбаминовой кислоты (прозерин, эзерин) и фосфорорганическим соединениям (дихлорофос, фосфон) и четвертичным аммонийным соединениям.

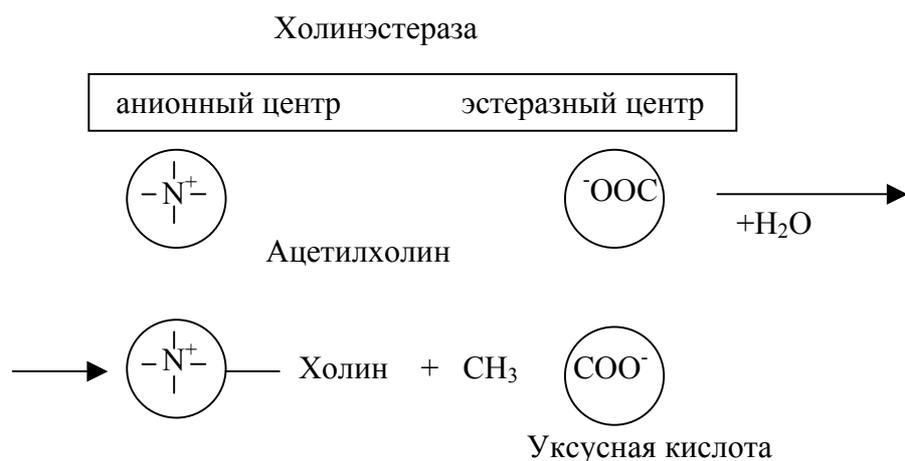


Рис. 5.6. Схема взаимодействия холинэстераз с субстратом

В целом чувствительность к прозерину у холинэстераз растений ниже, чем у ферментов из тканей животных. Сродство к эзерину всех растительных холинэстераз 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. 5.6) можно легко понять эффект ингибирования различными веществами холинэстераз. Например, соли карбаминовой кислоты (прозерин, эзерин) в низких концентрациях (10^{-5} М – 10^{-6} М) угнетают активность ферментов гидролиза холиновых эфиров. Аминогруппа ингибитора, находящаяся рядом с карбонильной группой, связывается с анионным центром холинэстеразы, не затрагивая эстеразный центр. Ингибирование носит конкурентный характер и может быть обратным.

Холинэстераза латекса *Synadenium grantii* обладала более высокой, по сравнению с другими растениями, чувствительностью к карбаминовым ингибиторам. Возможно, что в млечниках этого растения фермент, чувствительный к ядам, выполняет защитную роль.

Фосфорорганические соединения (ФОС) связываются со всеми серинсодержащими белками, в т. ч. с холинэстеразами. Фосфорорганические соединения присоединяются группировкой PO_4 к серину эстеразного центра холинэстеразы. Такие вещества действуют как конкурентные ингибиторы, и в большинстве случаев эффекты необратимы. ФОС проявляют меньшую избирательность к холинэстеразам, чем карбаминовые ингибиторы. Например, они могут включаться в субъединицы холинэстеразы фасоли с ММ 61, 23 и 17 кДа, а также в серинпротеазы из тила-

коидов 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 холинэстераз.

Холинэстеразы растений имеют более низкое сродство анионного центра к фосфорорганическим соединениям, чем аналогичные ферменты млекопитающих, но весьма сходны с ферментами беспозвоночных, например морских звезд. Применение многих пестицидов связано с подавлением холинэстеразной (ХЭ) 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 карбаминной кислоты или четвертичные амины (хлорхолинхлорид и др.) также действуют на холинэстеразу растений. Поэтому испытания новых веществ – регуляторов роста на холинэстеразную активность растений могут иметь важное значение для сельскохозяйственных и природоохраненных мероприятий, поскольку можно целенаправленно планировать получение высокоспецифичных и малотоксичных соединений.

Факторы среды действуют на активность холинэстераз. В темноте скорость синтеза ферментов ниже, чем на свету. На дальнем красном свету скорость синтеза холинэстераз выше, чем на красном свету. Но каталитическая активность не зависит от световых условий. Синтез холинэстераз стимулируется ИУК, а в высоких концентрациях ингибируется ацетилхолином, 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 холинэстеразы из латекса температурный оптимум был выше (40 °С), что может быть связано с тропическим происхождением растения. Ионы металлов также оказывают действие на холинэстеразу (табл. 5.7).

Таблица 5.7

**Влияние ионов на активность холинэстеразы
в побегах гороха (в % к контролю)**

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^+ , Mg^{2+} стимулируют холинэстеразную активность в побегах гороха на 30–60 %, а тяжелые металлы Cu^{2+} и Cd^{2+} столь же сильно угнетают процесс. Ca^{2+} и Be^{2+} вообще не действуют. Однако 1–10 мМ Ca^{2+} ингибируют ХЭ из корней фасоли, а Mg^{2+} на нее не действует. Следовательно, в зависимости от условий, вида тканей и растений возможны отклонения от приведенных для побегов гороха зависимостей. Приведенные выше результаты дают возможность сделать заключение о наличии в растениях холинэргической регуляции.

5.2. Системы регуляции с участием биогенных аминов

Катехоламины, серотонин, гистамин, так же как и ацетилхолин, входят в состав сложных систем регуляции у животных. Составляющие элементы этих систем представлены на рис. 5.7.

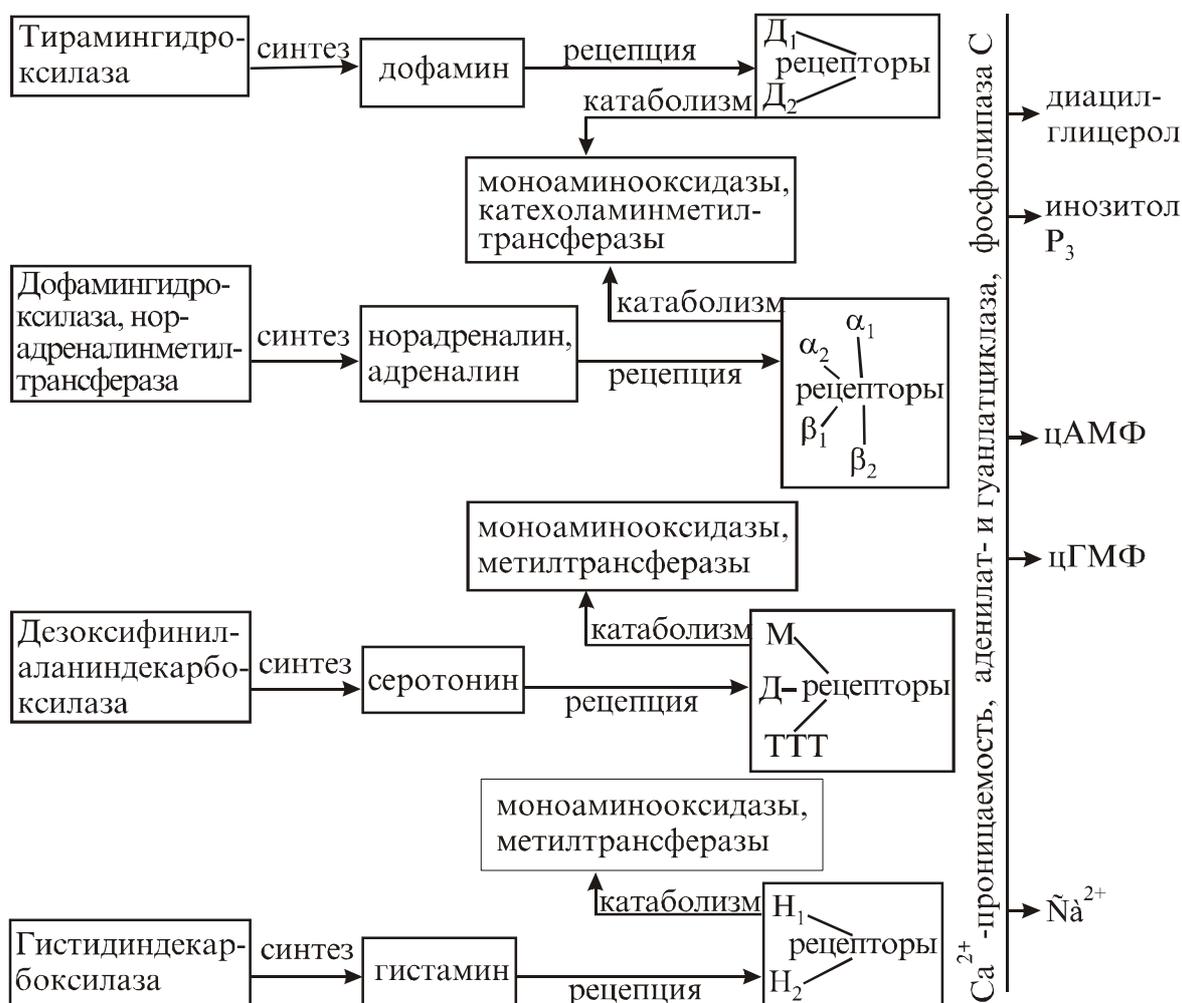


Рис. 5.7. Системы регуляции с участием биогенных аминов

В мембранах клеток животных имеются особые рецепторы дофамина (D₁- и D₂-дофаминовые рецепторы), адреналина и норадреналина (α- и β-адренорецепторы) серотонина (M-, D-, T-серотониновые рецепторы) и H₁-, H₂-гистаминовые рецепторы.

У каждой группы рецепторов есть агонисты и антагонисты, некоторые из них перечислены в табл. 5.8.

Таблица 5.8

Агонисты и антагонисты биогенных аминов

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, изадрин
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 – это 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 перидоны. К антагонистам серотонина относится и природное соединение лизергиновая кислота – сильный галлюцинационный яд. В качестве агонистов гистамина выступают его метилированные метаболиты, а агонистами H₁-группы – дифенолы, H₂-группы – амиды.

Недавно с помощью аффинной хроматографии из тканей животных выделен и очищен D₂-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.

Проводятся также эксперименты, на основании которых делаются выводы о наличии рецепторов биогенных аминов на растительных объектах. В первую очередь следует назвать данные по влиянию агонистов

(адреналин, норадреналин, изадрин) и антагонистов (адреноблокаторов – индерал, дигидроэрготоксин и др.) катехоламинов на мембранный потенциал и скорость движения цитоплазмы (циклоз) клеток *Nitella* (см. раздел 10.1).

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 свет и 16 ч темнота у *Lemna paucicostata*. Пропранолол (антагонист катехоламинов, блокатор β -адренорецепторов) частично подавляет цветение, вызванное катехоламинами.

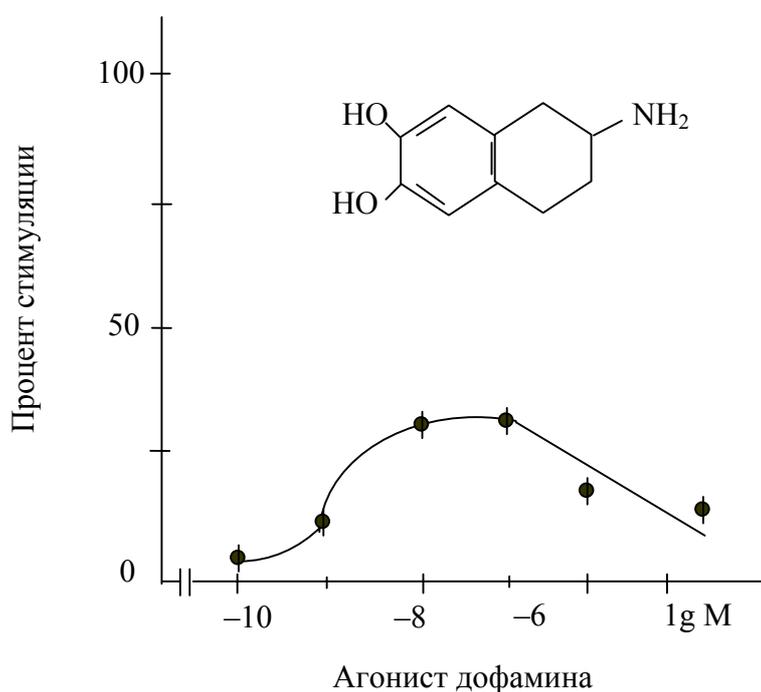


Рис. 5.8. Действие агониста дофамина 2-амино-6,7-дигидрокси-1,2,3,4- тетрагидро-нафталена гидробромида на фотофосфорилирование с НАДФ⁺ и ферредоксином в изолированных хлоропластах гороха

Установлено также, что низкие ($<10^{-5}$ М) концентрации адреналина, норадреналина, а также дофамина стимулируют фотофосфорилирование и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ проницаемость мембран хлоропластов гороха. Далее было показано, что селективный агонист дофамина – 2-амино-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидронафтален гидробромид вызывал стимуляцию синтеза АТФ в концентрациях 10^{-8} – 10^{-7} М (рис. 5.8).

Его действие имитировало эффект, вызываемый катехоламинами в тех же концентрациях. Константы связывания дофамина и его агониста равны 10^{-9} и $2 \cdot 10^{-9}$ М соответственно.

Антагонист катехоламинов – адреноблокатор иохимбин (10^{-10} – 10^{-6} М) 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} М иохимбина пул предполагаемых рецепторов полностью заполнен, в результате чего стимуляции не наблюдалось (рис.5.9).

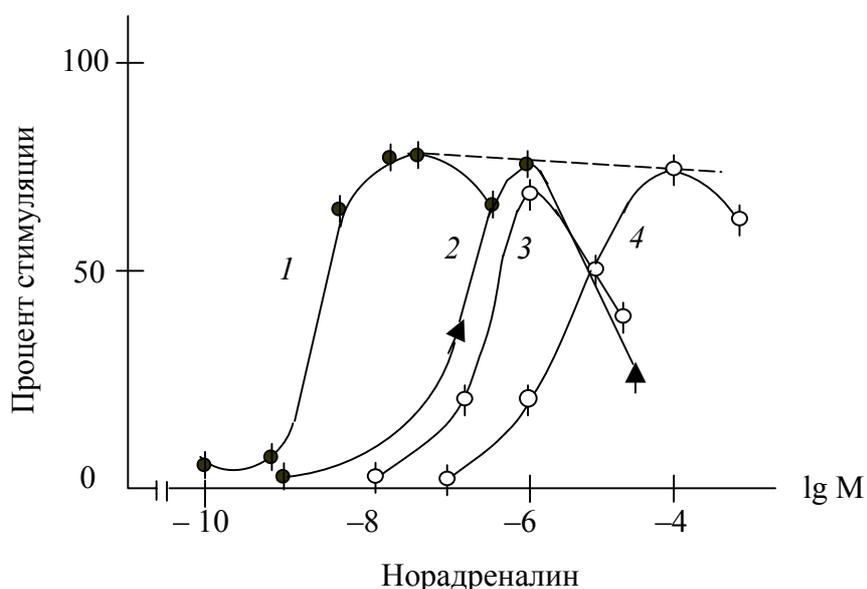


Рис. 5. 9. Влияние иохимбина на стимуляцию норадреналином фотофосфорилирования с НАДФ⁺ и ферредоксином в изолированных хлоропластах гороха:
1 – без иохимбина; 2–4 – на фоне иохимбина соответственно 10^{-8} , 10^{-7} и 10^{-6} М

Константы связывания норадреналина, его агониста адреналина и антагониста иохимбина соответственно равны 10^{-8} – $5 \cdot 10^{-9}$ и $1,1 \cdot 10^{-9}$ М.

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 цитохалазин В препятст-

вует стимуляции фотофосфорилирования норадреналина, а блокатор микротрубочек колхицин не оказывает подобного действия.

Другие биогенные амины, в частности антагонисты серотонина, 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} М).

Отметим, что блокаторы серотониновых рецепторов хлорпромазин трифторперазин являются одновременно ингибиторами кальмодулина. Развертывание листьев пшеницы блокируется и антагонистами серотонина и блокатором кальмодулина трифторперазином, но агонист Ca^{2+} -каналов активирует эту реакцию подобно ацетилхолину.

Агонист H_2 -типа гистаминового рецептора – 4-метилгистидин (одновременно ингибитор гистидиндекарбоксилазы) на 30 % снижает рост проростков шпината по сравнению с контролем.

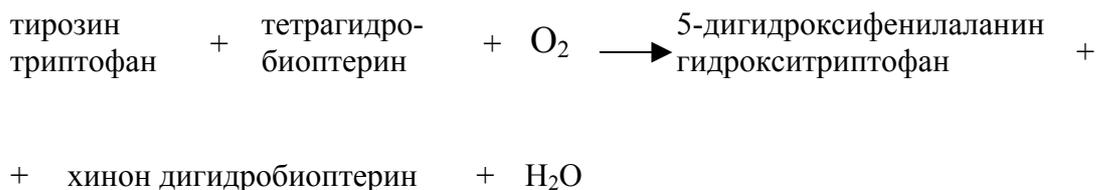
Следовательно, еще раз подчеркнем, что приведенные результаты могут указывать на возможность присутствия рецепторов биогенных аминов в растительных клетках.

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 диоксифенилаланин, а триптофан в 5-гидрокситриптофан. Тирозингидроксилаза, выделенная из тканей животных, гидролизует тирозин в присутствии тетрагидробιοптерина и кислорода. Эта гидроксилаза стимулируется ионами двухвалентного железа и имеет ММ от 32 до 220 кДа.

Триптофан-5-гидроксилазы гидролизуют триптофан сходным образом, с обязательным участием тетрагидробιοптерина и кислорода. Предполагается, что тирозингидроксилаза активируется 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.

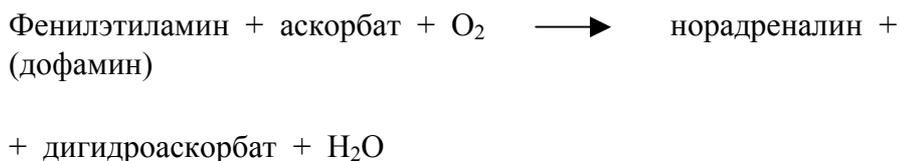
Общий вид гидроксилирования представляют следующим образом:



Возможно, что промежуточной стадией реакции является образование перекиси водорода.

Фермент L-триптофан-5-гидроксилаза, участвующий в превращении триптамина в серотонин, обнаружен во всех органах западноафриканского бобового растения *Griffonia simplicifolia*.

Помимо тирозин- и триптофангидроксилаз существует третий тип гидроксилаз – дофамин-β-гидроксилаза, превращающая фенилэтиламин до норадреналина и адреналина:



Нативный фермент имеет ММ 290 кДа, а субъединицы денатурированного белка – около 75 кДа. Фермент содержит медь в простетической группе.

Еще один фермент, 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.

Группа декарбоксилаз включает дигидроксифенилаланин декарбоксилазу, превращающую дигидроксифенилаланин в дофамин, декарбоксилазу (декарбоксилаза ароматических аминокислот), катализирующую образование серотонина из 5-окситриптофана, и гистидиндекарбоксилазу, декарбоксилирующую гистидин с образованием гистамина. Дигидроксифенилаланин декарбоксилаза 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 показано на листьях гороха в 1948 году. Установлено, что гистамин образуется только при введении L-гистидина в живой лист или срезы проростков шпината. Гистидиндекарбоксилазная активность найдена в прорастающих семенах хлопчатника. Гистидинде-

карбоксилаза, выделенная из бактерий и млекопитающих, имеет ММ 210 кДа с субъединицами 145 и 66 кДа.

В синтезе адреналина из норадреналина у животных принимает участие фермент фенилэтанол-амин-N-метилтрансфераза. Реакция протекает по схеме:

Норадреналин + S-аденозил-L-метионин-адреналин + S-аденозил-L-гомоцистеин

В растениях также предполагается присутствие подобного фермента.

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.

В растениях фермент, участвующий в реакции окислительного дезаминирования, был впервые обнаружен в проростках разных видов растений и идентифицирован как диаминоксидаза. Экстракты из *Trifolium pratense* и *T. repens* были способны в качестве субстратов использовать норадреналин и другие моноамины. В дальнейшем было показано, что не все диаминоксидазы способны утилизировать биогенные моноамины. Преимущественно они окисляют гистамин и диамины путресцин, кадаверин, спермидин.

В табл. 5.9 приводятся некоторые данные о присутствии у ряда видов растений диаминоксидаз, катализирующих окислительное дезаминирование гистамина и некоторых биогенных моноаминов; они обнаружены у 21 вида из 7 семейств. Фермент впервые был выделен и очищен из проростков гороха *Pisum sativum*. Его активность ингибировалась цианидом о-фенилтролином и др.

Активатором фермента служит медь. При взаимодействии с субстратом диаминоксидаза 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 диаминоксидазу 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.

Таблица 5.9

Диаминооксидазы в растениях

Вид	Орган	Субстрат
Artemisia	Листья	Гистамин
Glycine max	Корни, проростки	Гистамин, тираин, триптамин
Pisum sativum	Проростки	Моноамины, в т.ч. гистамин
Lavandula spica	Листья, стебель	Гистамин
Rosmarinus officinalis	Листья	Гистамин
Thymus vulgaris	Листья	Гистамин
Rubus	Листья	Гистамин

Основные сведения о моноаминооксидазе получены при изучении физиологии животных. Этот фермент дезаминирует и окисляет катехоламины до физиологически неактивных продуктов – ванилиновой кислоты, серотонин – до гидроксииндолилуксусной кислоты, а гистамин – до имидазоламиноуксусной кислоты.

По современным представлениям в состав моноаминооксидазы 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.

В зависимости от специфичности к субстрату различают А- и В-типы моноаминооксидаз. А-тип преимущественно использует адреналин, норадреналин и серотонин, тогда как В-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 моноаминооксидаз зависит от рН.

Основным местом локализации моноаминооксидаз в животной клетке являются митохондрии. У растений моноаминооксидазная активность впервые обнаружена у многих растений более 50 лет назад, однако катехоламины, серотонин, гистамин не являются субстратами для этого фермента. Предшественник серотонина триптамин окисляется и дезаминируется моноаминооксидазой клеток растений, в частности клеток колеоптилей овса *Avena*, до ИУК.

Таким образом, можно заключить, что в растениях присутствуют ферменты синтеза и метаболического превращения биогенных моноаминов, хотя они имеют свои отличительные особенности.

5.3. Участие вторичных мессенджеров в формировании биологического ответа клетки при действии биомедиаторов

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 в клетке двумя путями – включением синтеза вторичных посредников – цАМФ, цГМФ, инозитолтрифосфата или 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 – аденилатциклазы (АЦ) или гуанилатциклазы (ГЦ). Для того чтобы циклические нуклеотиды могли выполнять роль внутриклеточных медиаторов, их концентрация в клетке (обычно $< 10^{-6}$ М) 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 активацией 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 фосфодиэстераз 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. Ингибиторами фосфодиэстеразы являются метилксантины – кофеин и теофиллин.

Механизм сопряжения рецептора с синтезом циклических нуклеотидов лучше всего изучен для аденилатциклазной системы (рис. 5.10).

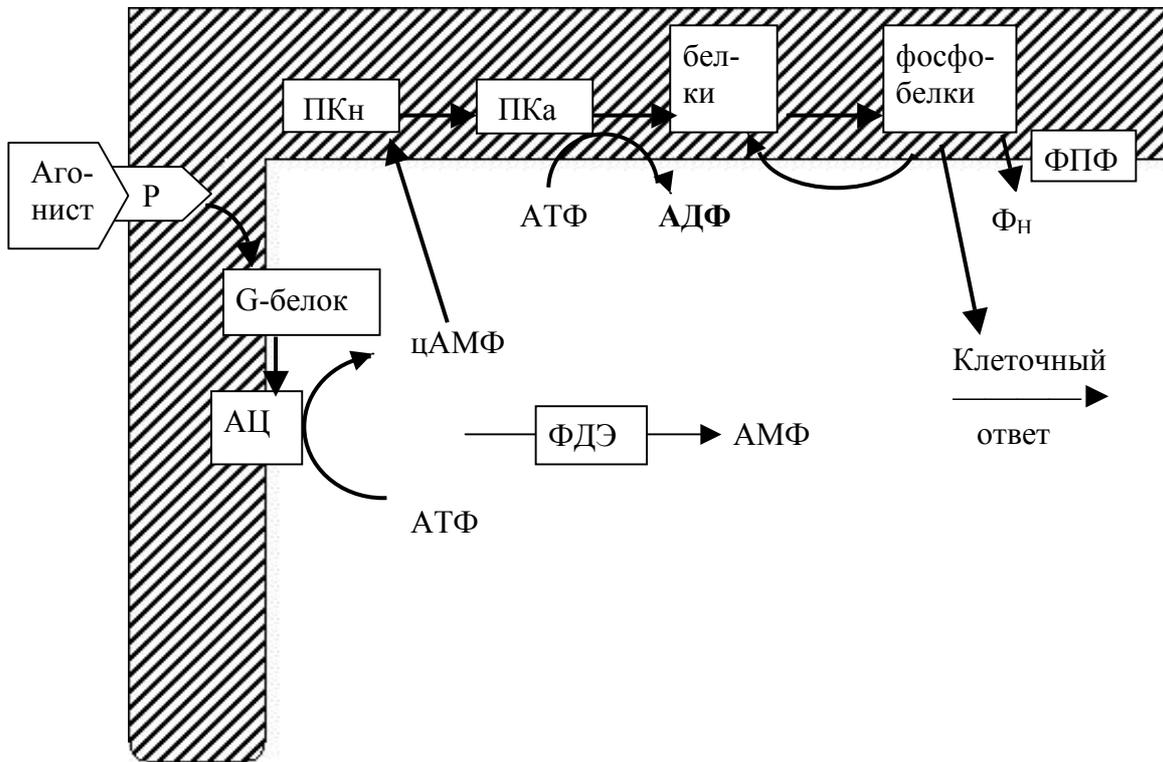


Рис. 5.10. Аденилатный путь регуляции внутриклеточных процессов

Этот процесс происходит следующим образом. Рецептор, воспринимающий сигнальные молекулы (медиаторы), располагается на внешней стороне мембраны, а аденилатциклаза – на ее внутренней стороне. Такое расположение создает условия для передачи внешнего сигнала внутрь клетки, где при участии вторичных посредников осуществляется регуляция внутриклеточных процессов. Аденилатциклаза активируется через разнообразные рецепторы не менее чем шестью медиаторами и гормонами, в том числе адреналином, норадреналином, дофамином, серотонином и гистамином.

Ацетилхолин может также включать и гуанилатциклазную систему. Активация аденилатциклазы 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), способным связывать 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 аденилатциклазы, 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 фосфопротеинфосфатазы.

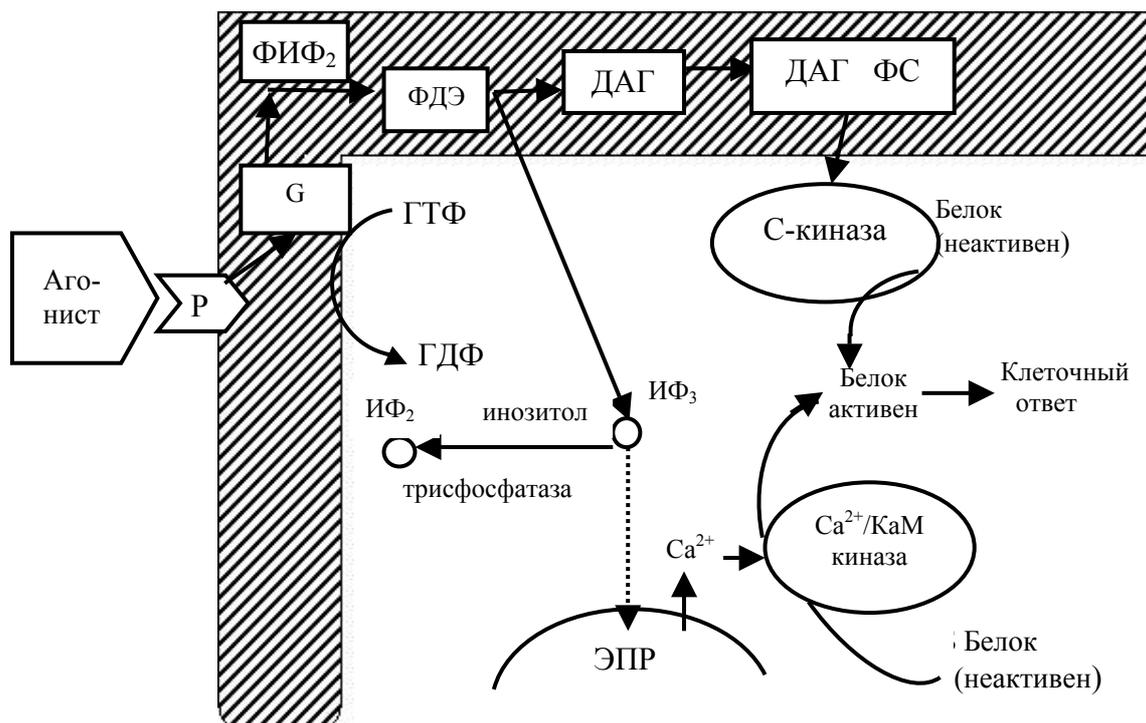
Гормоны и медиаторы могут проявлять свое действие не только через синтез цАМФ, но и других внутриклеточных посредников. Для некоторых гормонов животных вторичным посредником является цГМФ. Его концентрация в десять раз меньше, чем цАМФ. Подобно цАМФ, цГМФ действует главным образом через активацию соответствующих протеинкиназ.

Кальций также участвует во внутриклеточной регуляции в комбинации с двумя другими вторичными посредниками (рис. 5.11) – ионизитолтрифосфатом и диацилглицеролом.

Эффектор связывается с рецептором, который через ГТФ-связывающие белки активирует фосфодиэстеразу фосфатидилинозитолтрифосфата (ФИФ₂). При расщеплении ФИФ₂ образуется ионизитолтрифосфат (ИФ₃) и диацилглицерол (ДАГ).

ИФ₃ растворим в воде, поэтому он диффундирует в цитоплазму, где вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточного депо – эндоплазматического ретикулума (ЭПР).

Высвобожденный кальций активирует кальмодулинзависимую протеинкиназу (Ca^{2+} /Кам киназа), которая фосфорилирует белки-мишени, вызывая клеточный ответ.



5.11. Схема регуляции с участием кальция (пояснения в тексте)

Будучи гидрофобным, ДАГ 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 ацетилхолин и ряд биогенных аминов, которые оказывают влияние на ряд физиологических функций, установлено наличие цАМФ, ферментов их синтеза и катаболизма, протеинкиназ, кальмодулина и т. д.

Далее, о том, что циклические нуклеотиды и в растениях могут выполнять функцию вторичных посредников, свидетельствуют полученные к настоящему времени результаты. Так, экзогенный ацетилхолин (10^{-11} М) и цАМФ (10^{-9} – 10^{-4} М) снижали содержание АТФ в бобах фасоли, которое происходило, вероятно, в результате стимуляции аденилатциклазы. Напротив, блокатор холинорецептора атропин (10^{-4} М) резко

повышал количество АТФ, так как, по-видимому, не происходило образование цАМФ. В этом случае атропин нарушал сопряжение холинорецептора с аденилатциклазой. Действительно, в растениях выявлен такой фермент, как аденилатциклаза. Она обнаружена у растений в плазматической мембране, фракциях хлоропластов, ядер, митохондрий, тонопласте. Можно предполагать присутствие и рецепторов, связанных с аденилатциклазой. G-белки, играющие важную роль в передаче сигнала у животных, также обнаружены в плазмалемме клеток высших растений (например, клетках корневой системы).

В растительных клетках осуществляется фосфорилирование различных белков, в основном ферментов, управляющих мембранными процессами, такими как, например, открывание ионных каналов на плазмалемме, активирующими работу реакционных центров фотосистем и компонентов электрон-транспортной цепи и т. д. В растениях протеинкиназная активность найдена в плазмалемме, тонопласте, хлоропластах. В пластидах протеинкиназная активность обнаруживается в оболочке и тилакоидах. Протеинкиназа участвует в фосфорилировании реакционных центров фотосистем, АТФ-синтазы, цитохромов b_6 и f .

Недавно показано, что цАМФ в концентрациях 10^{-6} – 10^{-5} М участвует в эндогенном фотофосфорилировании белков диализованного кокосового молока.

Избыток цАМФ, как указывалось, может разрушаться фосфодиэстеразой, которая обнаружена у растений разных видов (горох, картофель, соевые бобы, артишок и т. д.). В тканях животных фосфодиэстераза 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.

Недавно в растениях установлено наличие цГМФ, обнаружены компоненты инозитолфосфатной системы вторичных посредников – фосфатидилинозитол фосфодиэстераза или просто фосфолипаза С, которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат с образованием диацилглицерола и инозитолфосфатов. Получено прямое доказательство влияния в микромолекулярных концентрациях инозитол-1,4,5-трифосфата на выделение Ca^{2+} в цитоплазму из внутриклеточного депо.

Роль кальция как вторичного мессенджера у животных и растений сейчас считается общепризнанной. Концентрация кальция в растительной клетке контролируется кальцийсвязывающим белком кальмодулином, который также можно считать частью вторичных систем регуляции.

Кроме аденилатциклазной системы, кальций и кальмодулин контролируют активность ферментов, принимающих участие в фоторазложении воды при фотолизе, деполяризацию мембран, секрецию материалов клеточной стенки, движение хлоропластов и листьев, рост, индуцированный гормонами.

Возможность индукции Ca^{2+} -обмена как мессенджера с участием кальмодулина можно предположить в растительной клетке и на уровне органелл, с которыми связываются биогенные амины. Например, норадrenalин, адреналин и серотонин стимулируют выход ионов кальция из интактных хлоропластов.

Таким образом, в растениях, вероятно, существуют системы внутриклеточной регуляции с участием биомедиаторов.

Лекция 6

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ У РАСТЕНИЙ

Способность генерировать электрические потенциалы – одно из универсальных свойств живых систем, которая играет важную роль в их жизнедеятельности. Известно, что биоэлектрические потенциалы в настоящее время подразделяются на два основных типа – это потенциалы покоя (ПП) и потенциалы возбуждения. ПП – это разность электрических потенциалов (РЭП) в покоящемся состоянии, а потенциалы возбуждения – изменение ПП при раздражении.

ПП, или мембранный потенциал, клетки 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.

На основе ПП формируются все типы электрофизиологической реакции клетки, в частности потенциалы возбуждения. В растениях потенциалы возбуждения представлены в основном двумя типами – потенциалом действия (ПД) и вариабельным потенциалом (ВП).

ПД возникают в ответ на определенную силу раздражения. ПД растений можно разделить на распространяющиеся, т. е. передающиеся с клетки на клетку в пределах органа или ткани, и местные, передающиеся в пределах только раздражаемых клеток.

Вариабельные потенциалы – специфические биоэлектрические реакции высших растений на повреждающие воздействия.

Из иных форм электрической активности следует выделить различного рода биоритмы, возникающие в ответ на эндо- и экзогенные факторы.

6.1. Потенциал покоя растительной клетки

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 включает в себе протопласт. Последний включает в себя цитоплазму и вакуоль. Цитоплазма содержит сложноорганизованные включения, ответственные за важнейшие процессы жизнедеятельности – фотосинтез (хлоропласты), дыхание (митохондрии) и размножение (ядро). Обычно слой цитоплазмы со всеми этими включениями прилегает к клеточной

стенке, а внутри протопласта большой или меньший объем занимает вакуоль – водный раствор различных солей и органических веществ. Иногда в клетке несколько вакуолей. Цитоплазма с прилегающей к клеточной стенке стороны окружена плазматической мембраной (плазмалемма), а со стороны вакуоли – тонопластом.

Измерение электрических параметров клетки и ее структурных элементов выполнить тем легче, чем крупнее ее размеры. Некоторые примеры величин мембранного потенциала растительных клеток приведены в табл. 6.1.

Таблица 6.1

Мембранный потенциал растительных клеток

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

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

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

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 микроэлектродов (МЭ) потенциал клеточной стенки харовых водорослей составлял $-40 \dots -70$ мВ. У высших растений его величина, возможно, несколько ниже и равна $-20 \dots -30$ мВ. Эти ре-

зультаты 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 $-80 \dots -100$ 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 равнялась $40-80$ мВ.

Таким образом, 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 и 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 величина ПП клеток основной паренхимы и эпидермиса стебля лежит в пределах $-130 \dots -160$ мВ.

Вклад электрогенной компоненты в величину РЭП у растений по сравнению с животными объектами нередко превалирует над величиной пассивной составляющей. Это обстоятельство является важной особенностью электрогенеза растений.

Схематически доленое участие компонент можно представить следующим образом (рис. 6.1).

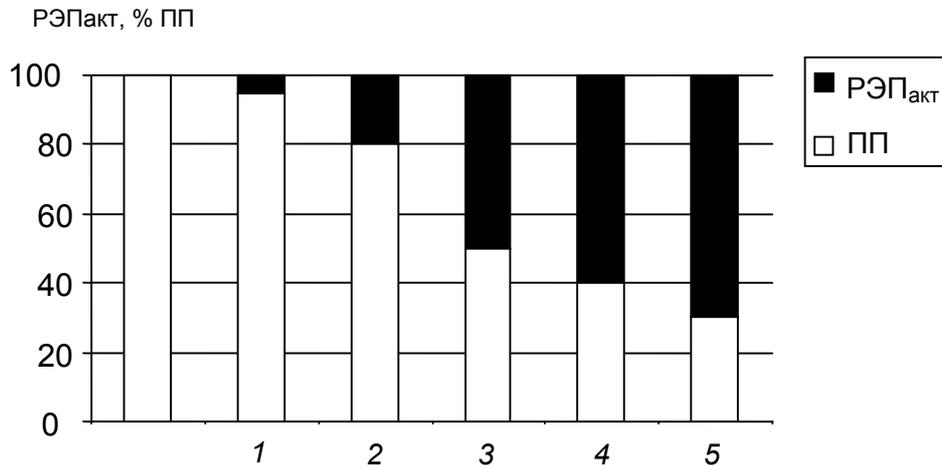


Рис. 6.1. Вклад активной компоненты в величину РЭП клеток животных и растительных объектов:

1 – аксон кальмара; 2 – нейрон моллюска; 3 – эпидермис корня кукурузы; 4 – паренхима гипокотили вигны; 5 – лист эгерии

Существенную роль в возникновении высокого РЭП на плазматической мембране растений, по-видимому, играет то обстоятельство, что проницаемость плазматических мембран растений для ионов H^+ , при участии которых формируется активная составляющая, весьма низка. Это сводит к минимуму диссипацию активной компоненты за счет поступления H^+ в клетку по электрохимическому градиенту. У животных объектов подобная составляющая формируется в основном ионами Na^+ , и поэтому возможность такой диссипации более значительна.

РЭП у растений можно условно подразделить на темновую и фотоиндуцированную метаболические компоненты. Термин «темновая метаболическая компонента» означает, что речь идет о потенциале, возникновение которого не связано с действием освещения на клетку. Генерация этого потенциала тесно связана с митохондриальным дыханием. Фотоиндуцированный потенциал свойствен зеленым клеткам растений. Он развивается в течение нескольких минут после начала действия освещения и сохраняется длительное время, если условия освещения не изменяются. В клетках ли-

стью ряда растений вклад фотоиндуцированной и темновой активных компонент в РЭП составляет соответственно 60–65 % и 10–15 %, пассивной – 20–25 %. Таким образом, фотоиндуцированная компонента РЭП зеленых клеток растений принимает решающее участие в формировании метаболической компоненты.

6.2. Возбудимость клеток растений

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

Нас в данном случае интересуют раздражения, связанные с возникновением потенциалов действия. ПД могут возникать под влиянием различных видов раздражителей (механические, физические, химические и т. д.).

ПД представляет собой временное изменение РЭП между возбужденным участком и участком, находящимся в состоянии покоя. Он возникает вслед за раздражением и распространяется в виде волны возбуждения.

Разработка соответствующей техники и интерес исследователей к электрическим процессам в растениях позволили уже в начале прошлого века зарегистрировать ПД при их раздражении. Было установлено, что мембранный потенциал многих растительных клеток аналогично клеткам животного происхождения при раздражении сдвигается в сторону деполяризации. 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 потенциал действия растительных клеток развивается медленно. Другой отличительной особенностью является то, что ПД растительных клеток развивается 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 (рис. 6.2).

Проводимость мембраны во время генерации ПД увеличивается, достигая своего максимума в пике ПД, затем возвращается к первоначальному уровню. Как плазмалемма, так и тонопласт ведут себя, как показано на рис. 6.2, но для первой характерны большие изменения потенциала и проводимости.

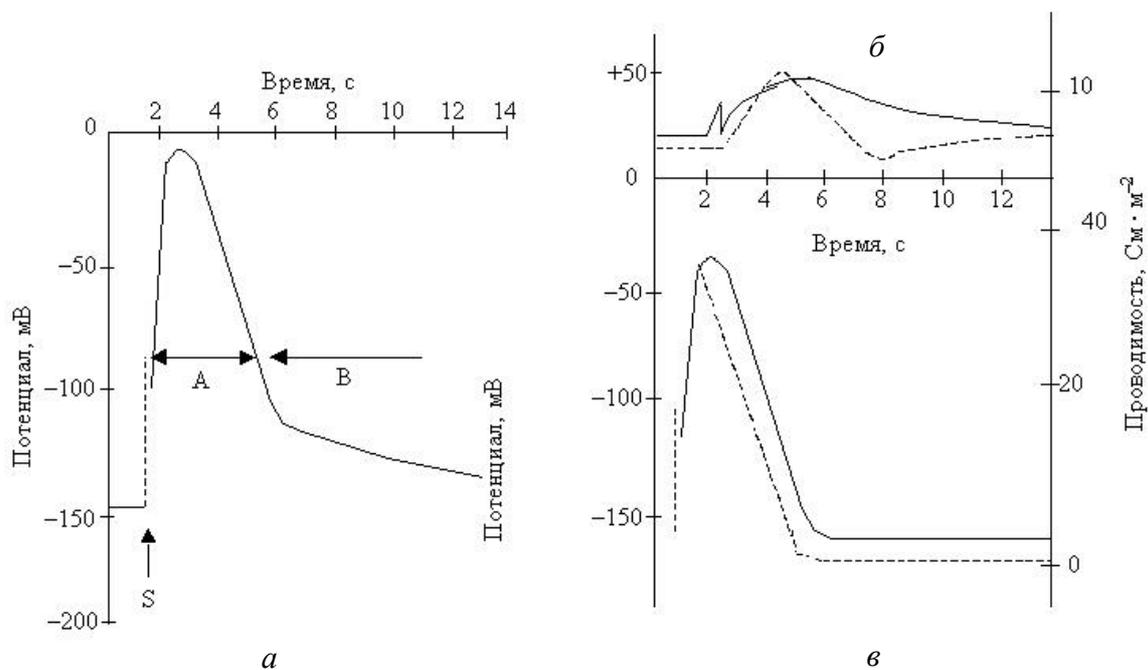


Рис. 6.2. Развитие волны ПД на клетке харовой водоросли:
a – между вакуолью и наружной средой; *б* – на тонопласте; *в* – на плазмалемме

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

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

6.3. Типы биоэлектрических реакций у высших растений

Раздражимость и возбудимость живых систем разных уровней организаций связаны во многих случаях с возникновением и передачей электрического сигнала. Электроуправляемость движений отдельных органов и ряда физиологических процессов установлена для многих растений.

Рассмотрим явления, связанные с возникновением и передачей электрического возбуждения в высших растениях.

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

Одним из способов распространения возбуждения считают «среднюю волну у мимозы, имеющую форму ПД». Она возникает в ответ на не повреждающие стимулы: умеренное охлаждение, электрический разряд, слабое механическое воздействие с правилом «все или ничего». Эта волна распространяется вдоль стебля или черешка мимозы со скоростью 1–3 см/с длительностью несколько секунд и называется ПД.

После прохождения одиночного ПД в этой точке в течение 70–90 с невозможно вызвать повторный ПД (абсолютный рефрактерный период); затем следует более продолжительная стадия относительной рефрактерности, во время которой распространяющийся ПД имеет меньшую амплитуду и скорость распространения.

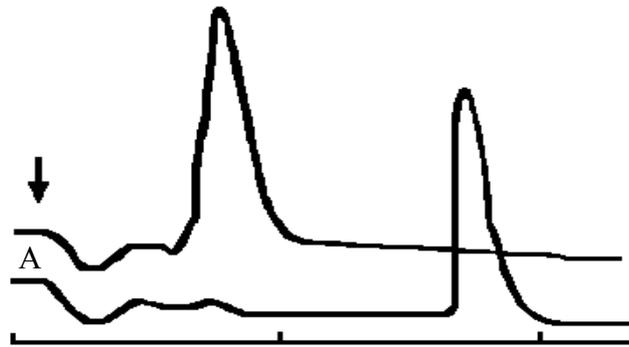


Рис. 6.3. Биоэлектрическая реакция вдоль сегмента стебля винограда

В настоящее время многие исследователи полагают, что растения в определенных условиях способны генерировать ПД (рис. 6.3).

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

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 переменным потенциалом (ВП). При слабых повреждениях ВП мимозы имеет амплитуду десятков мВ и длительность порядка 10 мин. При более сильных воздействиях амплитуда ВП постепенно увеличивается до ~ 200 мВ и может длиться более часа.

ВП имеет две компоненты – спайковую (А) и нерегулярной формы (Б) (рис. 6.4). ПД отличается от ВП большей скоростью распространения и неспособностью проходить через листовую подушечку. 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 который нанесено раздражение, но и нескольких последующих листьев. Более того, ВП может возникать в период абсолютного рефрактерного периода.

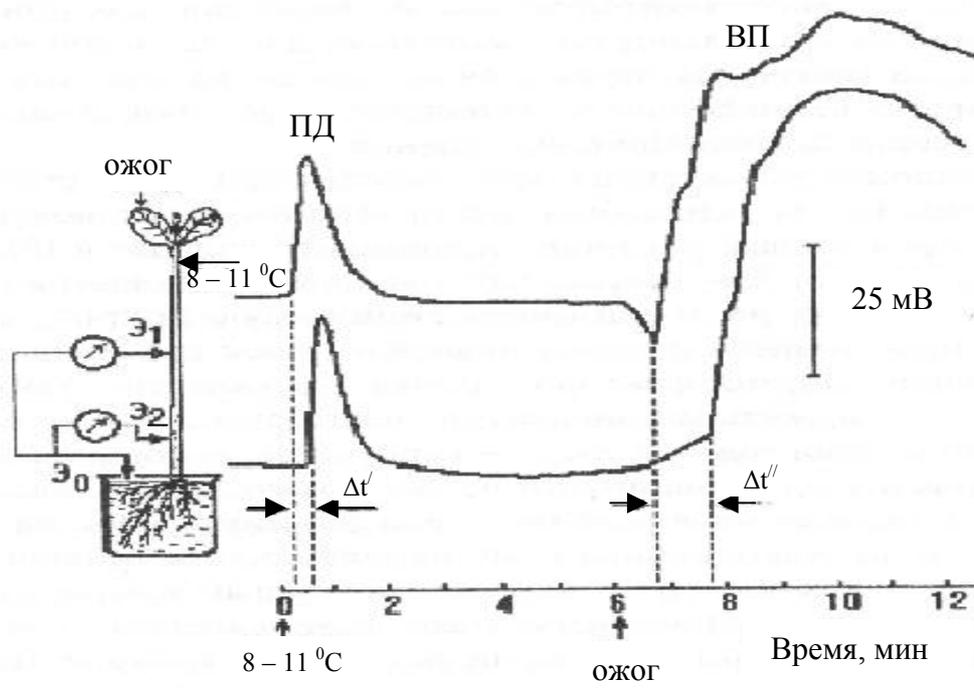


Рис. 6.4. Электрические реакции проростков тиквы на охлаждение и последующий ожог; ПД – потенциал действия, ВП – переменный потенциал

Наиболее характерное качество ВП – способность проходить через убитые ткани. Таким образом, распространяющееся возбуждение у высших растений может иметь химическую природу, связанную с движением некоего «раневого вещества» (фактор Рикка).

Что касается природы вещества (вызывающего ВП), то это соединение неидентифицировано. На роль медиатора в химическом механизме распространения возбуждения у высших растений претендует ряд соединений. Кроме того, существует и альтернативная гипотеза о чисто электрическом механизме распространения ВП.

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

Органом, в котором происходит преимущественное распространение ПД у высших растений, является стебель. По имеющимся данным, корни и листья не обладают этой способностью. Наблюдения о том, что ПД могут распространяться 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 также и на корень, лист и другие части растения.

Тем не менее у высших растений имеется специальный канал, обеспечивающий быстрое перемещение волны возбуждения. Он представлен удлиненными паренхимными клетками внешней флоэмы и протоксилемы (внутренней флоэмы). Вполне возможно, что сюда следует отнести также и некоторые клетки метаксилемы, хотя этот вопрос требует окончательного решения.

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

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

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

$$K = \Delta E_i / \Delta E_g.$$

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.

Поскольку между клетками существует электрическая связь, то представлялось целесообразным проследить, насколько она эффективна в процессе передачи нестационарных ионных токов, т. е. ПД и фотоиндуцированной биоэлектрической реакции клетки.

На способность харовых водорослей генерировать ПД указывалось еще в начале прошлого века. Как уже отмечалось, благодаря своим размерам, четкой дифференцировке внутриклеточных компартментов и т. д. они стали удобным объектом и в исследованиях, связанных с изучением характера передачи электрической информации между клетками.

По характеру передачи сигнала через междоузлие пары клеток харовые водоросли можно подразделить на три группы: при возбуждении одной из пары клеток на клетке-реципиенте не отмечается изменений мембранного потенциала, регистрируются только небольшие сдвиги мембранного потенциала (электротонический потенциал) и развивается волна ПД с задержкой 1–2 с.

Еще одним доказательством возможности передачи электрической информации растительными клетками служат 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.

Лекция 7

ЦИКЛОЗ

Движение цитоплазмы 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 движения цитоплазмы и участие биомедиаторов в двигательных реакциях животных требуют отдельного рассмотрения этого явления.

Впервые движение цитоплазмы растительных клеток, получившее впоследствии название циклоза, наблюдал Корти в 1774 году. Вначале многие ученые рассматривали циклоз как явление, связанное с повреждением клетки или изменением условий окружающей среды. Однако по мере накопления фактов пришли к заключению, что движение цитоплазмы происходит во многих интактных клетках, причем характер движения весьма разнообразен.

7.1. Типы и механизмы движения цитоплазмы

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

Колебательное движение характеризуется определенной беспорядочностью: одни 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. Основным отличием колебательного движения цитоплазмы от броуновского является то, 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.

Ротационное движение. 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 в клетках пыльцевых трубок многих растений, в 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 ее внутренней стороне. 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 с направлением расположения хлоропластов в неподвижном слое.

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

Различают еще обратнотаннирующее движение, характеризующееся тем, что цитоплазма движется к вершине в слое, прилегающем к стенке клетки, а по центральному тяжу – к основанию.

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 может претендовать на большую точность; однако оно может дать все же основные представления о их величинах (табл. 7.1).

Таблица 7.1

Скорость циклоза в различных растительных объектах

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 ризоид	52–78 21	20–28 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
<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.

Более корректны подходы для оценки движущей силы, которые включают методы центрифугирования, вакуолярной перфузии, «бокового сжатия». Определенные указанными методами величины движущей силы оказались близкими и для клеток харовых водорослей составляли 1–2 дин/см².

Движущая сила в клетках харофитов образуется при неспецифическом взаимодействии между текущей эндоплазмой и неподвижным корковым слоем. Действительно, в месте локального повреждения отсутствует движение цитоплазмы, и движущаяся 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 на внутренней поверхности хлоропластов. 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), которые передвигаются по филаментам и предположительно являются ответственными за генерацию движущей силы.

С другой стороны, неоднократно высказывалось мнение, что движение цитоплазмы в растительных клетках связано с функционированием сократительных белков. Это отчасти подтвердилось после обнаружения актина в высшем растении *Amaryllis*. В дальнейшем был получен очищенный препарат миозина из клеток *Nitella*. Он имел более высокую молекулярную массу по сравнению с миозином, выделенным из скелетных мышц. В последнее время миозин идентифицирован в клетках высших растений.

На основании имеющихся в литературе данных можно заключить, что миозин и актин, локализованные соответственно в движущейся эндоплазме и корковом слое, играют определяющую роль в процессах циклоза.

В настоящее время существуют три гипотезы, касающиеся механизма генерации движущей силы движения цитоплазмы. Первая – движущая сила создается сферосомами, активно перемещающимися по актиновым филаментам, вторая – волнообразное движение самих актиновых филаментов обуславливает возникновение движущей силы циклоза и третья – взаимодействие растворенного миозина в эндоплазме с актиновыми филаментами приводит цитоплазму в движение.

Наиболее вероятным процессом, обеспечивающим генерацию движущей силы, является взаимодействие ориентированных в направлении движения поляризованных актиновых филаментов с цитоплазматиче-

скими 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 по третьему механизму за счет «гребковых» движений олигомеров миозина, прикрепленных одним концом к актиновым филаментам; последние служат для увеличения площади и равномерного распределения силы по объему цитоплазмы.

7.2. Биологическое значение движения цитоплазмы

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 покрытосеменных 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 и физиологическим состоянием в естественных условиях могут служить замыкающие клетки устьиц. При закрытом устьице в замыкающих клетках

листьев *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 различии 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.

7.3. Влияние физико-химических факторов на циклоз

Во многих растительных клетках (например, клетках *Elodea*, *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 *Elodea* от стебля движения не наблюдается; позднее оно начинается у основания листа и постепенно распространяется дальше.

Свет играет существенную роль в регулировании процессов движения цитоплазмы. Индуцированное под действием света движение называют фотодинамом. 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 имеет длина волны, интенсивность и время освещения. Так, было установлено, что пороговая величина светового раздражения для изменения вязкости составляет 0,001–1,0 лк и она зависит от физиологического состояния клетки, времени года и т. д.

Интересны эффекты, вызываемые ультрафиолетовым светом (УФ). Сильный импульс УФ вызывал остановку циклоза в поверхностных слоях 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 *хемодинеза*.

Для понимания механизма движения цитоплазмы особое значение приобретает изучение действия агентов, специфически влияющих на определенные физиолого-биохимические процессы (табл. 7.2).

Таблица 7.2

Влияние химических соединений на циклоз клеток харовых водорослей

Соединение	Концентрация, М	Изменение скорости циклоза	Характер действия
Парахлормеркури-бензоат	10^{-4} 10^{-3}	Подавляет Подавляет	Реагирует с SH-группами
N - этиламилид	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

Таким образом, можно сделать заключение, что механизм движения цитоплазмы связан с наличием SH-групп в молекулах соедине-

ний и микрофиламентов, составляющих основу цитоплазматического матрикса.

Температура в значительной мере влияет на скорость движения цитоплазмы растительных клеток. Как правило, зависимость скорости циклоза от температуры для клеток харовых водорослей имела 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* такой оказалась 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, либо изменяя 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 указанных интервалах 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 определяется протекающими в клетке процессами жизнедеятельности.

Электрические поля вызывают изменения в скорости циклоза. В конце XVIII ст. 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 между ПД и остановкой 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 скорость 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+} . Активное вращение хлоропластов, которое обусловлено актомиозин-АТФ системой, прекращалось при инъекции Ca^{2+} в каплю эндоплазмы.

При инъекции в цитоплазму клеток *Chara* и *Nitella* белка акворина, интенсивность люминесценции которого пропорциональна концентрации свободного Ca^{2+} , показано, что пик интенсивности люминесценции соответствовал моменту остановки циклоза и приходился на максимум медленной фазы ПД. Концентрация свободного Ca^{2+} менялась от 0,1–0,2 мкМ до 6,7 мкМ в пике ПД для клеток *Chara*, а для клеток *Nitella* – от 0,44–1,1 до 43,0 мкМ. Восстановление движения происходило медленнее (75–360 с) по сравнению с возвращением интенсивности свечения (40–60 с) к исходному уровню; 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 ЕГТА, связывающего Ca^{2+} , не наблюдалось замедления движения цитоплазмы при возбуждении клетки.

Возможно, таким образом, двойное действие ионов кальция на циклоз. 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 вызывала открепление мембраносвязанных филаментов цитоскелета. Последующее удаление ионов Ca^{2+} приводит к прикреплению актиновых филаментов.

Обработка цитохалозином В (10^{-5} М) фрагмента клетки приводила к остановке движения только на этом участке, и действие 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 обстоятельные материалы, касающиеся связи скорости циклоза с РЭП клетки. Изменения величины РЭП, как установлено, влекут за собой сдвиги скорости движения цитоплазмы (рис. 7.1).

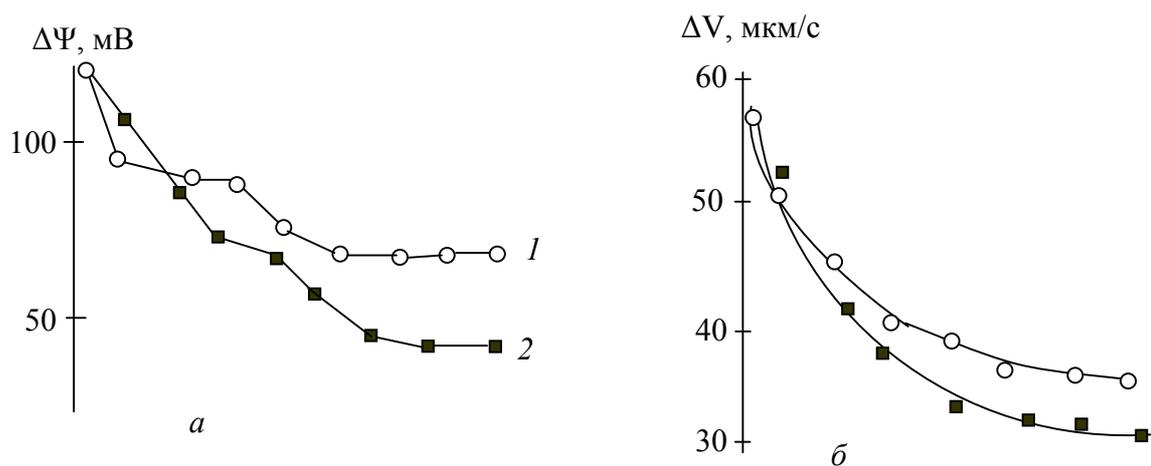


Рис. 7.1. Кинетика деполяризации (а) и сдвигов движения протоплазмы (б) под действием 3,0 мМ (1) и 10 мМ КСl (2)

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.

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 :

$$dV / dt = k_1 \Delta\Psi(t) - k_2 \Delta V(t), \quad (7.1)$$

или после интегрирования:

$$\Delta V(t) = (k_1 / k_2) \exp(k_2 t) \int_0^t \Delta\Psi(\tau) \exp(k_2 \tau) d\tau. \quad (7.2)$$

Кинетику изменений РЭП и скорости движения цитоплазмы аппроксимировали уравнением (7.2).

Как явствует из рис. 7.1, это уравнение хорошо описывает экспериментальные зависимости, что позволяет использовать его для оценки потенциалзависимости сдвигов скорости циклоза, наступающих под действием различных факторов. Развивая эти представления, была предложена 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, то реакция является строго потенциалзависимой (рис. 7.2).

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

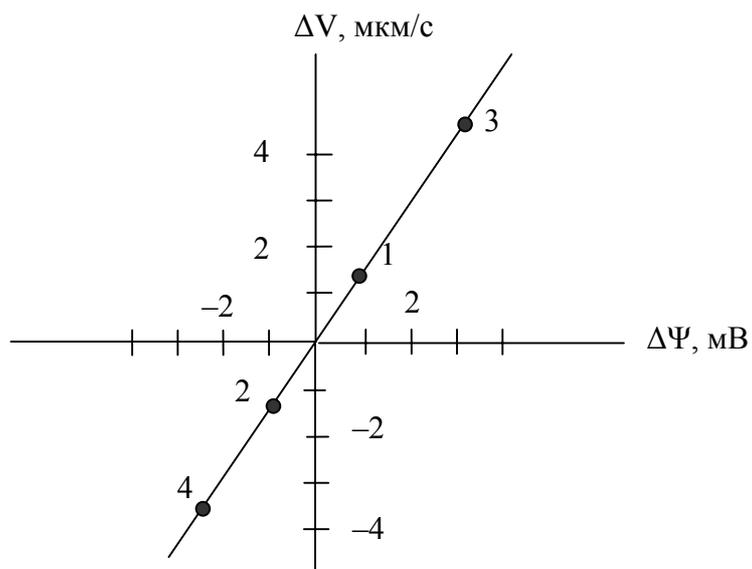


Рис. 7.2. Связь между значениями сдвигов ΔV в экстремумах и соответствующими им величинами сдвигов $\Delta\Psi$ в случае строго потенциалзависимой реакции СДП, подчиняющейся соотношению

Таким образом, 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).

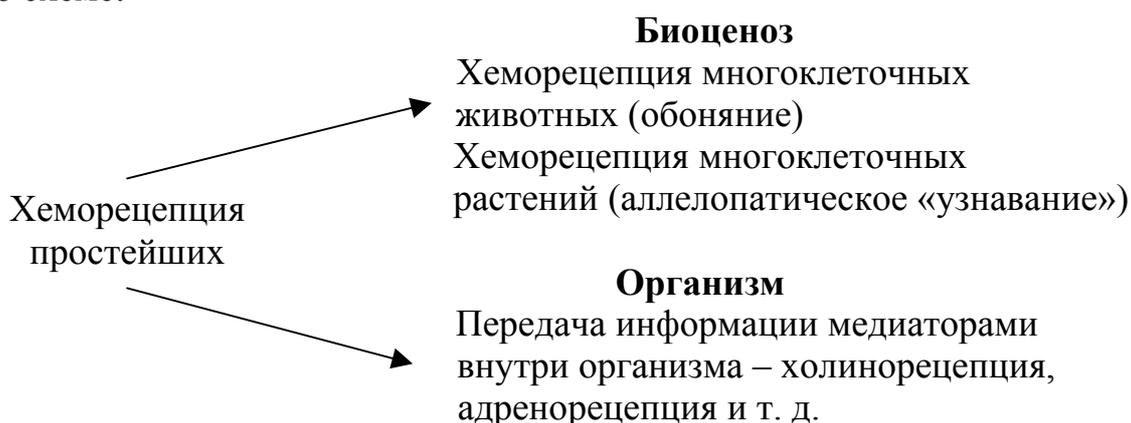
Лекция 8

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ БИМЕДИАТОРОВ В РАСТЕНИЯХ

Внутриклеточная регуляция физиологических процессов с использованием метаболитов – химических передатчиков импульса возбуждения от плазмалеммы к органеллам, по-видимому, вначале 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.

Эволюция этого явления, вероятно, была направлена как на развитие информационных систем в биогеоценозе, так и внутри одного организма по схеме:



Вершиной эволюции в животном организме стало появление медиаторов, передатчиков информации между клетками многоклеточного организма: ацетилхолина и биогенных аминов.

Физиологи животных считают, что ацетилхолин 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.

Выполняют ли эти соединения аналогичные функции в растениях? Рассматривая этот вопрос, воспользуемся накопленным к сегодняшнему времени экспериментальным материалом, помня, что различают медиаторные и немедиаторные функции этих соединений.

8.1. Медиаторные функции

К медиаторным функциям ацетилхолина и биогенных аминов относят внутриклеточную химическую и электрическую регуляции, связанные с передачей сигнала от плазмалеммы к другим структурам, 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; правда, пока неизвестно, есть ли внутри клетки между органеллами контакты, подобные синаптическим. В качестве сигнальных веществ в животных клетках функционируют ацетилхолин, 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.

Согласно симбиотической теории происхождения пластид, хлоропласт – потомок цианобактерий, который был захвачен эукариотической клеткой путем эндоцитоза, что привело к своеобразному симбиозу двух ранее самостоятельных организмов. Естественно, сенсорные 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 окру-

жает большую центральную область – строму, содержащую множество растворенных ферментов. В строме находятся тилакоиды, окруженные тилакоидной мембраной. В отличие от тилакоидной мембраны внутренней 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 соответственно изменения ионной проницаемости или фотохимической активности, что позволяет характеризовать хлоропласт как биологическую структуру, подчиняющуюся единым закономерностям химической сигнализации.

В пользу возможного участия ацетилхолина 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 ацетилхолина, наличие фермента холинэстеразы и др.

Возникает вопрос: каким образом ацетилхолин 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 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. Можно предполагать, что 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.

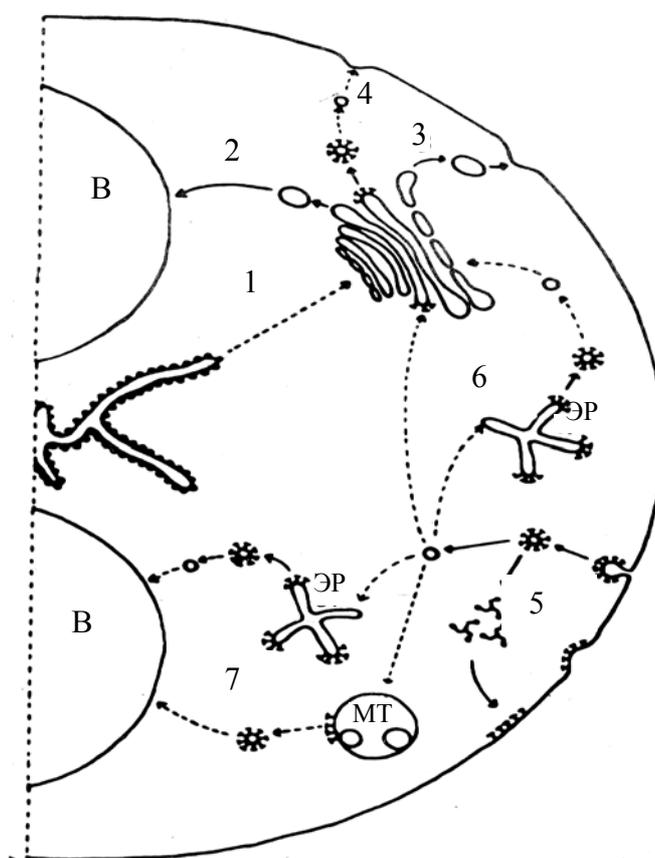


Рис. 8.1. Известные (сплошная линия) и возможные (штрихи) пути везикулярного транспорта в клетках растений:

- 1 – поток синтезированных макромолекул из грубого 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 одетых везикулах; 5 – эндоцитоз в везикулах, одетых клатрином; 6 – транспорт эндоцитозного вещества к аппарату Гольджи через гладкий эндоплазматический ретикулум (ЭР); 7 – транспорт эндоцитозного вещества в вакуоль через ЭР или мультивезикулярные тельца (MT)

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 ацетилхолин и катехоламины, то это может также свидетельствовать в пользу внутриклеточной медиации.

В растениях связь между клетками осуществляется симпластическим путем, по которому осуществляется не только передвижение ионов и метаболитов, но происходит передача электрических сигналов. Однако нет прямых доказательств об участии ацетилхолина и биогенных аминов в межклеточной сигнализации у растений.

Мембранный потенциал и возможная роль биомедиаторов. Одним из путей электрической регуляции ацетилхолина 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 описанное в литературе явление. У растений также существует подобное явление. Скорость распространения волны возбуждения у растений значительно ниже, чем у животных (см. табл. 8.1). Ацетилхолин и биогенные амины играют важную роль в регуляции мембранного потенциала и распространении волны возбуждения.

Указанные соединения оказывают влияние и на электрические параметры растительных клеток. Заметное действие ацетилхолина на клетки харовых водорослей проявляется в концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М, причем реакция была обратимой, т. е. электрические параметры после удаления соединений из окружающего раствора возвращались к первоначальному уровню. В интервале указанных концентраций происходила деполяризация мембраны. Обработка клетки ацетилхолином приводила к увеличению коэффициента $\alpha = P_{Na}/P_K$; т. е. отмечается падение селективности мембраны. Аналогичная биоэлектрическая реакция характерна для клеток корней гороха. В концентрации 10^{-6} М ацетилхолин индуцировал Ca^{2+} -зависимое набухание клеток мезофилла листа этиолированных проростков пшеницы. Ацетилхолин (10^{-5} М) способен также вызывать увеличение калиевой и протонной проводимостей плазмалеммы.

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 угнетал также и активный транспорт Na^+ через плазмалемму.

Таблица 8.1

Изменения потенциала и ионной проницаемости мембран растительных клеток под влиянием ацетилхолина

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

Быстрое складывание листьев и листовых черешков обусловлено, как было сказано, передачей электрического сигнала по растению в виде волны возбуждения (ПД или ВП). ПД в животных клетках и тканях в ряде случаев сопровождается выходом ацетилхолина и биогенных аминов в синаптическую щель. Однако в проводящих органах растений не обнаружено изменения содержания эндогенного ацетилхолина при возбуждении.

Считают, что более вероятным является участие норадреналина в двигательных реакциях растений, поскольку его содержание в подушечках больше, чем в листовой пластинке.

Ацетилхолин, как правило, снижал величину потенциала клеточных мембран, увеличивая их протонную и калиевую проницаемости.

В более низких концентрациях (10^{-9} – 10^{-7} М) ацетилхолин модифицирует свойства мембран хлоропластов. В модельных опытах с изолированными интактными хлоропластами из гороха показано изменение мембранного потенциала под влиянием экзогенного ацетилхолина, что было связано с выходом в наружную среду ионов Na^+ и K^+ . Полученные концентрационные кривые выходили на плато при концентрациях 10^{-6} – 10^{-5} М (рис. 8.2). Выход ионов Na^+ и K^+ из хлоропластов сопровождается поступлением ионов водорода в темноте; градиент рН увеличивался только при низких концентрациях (10^{-9} – 10^{-7} М) ацетилхолина в среде.

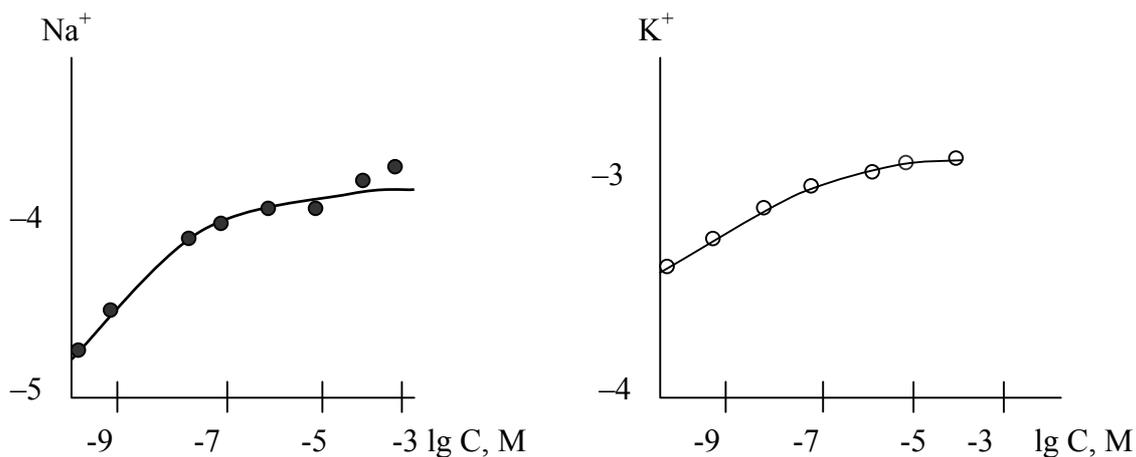


Рис. 8.2. Концентрационная зависимость действия ацетилхолина бромида на выделение ионов Na^+ и K^+ интактными хлоропластами гороха

Биогенные амины (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^{-9} М) и усиливалось при 10^{-7} М, после чего следовало насыщение (рис. 8.3).

Известно, что существует два типа ионных каналов – управляемые медиаторами (рецепторные) и потенциалом (потенциалзависимые). Взаимодействие медиатора с рецептором приводит к открыванию ионного канала, управляемого рецептором.

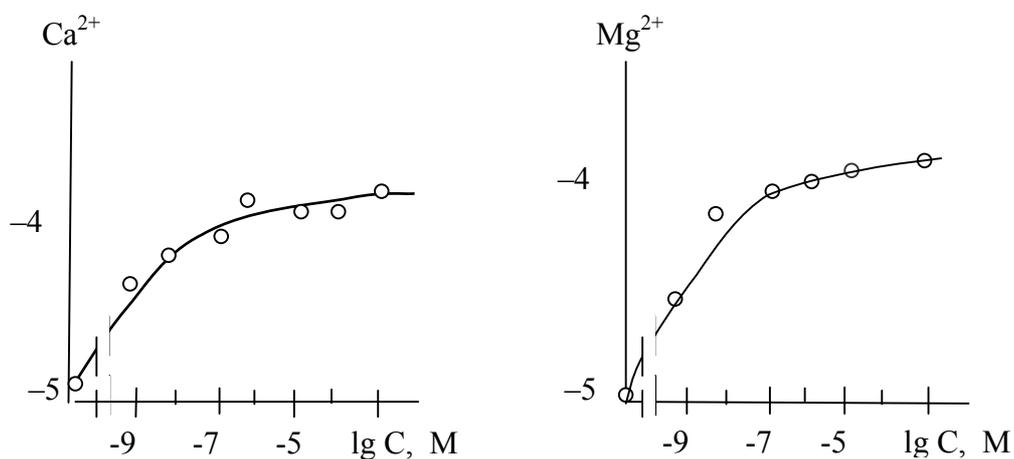


Рис. 8.3. Действие норадреналина на выход кальция и магния из интактных хлоропластов гороха

Это, в свою очередь, вызывает падение мембранного потенциала на данном участке мембраны ниже пороговой величины и открытие потенциалзависимых ионных каналов. Деполяризация приводит к открытию новых потенциалзависимых каналов и т. д. Так происходит распространение ПД:

Медиатор → рецептор → открытие ионного канала,
управляемого рецептором

Распространение
потенциала действия

↓
деполяризация мембраны
↓
открытие потенциалзависимых
ионных каналов
↓
деполяризация мембраны
↓
открытие потенциалзависимых
ионных каналов
и т. д.

В настоящее время общепризнанным является механизм действия медиаторов в животных и растительных клетках, который основывается на регуляции ионных потоков. Изменения мембранных потенциалов обусловлены сдвигами ионной проницаемости мембран путем открытия или закрытия ионных каналов. С этим явлением и связаны механизмы возникновения и распространения ПД в животных и растительных клетках. В животных клетках – это Na^+/K^+ -каналы, контролируемые ацетилхолином, и Ca^{2+} -каналы, чаще зависимые от биогенных аминов. В растительных клетках возникновение и распространение ПД связывается с кальциевыми, калиевыми и хлорными каналами.

Однако остается до конца невыясненной роль биомедиаторов в передаче электрического сигнала у клеток, не обладающих нервной системой и синаптическими образованиями. 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 имеет в большинстве случаев величины 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 мВ и –160 мВ в темноте и на свету соответственно. Следовательно, отрицательное значение РЭП способствует взаимодействию катионов, в том числе и ацетилхолина и биогенных аминов с плазмалеммой и мембранами органелл.

Как уже отмечалось, под влиянием экзогенного ацетилхолина 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 ацетилхолина, 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 оказывается, 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.

Таким образом, на примере хлоропласта видно, что ацетилхолин, 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.

В связи со сказанным выше еще раз вспомним о теории «цикла ацетилхолина», объединяющей электрический и химический механизмы распространения возбуждения в нервной системе. Как известно, ацетилхолин и холинэстераза присутствуют и в растительных тканях. Как уже отмечалось, ацетилхолин у растений и у животных выступает в роли регулятора биоэлектрических явлений, хотя для растений точное его действие на эти процессы неизвестно.

Возможно, гипотеза единого ацетилхолинового или иного медиаторного циклического механизма возбуждения находит некоторое подтверждение при изучении импульсной электрической активности у высших растений. Предположение о том, что деполяризация способна проводить 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. Более того, сократительные элементы (фибриллы, филаменты) растительных клеток оказались чувствительными к действию биомедиаторов.

Подтверждением действия биомедиаторов на сократительные структуры являются опыты, в которых показана чувствительность протопластов отдельных клеток корней *Phaseolus* к экзогенному ацетилхолину. Сокращение протопластов, индуцируемое ацетилхолином, подавлялось его антагонистами атропином и мускарином.

Школой грузинских исследователей проведено обстоятельное изучение действия ацетилхолина и ряда биогенных аминов на скорость движения цитоплазмы и РЭП клеток харовых водорослей. Ацетилхолин в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-6}$ М вызывал замедление скорости циклоза и падение РЭП, которые постепенно возвращались к исходному уровню; более выраженное действие ацетилхолин оказывал при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. Реакция клетки на действие ацетилхолина была обратимой, т. е. после удаления его из раствора восстанавливалась первоначальная скорость движения цитоплазмы. При кумулятивном действии возрастающих концентраций ацетилхолина на клетку в интервале $5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-5}$ М последняя концентрация вызывала плазмолиз.

Серотонин оказывал противоположное ацетилхолину действие на скорость циклоза. 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.

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.

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. Представление о концентрационном диапазоне действия ряда испытанных препаратов дает рис. 8.4.

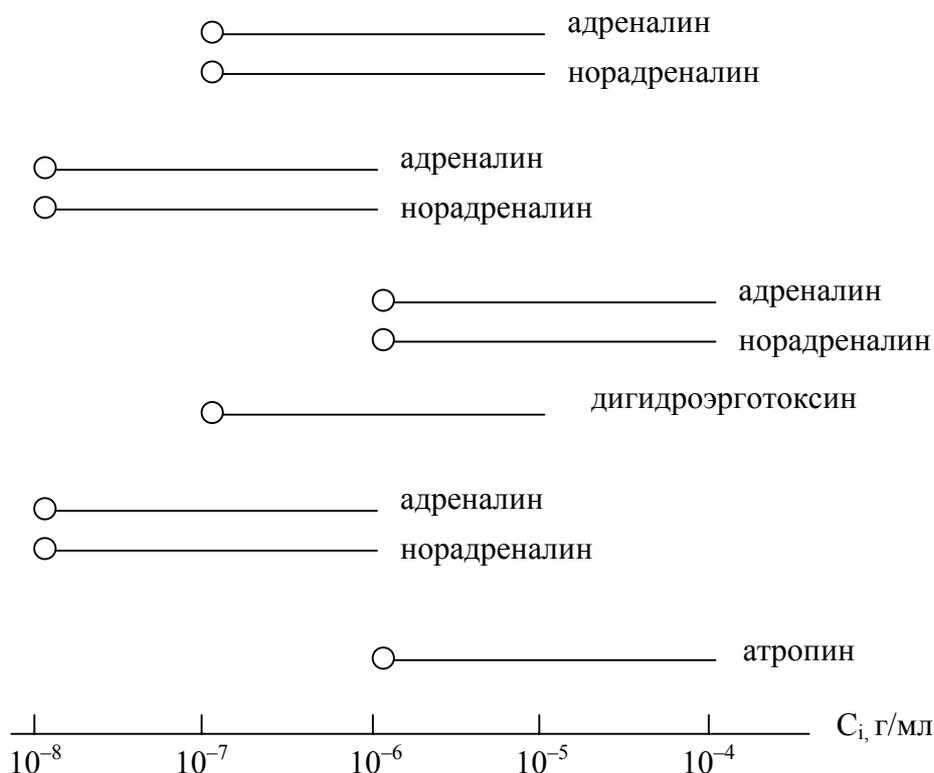


Рис.8.4. Пороговые концентрации (o) и испытанные диапазоны действующих концентраций (—) биогенных аминов

По мере возрастания непосредственного эффекта (действие испытуемого агента на внутриклеточные системы, ответственные за поддержание циклоза) на движение цитоплазмы ацетилхолин и биогенные амины располагаются в ряд: фенитрон < индерал < атропин < дигидроэрготоксин < адреналин < эфедрин < изадрин < норадреналин < серотонин < ацетилхолин.

Из потенциалзависимости скорости движения цитоплазмы возможно определить характер действия испытанных препаратов (см. главу 7), 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), еще не вызывавшей изменений регистрируемых параметров, 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, теряла чувствительность к изадрину ($5 \cdot 10^{-5}$ М).

Изменение порядка применения агентов в тех же парах антагонист – агонист привела 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 системы, обуславливающие циклоз.

Биомедиаторы – возможные триггеры систем вторичных посредников. Как мы уже отмечали, в растениях присутствуют аденилатциклазная, гуанилатциклазная и ионизитолфосфатная системы вторичных посредников – цАМФ, цГМФ и Ca^{2+} . В клетках животных эти системы включаются в процесс регуляции после соединения медиатора с рецептором на внешней стороне плазматической мембраны. При этом основная роль медиатора состоит в активации с помощью цАМФ, цГМФ или Ca^{2+} протеинкиназ, необходимых для фосфорилирования белков.

Поскольку компоненты холинэргической и адренэргической систем регуляции обнаружены в растительных клетках и даже отдельных органеллах, то можно предположить существование подобного животным клеткам и тканям механизма: включение ацетилхолином и биогенными аминами синтеза цАМФ, цГМФ и процесса обратимого освобождения – связывания ионов Ca^{2+} . Отсутствие синапсов у растений говорит о том, что эти соединения, скорее всего, принимают участие во внутриклеточной медиации. Данные, полученные в опытах по совместному действию биомедиаторов и их антагонистов на РЭП и циклоз, подтвердили наличие центров взаимодействия с молекулами катехоламинов, подобных по структурно-функциональной организации α - или β -рецепторам животных.

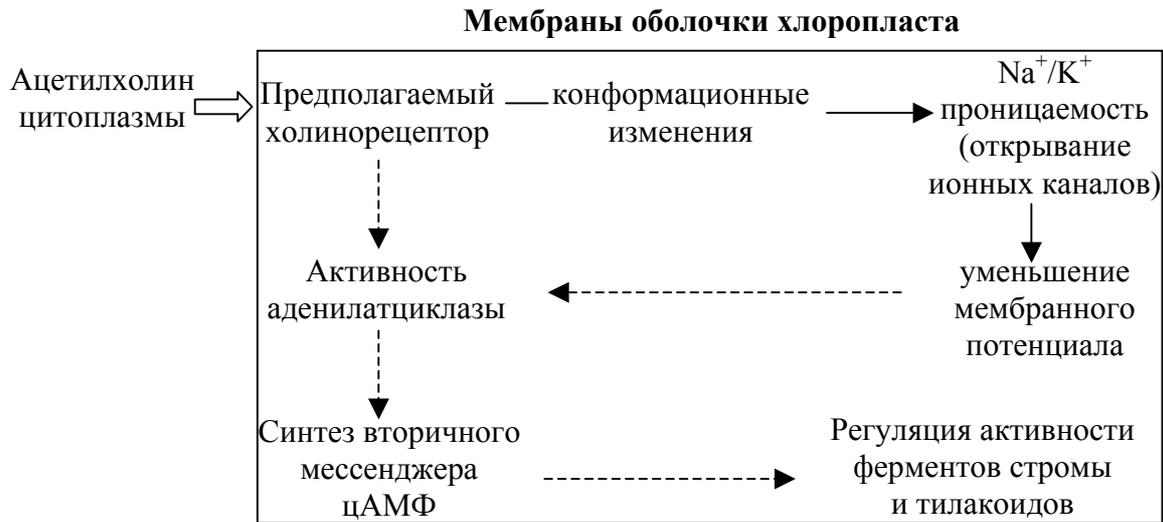
Принцип сигнализации с участием биомедиаторов и вторичных посредников, таким образом, может быть распространен и на внутриклеточные органеллы. Мы отмечали, что клеточные органеллы, в частности хлоропласты, произошли от самостоятельных организмов со сложной внутренней организацией и сохранили ее, будучи включенными в эукариотическую клетку. Кроме того, в плазмалемме, тонопласте и мембранах многих органелл обнаружены аденилатциклаза, гуанилатциклаза и протеинкиназа.

При передаче внешнего сигнала выделяют три этапа внутриклеточного сигналинга:

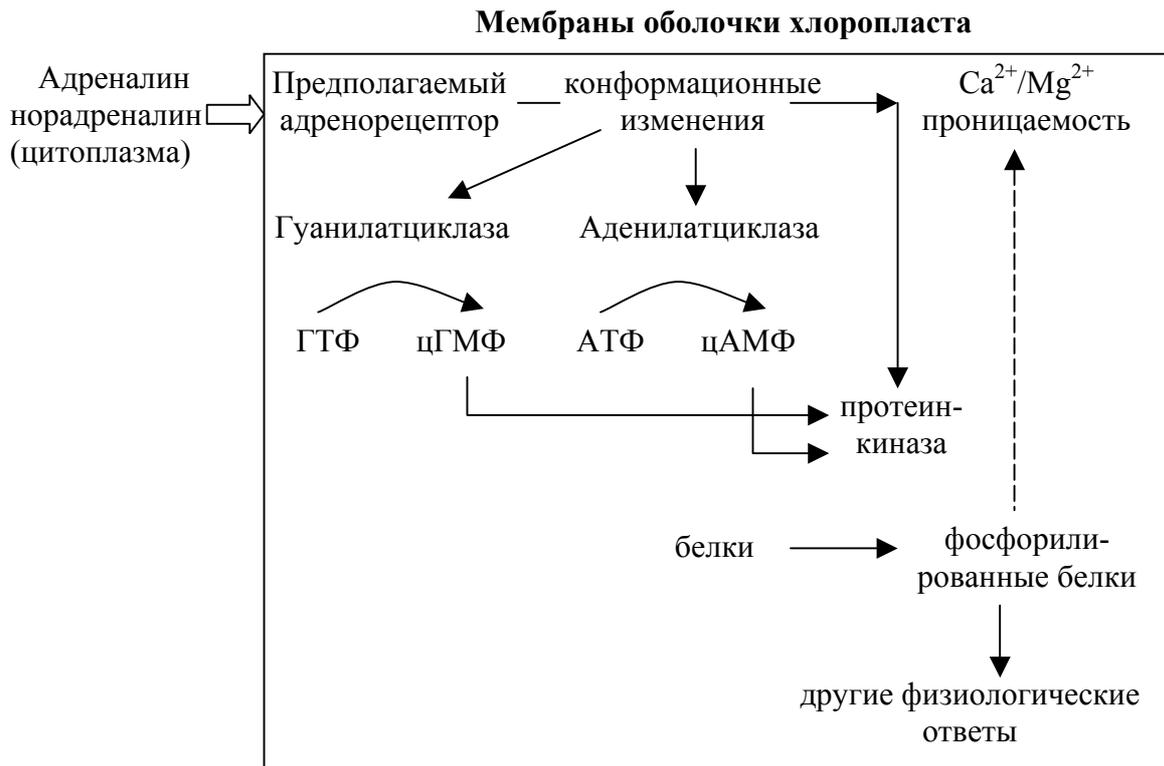
1. Внешний фактор → плазмалемма → вторичные посредники.
2. Вторичные посредники → органеллы → медиаторы внутри органеллы.
3. Медиаторы внутри органелл → внутренние структуры органеллы.

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, и в результате включаются системы

вторичных посредников. Этот механизм может быть продемонстрирован на примере передачи сигнала от плазмалеммы к хлоропластам (рис. 8.5 а, б).



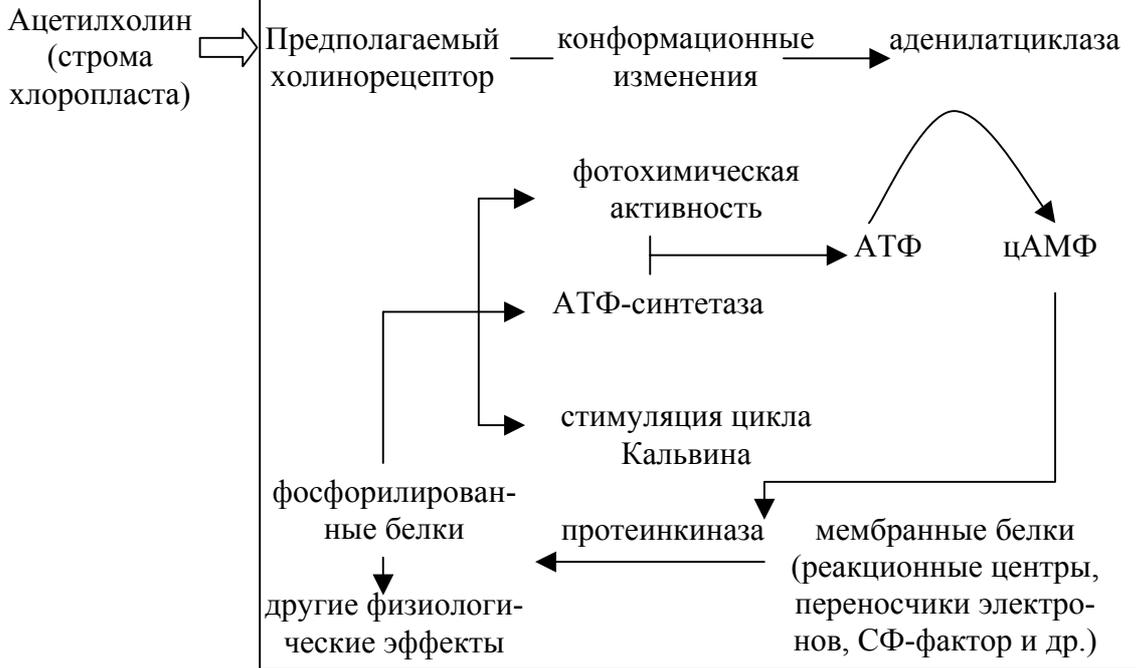
а



б

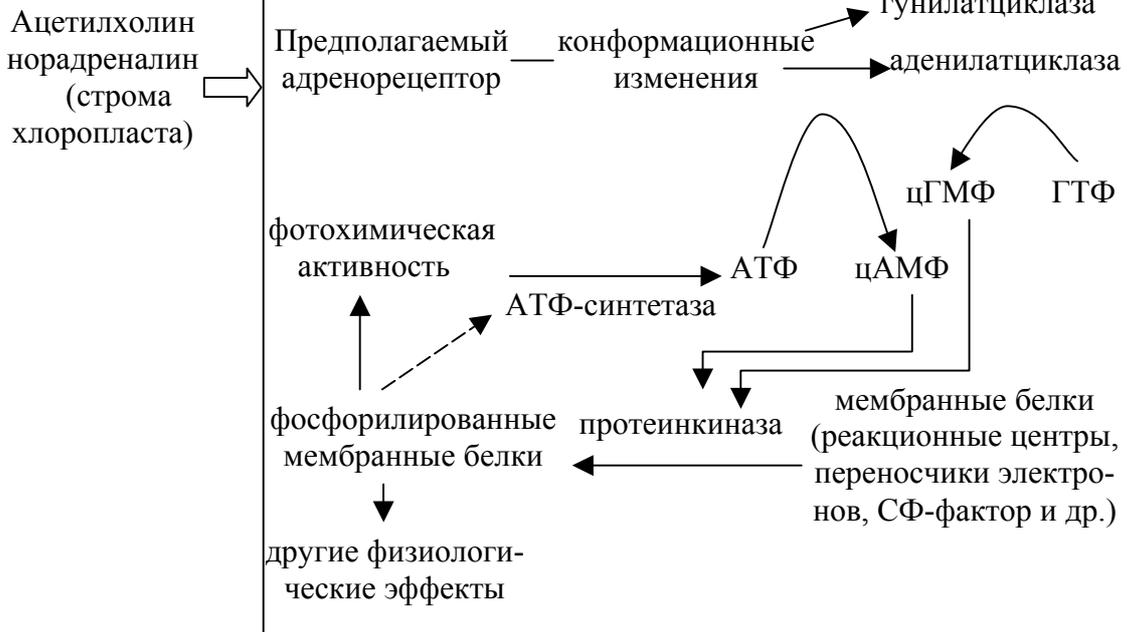
Рис. 8.5. Схема предполагаемого взаимодействия ацетилхолина (а) и катехоламинов (б) с мембраной оболочки хлоропласта

Мембраны тилакоидов



a

Мембраны тилакоидов



б

Рис. 8.6. Схема предполагаемого взаимодействия ацетилхолина (а) и катехоламинов (б) с мембраной тилакоидов

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.

Биомедиаторы, находящиеся в цитоплазме, могут взаимодействовать с предполагаемыми рецепторами наружной мембраны хлоропласта (других пластид), в результате чего происходят изменения Na^+/K^+ (ацетилхолин) и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (катехоламины, серотонин) проницаемостей и включение систем вторичных посредников путем активации аденилатциклазы на внутренней стороне мембраны оболочки хлоропласта. Внутри хлоропласта ацетилхолин и биогенные амины могут связываться с рецепторами мембран тилакоидов, что также вызывает включение систем вторичных посредников (рис. 8.6 а, б).

8.2. Немедиаторные функции

К немедиаторным функциям относят регуляцию ацетилхолином и биогенными аминами энергетических и метаболических функций, ростовых и морфогенетических процессов, а также их протекторные свойства.

Энергетические и метаболические процессы. Ацетилхолин и биогенные амины способны регулировать в клетках животных энергетические и метаболические реакции.

В растительных клетках ацетилхолин, адреналин, дофамин и норадреналин стимулируют фосфорилирование в хлоропластах. Адреналин и ацетилхолин стимулируют также и субстратное и окислительное фосфорилирование в выделенных из клеток животных митохондриях (табл. 8.2).

Таблица 8.2

Стимуляция фосфорилирования (в % от контроля) при действии биомедиаторов

Объект	Органелла	Биомедиатор	Синтез АТФ	Вид фосфорилирования
Pisum sativum	Хлоропласт	Ацетилхолин	50	ФФ
		Адреналин	50	ФФ
		Дофамин	30	ФФ
		Норадреналин	50	ФФ
Phaseolus aureus	Митохондрии из клеток корня	Ацетилхолин	0	
Ratus	Митохондрии	Ацетилхолин	36–86	СФ
		Адреналин	23–30	ОФ

Примечание: ФФ – фото-, СФ – субстратное- и ОФ – окислительное виды фосфорилирования.

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.

Таким образом, функция ацетилхолина и биогенных аминов состоит в стимуляции энергетических процессов. В норме они часто служат катионами для поддержания физиологического рН. Накопление адреналина и норадреналина в крови животных обычно связано со стрессовой ситуацией и характеризует реакцию раздражения.

В высоких концентрациях дофамин, адреналин и норадреналин принимают участие в окислительно-восстановительных (ОВ) реакциях хлоропластов. Судя по стандартным потенциалам катехоламинов и переносчиков электронов (табл. 8.3), 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 8.3

Стандартные потенциалы катехоламинов и известных доноров и акцепторов электронов

Соединение	Форма	Величина потенциала, В
Адреналин	Восст./окисл.	+0,39
Дофамин	Восст./окисл.	+0,10
Аскорбиновая кислота/ гидроаскорбиновая 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

Ацетилхолин 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 рибулезодифосфаткарбоксылазы 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 холинэстеразы и холиноксидазы позволяет предположить активное участие ацетилхолина в метаболизме как субстрата для образования холина. Он быстро включается в биосинтез бетаина и синацилхолина. 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 холинорецептора или агонистами ацетилхолина, а при конденсации с серотонином 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 являются предшественниками 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.

Стимуляции или угнетения роста растений происходят только при высоких концентрациях ацетилхолина (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.

Действие биомедиаторов на морфогенетические реакции мало изучено. Однако, как показано, ацетилхолин принимает участие в этом процессе. Прежде всего, красный свет увеличивает уровень эндогенного ацетилхолина в тканях растений, что оказывает влияние на морфогенез. Ацетилхолин в ряде случаев имитирует действие красного света на некоторые управляемые фитохромом процессы (табл. 8.4).

Эффекты ацетилхолина и красного света на управляемые фитохромом процессы

Растение	Процесс	Ацетилхолин	Красный свет
Phaseolus aureus	Поглощение кислорода	Увеличение	Увеличение
Вторичные корни	Образов. АДФ и Φ_n	Увеличение	Увеличение
Вторичные корни	Выход H^+	Увеличение	Увеличение
Echinochloa grusgalli	Прорастание семян	Увеличение	Увеличение
Brassica kaber	Прорастание семян	Увеличение	Увеличение
Setaria viridis	Прорастание семян	Увеличение	Увеличение
Agropyron repens	Прорастание семян	Увеличение	Увеличение
Trichoderma viride	Споруляция	Увеличение	Увеличение
Spinacia oleracea	Биоэлектрическая реакция	Увеличение	Увеличение

Так, оба эффектора увеличивают поглощение кислорода и выход ионов H^+ вторичными корнями, прорастание семян разных растений, биоэлектрическую реакцию и т. д.

Таким образом, сравнение эффектов ацетилхолина и красного света указывает на стимуляцию обоими факторами ряда реакций. Дальний красный свет действует противоположным образом. Однако не все управляемые фитохромом процессы регулируются ацетилхолином, аналогично красному свету.

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 ацетилхолин, 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 последующем X-облучении в 400 рад полностью со-

храняла способность к образованию вторичных корней кормовыми бобами.

У животных ацетилхолин 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Присутствие классических нейромедиаторов синаптической передачи возбуждения – ацетилхолина, катехоламинов, серотонина и гистамина в растениях, их заметная физиологическая активность, наличие компонентов холинэргической, адренэргической систем регуляции, их аналогия с животными клетками делает вполне реальной идею об универсальных принципах сигнализации и передачи информации в виде электрического и химического сигналов у всех живых организмов. Различия, в основном, касаются частных механизмов межклеточной сигнализации у многоклеточных животных и растений, обусловленные специализацией, структурной организацией, особенностями энергетических и метаболических обменов.

Участие химических соединений типа медиаторов как генераторов изменений мембранного потенциала и их возможная роль в возникновении ПД у растений пока лишь постулируются на основе представлений, установленных для синаптической передачи у клеток животных. На уровне клетки (одноклеточные и многоклеточные) у организмов, не имеющих синаптических контактов, в том числе и растений, присутствие ацетилхолина и биогенных аминов может объясняться их двойной ролью: как регуляторов внутриклеточного метаболического обмена и как локальных медиаторов, взаимодействующих с плазмалеммой и мембранами органелл в ответ на внешний сигнал.

Реакция на ацетилхолин и биогенные амины состоит в изменении проницаемости мембран к ионам и/или индукции синтеза вторичных посредников. Присутствие в растительной клетке и ее органеллах цАМФ, цГМФ, Ca^{2+} , а также ферментов синтеза и катаболизма подтверждает возможность локальной медиации.

Последовательность рассмотренных выше регуляторных актов более вероятна для митохондрий и хлоропластов, которые на начальном эволюционном пути были самостоятельными организмами и сохранили характерные принципы структурной организации. Передача информации с помощью ацетилхолина и биогенных аминов от плазмалеммы к органеллам или между органеллами напоминает классический принцип межклеточной передачи возбуждения в синапсе. Это подтверждается тем, что

медиаторную и регуляторную роль ацетилхолин и биогенные амины проявляют в достаточно низких концентрациях (10^{-9} – 10^{-7} М).

Высокие концентрации медиаторов выполняют иную роль. Прежде всего, это связано со стрессовой ситуацией. Аккумуляция катехоламинов ведет к ОВ реакциям с образованием ядовитых продуктов их окисления (адренохром) или синтезу на их основе алкалоидов (d-тубокурарин, берберастин и др.). Рост содержания ацетилхолина угнетает активность ферментов, и в частности холинэстераз. При неблагоприятных воздействиях факторов внешней среды возрастает протекторная роль биогенных аминов.

Однако аккумуляция биомедиаторов не всегда показатель стресса; она может быть таксономическим признаком, например для семейства *Urticaceae*. В растениях этого семейства аккумуляция в стрекательных волосках служит средством защиты от механического повреждения животными.

Таким образом, роль ацетилхолина и биогенных аминов в растениях довольно разнообразна, и наряду с общебиологическими (регуляторная, сигнальная, медиаторная) они выполняют и ряд специфических функций.

Имеющиеся пока сведения о роли биомедиаторов в жизни растений носят в основном феноменологический характер. По мере накопления данных о характере действия ацетилхолина и биогенных аминов на различные процессы в растительной клетке необходима разработка подходов к расшифровке механизма этого действия. Особое значение имеет вскрытие взаимоотношений биомедиаторов с фитогормонами и ингибиторами роста.

Несмотря на то что фундаментальные исследования механизмов сенсорных реакций растений с участием биомедиаторов находятся на начальных этапах, однако уже появились возможности использования полученных данных в прикладных целях.

Во-первых, одной из причин повреждения растений при обработке инсектицидами является то, что в них содержится холинэстераза, это не учитывается при обработке посевов. Во-вторых, сенсорные способности растений могут быть использованы для разработки тестов на присутствие пестицидов и испытания новых средств защиты растений. Простота приготовления и доступность растительного материала делают возможным использовать отдельные ткани, клетки и органеллы для разработки биосенсоров в биохимической диагностике. В-третьих, данные о содержании и метаболизме биомедиаторов в растениях имеют практическое значение для медицины и фармакологии как основа получения новых лекарственных препаратов растительного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. *Денисенко П. П.* Роль холинреактивных систем в регуляторных процессах. М.: Медицина, 1980. 296 с.
2. *Ониани Д.* Регуляция циклозиса клеток водорослей. Тбилиси: Тбилисский университет, 1997. 246 с.
3. *Медведев С. С.* Электрофизиология растений: Учеб. пособие. СПб.: СПб университет, 1998. 184 с.
4. *Рощина В. В.* Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и биогенные амины. Пущино, 1991. 193 с.
5. *Юрин В. М., Иванченко В. М., Галактионов С. Г.* Регуляция функций мембран растительных клеток. Мн.: Наука и техника, 1979. 200 с.

Дополнительная

1. *Федоров Н. А.* Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. М.: Медицина, 1979. 184 с.
2. *Бабаков А. В., Абрамычева Н. Ю.* GTP-связывающие белки в плазматических мембранах высших растений // Биологические мембраны. 1989. Т. 6. С. 262 – 266.
3. *Харборн Д.* Введение в экологическую биохимию. М.: Мир, 1985.
4. *Овчинников Ю. А.* Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Лекция 1. Биомедиаторы, их синтез и катаболизм	5
Лекция 2. Реакция растений на действие биомедиаторов	24
Лекция 3. Система циклических нуклеотидов	32
Лекция 4. Физиологическая и регуляторная роль Ca^{2+}	41
Лекция 5. Системы регуляции с участием медиаторов	51
Лекция 6. Электрические явления у растений	83
Лекция 7. Циклоз	93
Лекция 8. Регуляторные функции биомедиаторов в растениях	105
Заключение	125
Литература	127

Учебное издание

Юрин Владимир Михайлович

БИОМЕДИАТОРЫ В РАСТЕНИЯХ

Курс лекций

В авторской редакции

Художник обложки *Е. П. Протасеня*
Технический редактор *Г. М. Романчук*

Корректор *Н. И. Мирончик*

Компьютерная верстка

А. Н. Мальцевой

Ответственный за выпуск

Т. М. Турчиняк

Подписано в печать 30.12.2004.
Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 7,44. Уч.-изд. л. 7,29.
Тираж 100 экз. Зак.

Белорусский государственный университет.

Лицензия на осуществление
издательской деятельности
№ 02330/0056804 от 02.03.2004.
220050, Минск,
проспект Франциска Скорины, 4.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика
в Республиканском
унитарном предприятии
«Издательский центр
Белорусского государственного
университета».

Лицензия на осуществление
полиграфической деятельности
№ 02330/0056850 от 30.04.2004.
220030, Минск, ул. Красноармейская, 6.