

Шибарова Анна Николаевна

**АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА  
ПРОТОННУЮ ПРОНИЦАЕМОСТЬ  
И АКТИВНОСТЬ  $H^+$ -АТФАЗЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК ВЫСШЕГО  
РАСТЕНИЯ (*CUCURBITA PEPO*)**

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

*Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук*

Нижний Новгород  
2006

Работа выполнена на кафедре биофизики Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
**Пятыгин Сергей Станиславович**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Лобов Виктор Павлович**  
кандидат биологических наук, доцент  
**Дятлова Ксения Дмитриевна**

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и  
биофизики Каз.НЦ РАН

Защита состоится «27» июня 2006 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета К 212.166.06 Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23).

**e-mail:** [dec@bio.unn.ru](mailto:dec@bio.unn.ru)

**fax:** (8312) 34-50-56

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского.

Автореферат разослан «26» мая 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент

И. Ф. Александрова

## ОСНОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

**АФК** – активные формы кислорода, **БМ** – биомембраны, **ДЦКД** – дициклогексилкарбодиимид, **КЦХФГ** – карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон, **МДА** – малоновый диальдегид, **ПМ** – плазматические мембраны, **ПОЛ** – перекисное окисление липидов, **РАО** – радиоадаптивный ответ, **ЭМД** – эффекты малых доз, **9-АА** – 9-аминоакридин, **I<sub>фл</sub>** - интенсивность флуоресценции.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одним из наиболее изучаемых вопросов в радиационной биологии является природа структурно-функциональных изменений, которые происходят в мембране под действием ионизирующего излучения. Результаты исследований, полученные в последние годы, весьма определенно свидетельствуют о том, что облучение в малых дозах вызывает многочисленные структурные перестройки в клеточных мембранах, сохраняющиеся длительное время после облучения и приводящие к изменению функциональной активности клеток (Бурлакова, 1994; Кузин, 1995; Burlakova, 2000; Кудряшов, 2004). В структурно-метаболической теории А. М. Кузина (1986), а также в концепции «мембранного механизма биологического действия малых доз» Л. Х. Эйдуса (2001) приводятся доказательства, что первичной мишенью действия радиации в малых дозах является не ДНК, а именно клеточные мембраны, и в этом состоит принципиальное отличие эффектов, вызываемых облучением в малых дозах по сравнению с большими. Следует отметить, что эксперименты по изучению действия ионизирующей радиации в малых дозах до сих пор в основном проводились на объектах животного происхождения. Практически отсутствуют работы в этом направлении, выполненные на растительных объектах, которым обычно отводится роль «переносчиков» радионуклидов по пищевым цепям. Между тем радионуклиды, поступая в растения из почвы и накапливаясь в их тканях, оказывают влияние излучением в малых дозах на многие процессы, которые происходят непосредственно в растительном организме.

Ионизирующая радиация в летальных и сублетальных дозах вызывает увеличение в мембране окислительных процессов, в частности усиление процессов перекисного окисления липидов, в результате которого происходит окислительная деградация мембранных структур (Кудряшов, 2004). Специфика нарушения окислительно-восстановительного равновесия при действии малых доз ионизирующей радиации пока не представляется однозначной.

Важнейшим показателем, от которого зависит нормальное функционирование клетки, является состояние барьера ионной проницаемости плазмалеммы. Изменение проницаемости мембраны тесно связано с её структурным состоянием (Владимиров, 2002). На настоящий момент недостаточно изученными остаются молекулярные механизмы биологического действия радиации в малых дозах на проницаемость мембраны и системы активного транспорта ионов в клетках высших растений. Известно, что на роль такой транспортной системы в растительных клетках претендует протонный насос, представленный  $H^+$ -АТФазой (Palmgren, 1991; Morsomme, Boutry, 2000). Большинство клеток растений характеризуется низкой проницаемостью для протона по сравнению с другими катионами, что определяет в значительной мере эффективность работы протонной АТФазы и поддержание рН-стата на оптимальном уровне (Воробьев, 1988; Опритов и др., 1991).

В этой связи вполне правомерно ожидать, что под действием ионизирующей радиации в малой дозе в плазматической мембране (ПМ) растительной клетки будут активироваться окислительные процессы, которые неизбежно отразятся на структурно-функциональном состоянии мембраны.

Исходя из этого, было проведено исследование влияния ионизирующей радиации при облучении малыми дозами на структурное состояние плазматических мембран, связанное с ним изменение барьера протонной проницаемости и активность ключевой транспортной системы плазматических мембран  $H^+$ -АТФазы в везикулах ПМ клеток высшего растения.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы состояла в изучении изменения ряда основных структурно-функциональных показателей плазматических мембран клеток высшего растения (*Cucurbita pepo*) в результате воздействия малых доз ионизирующей радиации.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Анализ нарушения  $H^+$ -проницаемости везикул плазматических мембран клеток растений при действии малых доз ионизирующей радиации.
2. Регистрация изменения содержания продуктов перекисного окисления липидов в результате радиационного воздействия.
3. Анализ действия низкодозового ионизирующего излучения на гидролитическую активность  $H^+$ -АТФазы плазматических мембран.
4. Определение характера изменений кинетических параметров работы фермента в норме и при облучении.
5. Изучение модифицирующего влияния ионов  $Ca^{2+}$  на гидролитическую активность  $H^+$ -АТФазы в условиях воздействия ионизирующей радиации.

Все исследования проводились на изолированной фракции везикул плазматических мембран, что позволило разделить изучение пассивного транспорта ионов  $H^+$  и функционирование системы активного переноса протона через мембрану, и исключить при этом эффекты действия малых доз радиации немембранной природы.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- ü Под действием ионизирующей радиации в малой дозе (0,5 мГр/час) происходит активация процессов липопероксидации ПМ в первые минуты облучения.
- ü Значительные изменения в структуре ПМ в связи с активацией ПОЛ в результате низкодозового облучения приводят к возрастанию протонной проницаемости ПМ, и увеличению входящего потока ионов  $H^+$  в клетку.
- ü Закисление цитозоля в результате «протонной вспышки», а также изменения в структуре ПМ приводят к увеличению гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы – ключевой транспортной системы ПМ растительной клетки.
- ü Выявленный феномен стимуляции активности  $H^+$ -АТФазы может быть связан как с изменением конформации фермента под действием облучения, так и нарушением регуляторного контроля за его работой.
- ü В результате воздействия ионизирующей радиации в малой дозе происходит активация протонной сигнальной системы, вследствие чего можно ожидать изменение функционального статуса растительной клетки в целом.

**Научная новизна.** Впервые обнаружено, что в условиях воздействия малых доз ионизирующей радиации происходит быстрое и значительное изменение протонной проницаемости плазматических мембран клеток высшего растения. Показано, что даже незначительная по величине доза облучения вызывает резкое возрастание  $H^+$ -проводимости мембраны. Уже в первые минуты облучения происходит быстрая потеря протонного градиента везикул, а при последующих сроках облучения скорость пассивного транспорта ионов  $H^+$  замедляется.

Получены новые данные, согласно которым в результате воздействия ионизирующего излучения происходит активация процессов липопероксидации в ПМ растительных клеток, о чем свидетельствует повышение содержания продуктов ПОЛ – МДА и оснований Шиффа. Изменения в структуре плазмалеммы, в результате активации процессов ПОЛ происходят в первые минуты при облучении малыми дозами и могут лежать в основе нарушения проницаемости мембраны для протона.

Впервые исследован характер изменения активности транспортной системы ПМ растительных клеток  $H^+$ -АТФазы в условиях низкодозового ионизирующего излучения. Выявлен феномен активирующего действия малых доз ионизирующего излучения на работу

фермента. Показано, что модулирующее влияние малых доз ионизирующего излучения на  $H^+$ -АТФазу мембранных везикул проявляется в том, что ее гидролитическая активность возрастает. Прирост активности зависит от времени облучения.

Установлено, что в результате воздействия ионизирующей радиации происходит изменение кинетических и регуляторных свойств  $H^+$ -АТФазы. Показано возрастание регуляторного эффекта ионов кальция в отношении данной ферментной системы под действием малых доз ионизирующего излучения. Изменение кинетических параметров работы фермента: скорости распада фермент-субстратного комплекса и сродства фермента к субстрату может свидетельствовать о том, что в результате воздействия радиации в малой дозе произошли структурные перестройки активного центра  $H^+$ -АТФазы.

На основании полученных данных сделан вывод об активации протонной сигнальной системы в растительной клетке в результате воздействия ионизирующей радиации в малой дозе.

Сформулировано и обосновано положение о высокой чувствительности структурного состояния, а также систем пассивного и активного транспорта ПМ клеток высшего растения к низкодозовым радиационным воздействиям.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты изучения структурно-функциональных изменений ПМ при действии малых доз ионизирующей радиации имеют важное значение для понимания различия в особенностях воздействия малых и больших доз ионизирующего излучения. Они вносят вклад в расшифровку мембранного механизма действия малых доз ионизирующей радиации. В условиях повышения уровня радиоактивного загрязнения природных экосистем все живые организмы подвергаются дополнительному воздействию малых доз ионизирующего излучения, поэтому очень важным представляется выяснение процессов, происходящих при этом в растительной клетке.

Наблюдаемый феномен активации работы фермента  $H^+$ -АТФазы, а также нарушение  $H^+$ -проницаемости и активация процессов липопероксидации в условиях воздействия малых доз ионизирующей радиации, свидетельствует о необходимости с осторожностью относиться к применению метода радиационной стимуляции в сельском хозяйстве. Любое вмешательство в тонко отрегулированную систему поддержания окислительно-восстановительного равновесия, а также в процессы пассивного и активного транспорта ионов через мембрану, может иметь весьма существенные функциональные последствия для растительной клетки и растения в целом. Основные результаты работы могут быть включены в соответствующие разделы спецкурсов и лекций общего курса радиобиологии и физиологии растений.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на VI и IX Нижегородской сессии молодых ученых (Нижний Новгород, 2001, 2004), III сессии школы-семинара «Экологическая и промышленная безопасность» (Саров, 2003), III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), III международной междисциплинарной конференции «НБИТТ-21» (Петрозаводск, 2004).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы (1 глава), описания объекта и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения (2 главы), заключения, выводов и списка литературы (196 работ, в том числе 64 иностранных). Работа изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 16 рисунков и 3 таблицы.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходным растительным материалом для данных исследований служили 10-12-дневные проростки тыквы *Cucurbita pepo* L. сорта Мозолевская. Проростки тыквы выращивали 5 дней при температуре 30-32<sup>0</sup>С в темноте и 5-7 дней при температуре 21-23<sup>0</sup>С при освещении люминесцентными лампами. Выращивание проростков тыквы осуществляли на гидропонной основе из керамзита. Полив производили 50%-ной средой Хоглэнда-Арнона. (Гродзинский, 1973).

Фракцию, обогащенную ПМ (~70%), выделяли из стеблей проростков тыквы по методике Леонарда-Ходжеса (Leonard, Hodges, 1973) с последующей очисткой в градиенте плотности сахарозы (34 и 45%). Концентрацию белка в выделенной фракции ПМ определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951) с учетом поправки на сахарозу (Gerhardt, Beevers, 1969). Изучение ориентации везикул полученной фракции ПМ проводили, измеряя АТФазную активность в присутствии аламетицина (Тихая и др., 1984). Везикулы ПМ были полностью инвертированы за счет внесения в среду ресуспендирования неионного детергента Brij 58 в концентрации 0,02% (Johansson et al., 1995). Степень чистоты полученной мембранной фракции оценивали также с помощью ингибиторного анализа.

Облучение изолированных везикул плазматических мембран производили стандартным источником  $\beta$ -излучения (<sup>90</sup>Sr-<sup>90</sup>Y) с активностью 90 кБк. Облучение микросомальной фракции ПМ осуществляли в круглой кювете при толщине слоя жидкости 1 мм и воздушной прослойке 1см, при температуре 4<sup>0</sup> С. Применяли однократное облучение с экспозициями от 5 до 60 мин, мощность поглощенной дозы облучения при этом составила 0,5 мГр/час.

О пассивной проницаемости везикул, имеющих внутри щелочную среду (рН 8,0), судили по сдвигу в них рН, возникающем при внесении фракции в более кислую среду (рН

5,5). Величину градиента рН измеряли флуориметрически с использованием зонда 9-АА при длине волны возбуждения и флуоресценции соответственно 408 и 456 нм (Deamer, et al., 1972). Регистрировали динамику изменения интенсивности флуоресценции ( $I_{фл}$ ) в виде записи кинетических кривых. Относительный уровень содержания оснований Шиффа оценивали по их собственной флуоресценции при длине волны возбуждения 360 нм и испускания 430 нм (Fletcher, 1973). Количество образующегося МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой в кислой среде (Орехович, 1977).

Степень чистоты полученной мембранной фракции оценивали с помощью ингибиторного анализа. АТФазная активность подавлялась примерно на 60%  $Na_3VO_4$  (специфическим ингибитором  $H^+$ -АТФазы ПМ) и практически не уменьшалась под влиянием  $NaN_3$  (специфический ингибитор митохондриальной АТФазы) и  $NaNO_3$  (специфический ингибитор АТФазы тонопласта).

АТФазную активность ПМ определяли по количеству неорганического фосфата, отщепляемого в ходе реакции от АТФ. Количество неорганического фосфата определяли спектрофотометрически по методу Лоури-Лопец (Болдырев, 1977). Определяли зависимость АТФазной активности ПМ от концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в среде инкубации. Концентрацию  $Ca^{2+}$  в среде рассчитывали с помощью программы CHELATOR (Schoenmakers et al., 1992).

Опыты проводили в 5-7-кратных повторностях. Результаты экспериментов обрабатывали при помощи методов вариационной статистики (Лакин, 1973).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Изменение  $H^+$ -проницаемости и содержания продуктов перекисного окисления липидов в везикулах плазматических мембран клеток растений при действии малых доз ионизирующей радиации.**

*Модификация  $H^+$ -проницаемости везикул плазматических мембран клеток растений при действии малых доз ионизирующей радиации.* Важнейшим показателем, от которого зависит нормальное функционирование клетки, является состояние барьера ионной проницаемости плазмалеммы. Для изучения эффекта ионизирующей радиации в малой дозе на  $H^+$ -проницаемость регистрировали в виде записи типичных кривых изменения  $I_{фл}$  9-АА.

Как видно из рисунка 1, внесение в среду (рН 5,5) необлученной фракции ПМ (рН 8,0) сопровождается быстрым увеличением  $I_{фл}$  9-АА, обусловленным поступлением зонда в везикулы. По завершении процесса накопления зонда в везикулах  $I_{фл}$  становится стабильной и дальнейшего изменения ее уровня не наблюдается. Добавление протонифора КЦХФГ



индуцирует тушение  $I_{\text{фл}}$ , что указывает на наличие  $\Delta\text{pH}$  на мембране везикул и его последующую диссипацию.

По-другому протекает динамика изменения  $I_{\text{фл}}$  при добавлении в среду (рН 5,5) фракции облученных везикул (рН 8,0). Связанное с аккумуляцией зонда первоначальное возгорание флуоресценции сменяется медленно релаксирующей (в течение нескольких минут) фазой тушения, свидетельствующей о смещении рН в везикулах в кислую область в результате входа в них  $\text{H}^+$ .

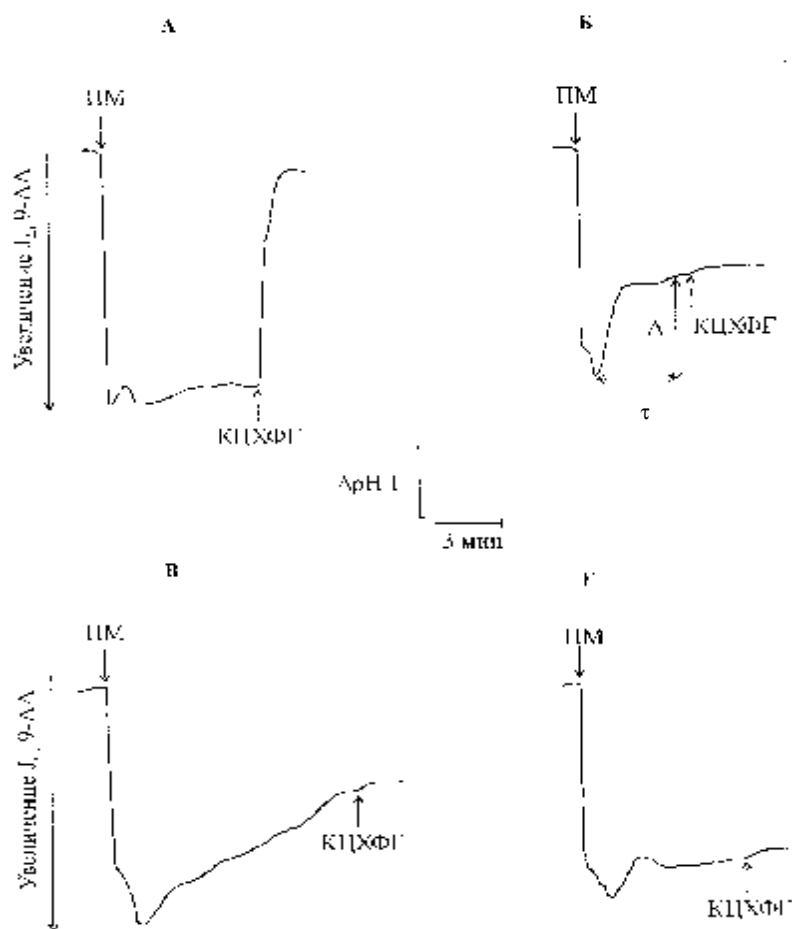


Рис. 1. Типичные кривые изменения интенсивности флуоресценции ( $I_{\text{фл}}$ ) зонда 9-АА при внесении в среду необлученной (А) и облученной фракций ПМ (Б – 5 мин, В – 10 мин, Г – 20 мин)

А – амплитуда,  $\tau$  - время фазы релаксации

Фаза тушения заканчивается установлением более низкого стационарного уровня  $I_{\text{фл}}$  вследствие выравнивания концентраций протона в среде и в везикулах, о чем свидетельствует отсутствие реакции на последующее добавление КЦХФГ. Появление фазы тушения является доказательством резко возросшей пассивной  $\text{H}^+$ -проницаемости везикул, подвергнутых действию радиации. Количественный анализ показывает достоверные отличия

в скоростных и амплитудных параметрах фазы тушения у везикул, получивших разные временные дозы облучения.

Из таблицы 1 следует, что в наибольшей степени барьер пассивной протонной проницаемости мембраны везикул оказывается нарушенным при 20 и 40-минутном облучении. Для них характерна минимальная амплитуда фазы тушения и величина сдвига рН вследствие значительной потери градиента по сравнению с исходным ( $\Delta\text{pH} = 2,5$  ед.).

Таблица 1.

**Параметры фазы тушения  $I_{\text{фл}}$ , возникающей при сдвиге исходного  $\Delta\text{pH}$  (2,5 ед.) в микросомальной фракции ПМ, при разных экспозициях облучения ионизирующей радиацией в малой дозе (по 4 опытам)**

Время облучения, мин	Время релаксации ( $\tau$ ), мин	Амплитуда (A), в ед. $\Delta\text{pH}$	Скорость: $\Delta\text{pH}/\tau$
5	<b><math>2,4 \pm 0,6</math></b>	<b><math>1,29 \pm 0,16</math></b>	<b><math>0,59 \pm 0,13</math></b>
10	<b><math>8,4 \pm 0,3</math></b>	<b><math>1,95 \pm 0,43</math></b>	<b><math>0,23 \pm 0,08</math></b>
20	<b><math>6,2 \pm 0,8</math></b>	<b><math>0,62 \pm 0,07</math></b>	<b><math>0,10 \pm 0,03</math></b>
40	<b><math>6,4 \pm 0,5</math></b>	<b><math>0,64 \pm 0,30</math></b>	<b><math>0,10 \pm 0,02</math></b>

Различия достоверны для всех попарно сравниваемых вариантов облучения  $p < 0,05$ .

Следует отметить, что в норме ПМ растительных клеток обладает весьма низкой проницаемостью для протона, что является необходимым фактором для поддержания внутриклеточного рН, от которого зависит функциональный статус многих метаболических процессов, протекающих в растительной клетке. Увеличение протонной проницаемости ПМ, в результате действия малых доз ионизирующей радиации может иметь весьма существенные последствия для метаболизма растительной клетки в целом.

Существует большое количество экспериментальных данных, полученных на необлученных клетках, которые свидетельствуют о тесной связи ионной проницаемости и ионного транспорта со структурным состоянием клеточной мембраны. Исходя из полученных данных, можно предположить, что наблюдаемое при облучении мембранных везикул малыми дозами ионизирующей радиации значительное нарушение проницаемости плазматической мембраны для протона, вероятно, является следствием структурных перестроек в мембране, вызванных облучением. Ионизирующие излучения вызывают повреждение липидной структуры ПМ и нарушение её барьерных функций. Этот процесс может быть обусловлен способностью фосфолипидов формировать мицеллярные и гексагональные фазы, обладающие высокой проницаемостью. Мицеллярные и

гексагональные структуры способны формировать сквозные поры в мембране, доступные для диффузии воды и ионов. Диффузия катионов может быть обусловлена их прохождением через динамические мицеллярные поры, стенки которых образованы полярными группами фосфолипидов (Антонов, 1982).

В качестве возможного механизма нарушения проницаемости, вызванного облучением, многие авторы рассматривают активацию перекисного окисления липидов мембран, которое непрерывно протекает в условиях физиологической нормы (Мирзоев и др., 2002; Пирутин и др., 2002; Заводник и др., 2003).

Для определения интенсивности процессов ПОЛ везикул ПМ в условиях воздействия ионизирующего излучения измеряли количество образующегося малонового диальдегида (МДА) и оснований Шиффа при разных временных экспозициях.

*Содержание малонового диальдегида в везикулах плазматических мембран в норме и при облучении.* Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о нелинейном характере изменения количества МДА. Как видно из представленных данных при действии ионизирующей радиации в течение 5 минут на фракцию везикул ПМ, наблюдается значительное увеличение содержания МДА. Т. к. МДА является вторичным продуктом ПОЛ, можно заключить, что усиление окислительных процессов в мембране наступает фактически сразу же при действии даже небольших доз ионизирующей радиации. Дальнейшее снижение уровня МДА при облучении можно рассматривать как результат активации репарационных процессов и утилизации образовавшихся продуктов ПОЛ.

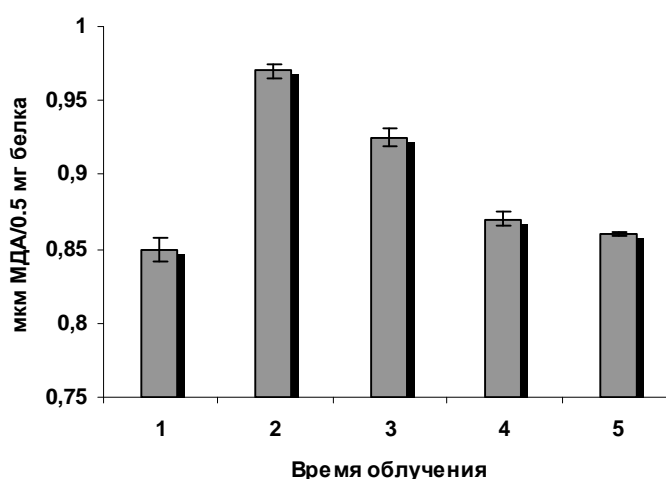


Рис. 2. Динамика изменения содержания малонового диальдегида (МДА) микросомальной фракции ПМ при различных экспозициях облучения ионизирующей радиацией в малой дозе

1 – необлученные везикулы (контроль);  
2 – везикулы, облученные 5 мин; 3 – 10 мин; 4 – 20 мин; 5 – 40 мин

*Определение содержания оснований Шиффа в микросомальной фракции ПМ при облучении.* На рис. 3 приведены данные по содержанию оснований Шиффа в

микросомальной фракции ПМ до облучения и при различных сроках облучения. Изменение содержания оснований Шиффа и МДА носит схожий характер. Количество оснований Шиффа резко возрастает уже после пяти минут облучения, достигая максимума на 10 минуте, а на 20-й, и 40-й минутах – снижается до уровня, который остается достоверно выше контрольного. Также и содержание МДА при 40-минутной экспозиции достоверно не отличается от контроля

Можно предположить, что при действии низкоинтенсивного ионизирующего облучения изменение в содержании продуктов ПОЛ в микросомальной фракции ПМ растений носит репарационный характер и происходит дальнейший распад (утилизация) этих соединений на фоне продолжающегося действия радиации.

Таким образом, нарушение барьера проницаемости ПМ для протона в первую очередь, может быть связано со структурными перестройками липидного бислоя, вызванными усилением окислительных процессов под действием облучения.

Несмотря на то, что первичные продукты ПОЛ образуются в большем количестве по сравнению со вторичными (Владимиров, 2002), являются высокорекреационными и обладают малым временем жизни, они в меньшей степени дестабилизируют мембрану. Скорее всего, роль увеличения ионной проницаемости наряду с более поздними вторичными продуктами ПОЛ принадлежит также гидроперекисям, которые способны образовывать гидрофильные поры в мембране за счет выталкивания гидроперекисных группировок на поверхность. В то же время в более поздних работах по изучению мембранного механизма повреждающего действия радиации эффект УФ-радиации на мембрану наряду с гидроперекисями и с вторичными продуктами ПОЛ связывают также с появлением видоизмененных аминокислот и белков (Пирутин, 2002).

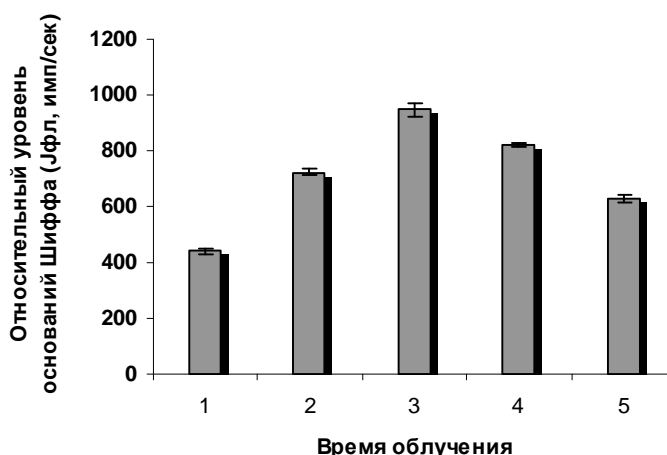


Рис. 3. Относительный уровень оснований Шиффа в микросомальной фракции ПМ при разных экспозициях облучения ионизирующей радиацией в малой дозе

1 – необлученные везикулы (контроль);

2 – везикулы, облученные 5 мин; 3 – 10 мин; 4 – 20 мин; 5 – 40 мин

Поскольку спектр действия ПОЛ затрагивает мембранные белки (Владимиров, 2002), то есть основания полагать, что в нарушении барьера проницаемости везикул при облучении наряду с липидами участвуют белковые компоненты мембран. По существующим представлениям белковые комплексы, по-видимому, играют важную роль в механизме протонной проводимости мембран (Keyzer et al., 2003). Трансмембранный перенос  $H^+$  может происходить через SH-группы белковых цепей в каналах и белков-переносчиков, локализованных у различных поверхностей мембраны, которые функционируют как доноры и акцепторы протонов (Мнацкян и др., 2002). Изменение конформации белковых транслокаторов в результате их взаимодействия с продуктами ПОЛ будет неизбежно сказываться на состоянии барьера протонной проницаемости плазмалеммы.

Увеличение пассивной проницаемости ПМ, происходящее в первые минуты облучения может быть рассмотрено в качестве пускового механизма в проявлении лучевого поражения при действии облучений в малых дозах.

При анализе участия различных сигнальных систем в защитных реакциях растительных клеток на действие повреждающих агентов было выявлено, что одна из наиболее ранних и экспериментально доказанных реакций клетки – это обратимое изменение концентрации протонов в цитозоле. Существует понятие о «протонной вспышке», которая начинается практически сразу при действии повреждающего фактора и может продолжаться в течение десятков минут (Тарчевский, 2001). Т. е. резкое возрастание протонной проницаемости в первые минуты после облучения может свидетельствовать об активации в мембране растительной клетки протонной сигнальной системы, в рамках которой естественно ожидать изменения функционирования протонного насоса представленного  $H^+$ -АТФазой, который обеспечивает поддержание  $H^+$ -градиента на плазмалемме. Кроме того, зарегистрированное увеличение интенсивности процессов липопероксидации может также оказывать существенное воздействие на работу  $H^+$ -АТФазы, которая являясь интегральным белком, зависима от липидного окружения в мембране.

**Действие малых доз ионизирующего излучения на функционирование  $H^+$ -АТФазы плазматических мембран клеток высших растений.** Протонный насос представленный  $H^+$ -АТФазой, осуществляет активный транспорт протонов через плазматическую мембрану, создавая таким образом метаболическую компоненту мембранного потенциала растительных клеток. Формируемый  $H^+$ -АТФазой трансмембранный электрохимический градиент протонов играет важную роль в осуществлении вторичного активного транспорта веществ, регуляции осмотических свойств клетки и внутриклеточного рН.

*Изменение гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы.* Для изучения влияния малых доз ионизирующей радиации на работу  $H^+$ -АТФазы измеряли её гидролитическую активность при разных временных экспозициях облучения. Модулирующее влияние малых доз ионизирующего излучения на  $H^+$ -АТФазу мембранных везикул проявлялось в том, что её гидролитическая активность возрастала (Рис 4). Прирост активности зависел от времени облучения и при 30 мин экспозиции достигал 50%. При дальнейшем увеличении времени облучения до 50 мин активность фермента оставалась неизменной. Это позволяет предположить, что гидролитическая активность фермента стабилизировалась на новом стационарном уровне, переход на который в условиях воздействия малой дозы радиации зависел от длительности облучения. Полученные данные подтверждают мнение многих исследователей о высокой чувствительности ферментов активного транспорта ионов к радиационному воздействию даже в малых дозах (Рыскулова, 1986; Дворецкий, Егорова, 1990; Мирзоев и др., 2002).

Повышение гидролитической активности фермента, вероятно, явилось следствием возросшей  $H^+$ -проницаемости везикул ПМ. Как и ожидалось, для поддержания существующего градиента протона активность  $H^+$ -АТФазы ПМ возросла, но до определенного предела. В качестве одной из вероятных причин феномена стимулирующего влияния излучения в малых дозах на активность  $H^+$ -АТФазы, можно назвать изменение внутриклеточного рН в результате увеличения проницаемости ПМ для  $H^+$ .

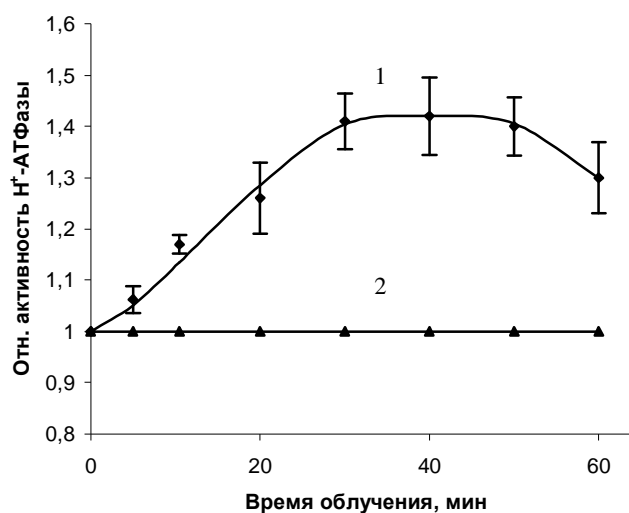


Рис. 4. Зависимость изменения гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы в результате воздействия малых доз ионизирующей радиации от времени облучения 1-облученные мембраны; 2-контроль

Кроме того, активность фермента находится под контролем со стороны мембраны, которая претерпела структурные изменения в результате радиационного воздействия. Можно сделать предположение, что изменение активности фермента в ранние сроки

облучения, с одной стороны вызвано необходимостью поддержания ионного гомеостаза, нарушенного в результате повышения пассивного транспорта протона, с другой стороны может быть связано с изменением липидного окружения фермента, как впрочем, и повреждением структуры самого фермента в результате действия ионизирующей радиации даже в небольшой дозе.

Так как спектр действия ионизирующей радиации затрагивает не только липидные, но и белковые компоненты мембраны, то естественно предположить, что облучение везикул ПМ в малой дозе привело также к изменению конфигурации активного центра  $H^+$ -АТФазы, которое может сопровождаться изменением сродства субстрата к  $(Mg^{2+}$ -АТФ) – связывающему центру фермента и соответствующим повышением гидролитической активности фермента. (Рыскулова, 1986). Исследования, проведенные на тенях эритроцитов, показали, что изменение активности фермента  $Ca^{2+}$ -АТФазы, которое происходит при действии ионизирующей радиации в малой дозе ( $4 \cdot 10^{-3}$  Гр), является результатом конформационных перестроек молекулы фермента. Облучение даже в малой дозе вызывало модификацию структуры активного центра фермента  $Ca^{2+}$ -АТФазы, что сопровождалось изменением сродства фермента к субстрату и скорости распада фермент-субстратного комплекса (Древаль, Зима, 2000). Представленные данные дают основания предполагать, что действие ионизирующей радиации в малой дозе на  $H^+$ -АТФазу также может вызывать конформационные изменения в молекуле фермента, сопровождающиеся изменением скорости ферментативной реакции и сродства фермента к субстрату, поэтому представлялось важным изучить кинетические характеристики работы  $H^+$ -АТФазы в условиях её повышенной активности в результате облучения.

*Кинетические параметры работы фермента в норме и при облучении.* Установлено, что в кооперативной системе белок-липидного матрикса мембран радиационно-индуцированные нарушения структуры мембраны приводят к изменению свойств интегральных белков.  $H^+$ -АТФаза, являясь интегральным белком плазматических мембран, достаточно чувствительна к нарушениям их структуры. Изменение активности  $H^+$ -АТФазы при действии ионизирующей радиации в малой дозе может быть связано с вызываемыми радиацией перестройками самой белковой молекулы фермента.

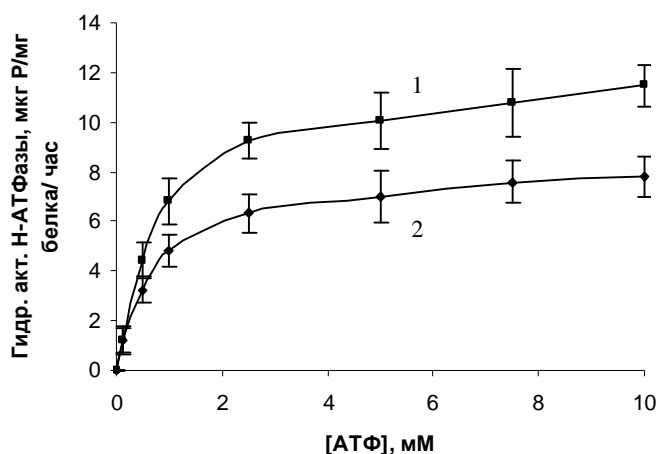


Рис. 5. Кинетические кривые изменения скорости гидролиза АТФ Н<sup>+</sup>-АТФазой ПМ от концентрации субстрата, при действии ионизирующей радиации  
 1 - везикулы ПМ, подвергнутые облучению в течение 30 мин;  
 2 – необлученные везикулы ПМ

Само по себе определение активности фермента по нарастанию содержания неорганического фосфата недостаточно информативно, поскольку не раскрывает механизм наблюдаемого изменения. Для понимания механизмов изменения активности Н<sup>+</sup>-АТФазы при облучении, определяли кинетические характеристики фермента: константу Михаэлиса ( $K_m$ ) и максимальную скорость ферментативной реакции ( $V_{max}$ ). Анализ кинетических кривых зависимости скорости гидролиза АТФ от ее концентрации показал, что для везикул, подвергнутых предварительному облучению в течение 30 мин, максимальная скорость процесса гидролиза АТФ была в 1,5 раза выше по сравнению с контролем (Рис. 5).

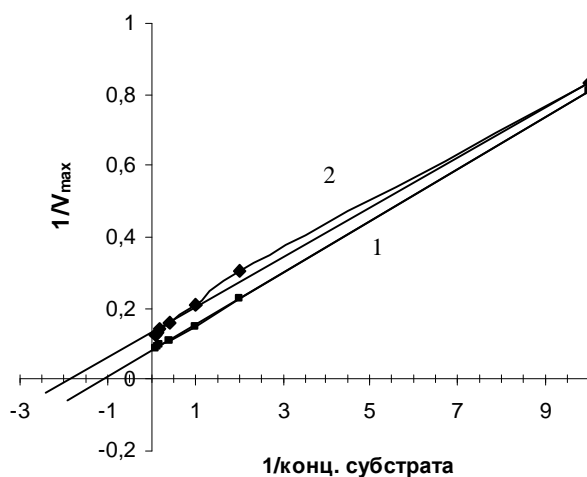


Рис. 6. Определение константы Михаэлиса. Зависимость скорости гидролиза АТФ Н<sup>+</sup>-АТФазой ПМ от концентрации субстрата, при действии ионизирующей радиации в обратных координатах  
 1 - везикулы ПМ, подвергнутые облучению в течение 30 мин;  
 2 – необлученные везикулы ПМ



Величина  $K_m$  процесса при этом также изменилась, но не существенно. Для везикул, подвергнутых облучению, она составила 0,83 мМ, для необлученных везикул – 0,52 мМ (Рис. б). Полученные данные позволяют заключить, что облучение плазматических мембран в малой дозе, вероятно, вызывает структурные изменения активного центра  $H^+$ -АТФазы, сопровождающиеся увеличением скорости распада фермент-субстратного комплекса, но не приводит к значительному изменению сродства фермента к субстрату.

*Модифицирующее влияние ионов  $Ca^{2+}$  на гидролитическую активность  $H^+$ -АТФазы.* В качестве одной из вероятных причин феномена стимулирующего влияния излучения в малых дозах на активность  $H^+$ -АТФазы, можно предположить нарушение регуляторного контроля за её работой. Повреждение регуляторных механизмов, являющихся более хрупкими, чем контролируемая ими функция, нередко происходит под влиянием малых доз неблагоприятного фактора, которые недостаточны для повреждения функционального аппарата (Александров, 1985).

Для исследования этого вопроса были проведены эксперименты, в которых в качестве регулятора активности  $H^+$ -АТФазы использовались ионы  $Ca^{2+}$ . Известно, что ионы  $Ca^{2+}$  являются эффективными регуляторами работы  $H^+$ -АТФазы (Lino, 1998; De Nisi, 1999; Qiu, Su, 1998). По имеющимся данным, увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  (кальциевый сигнал) в цитозоле растительных клеток при возбуждении под влиянием раздражающих стимулов приводит к заметному угнетению как гидролитической, так и транспортной активности  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны.

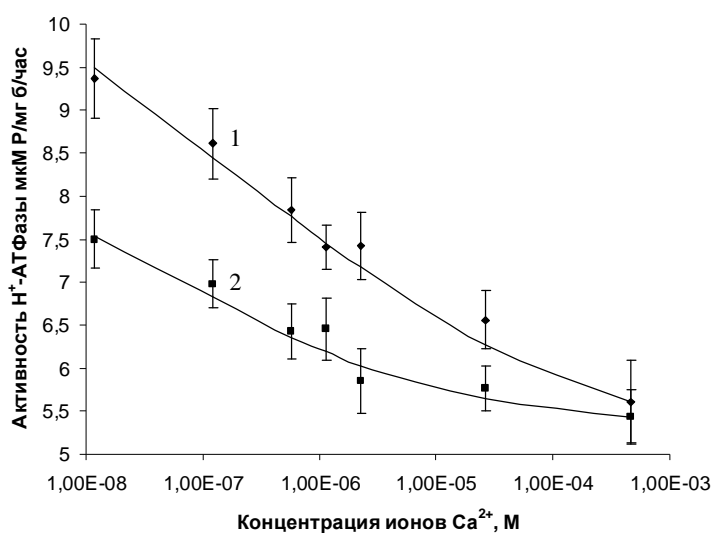


Рис. 7. Зависимость гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы от концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в растворе

- 1 - мембраны после облучения в течение 30 мин;
- 2 - необлученные мембраны

Сравнительное исследование регуляторного эффекта  $\text{Ca}^{2+}$  на активность  $\text{H}^+$ -АТФазы мембранных везикул, необлученных и подвергнутых воздействию малой дозы ионизирующего излучения, проводилось с использованием экспозиции 30 мин.

Концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в среде изменяли от  $10^{-7}$  М (соответствует концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле покоящихся растительных клеток) до  $10^{-4}$  М (концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при возбуждении). Показано, что предварительное облучение везикул плазматических мембран малой дозой радиации приводит к увеличению ингибирующего эффекта  $\text{Ca}^{2+}$  на гидролитическую активность  $\text{H}^+$ -АТФазы в 1,5-2 раза (Рис.7). Полученные данные позволяют предположить, что эффективность кальциевого сигнала в растительных клетках под влиянием малых доз радиации, по-видимому, резко возрастает.

Изменение модифицирующего влияния ионов кальция на гидролитическую активность  $\text{H}^+$ -АТФазы плазматических мембран, на наш взгляд можно объяснить как с позиции вызванного облучением нарушения регуляторного контроля за активностью фермента, так и изменением конформации самого фермента в результате воздействия малых доз ионизирующего излучения. В последнем случае можно предположить, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , конкурируя с ионами  $\text{Mg}^{2+}$  при связывании с молекулой АТФ, могут более эффективно снижать активность фермента, конфигурация активного центра которого изменена в условиях воздействия малых доз радиации.

Для выявления природы изменения регуляторного влияния ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на активность  $\text{H}^+$ -АТФазы были проведены исследования с использованием неспецифического ингибитора мембраносвязанной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеинкиназы, т.к. одним из предполагаемых механизмов ингибирующего воздействия ионов кальция является  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулируемое фосфорилирование фермента.

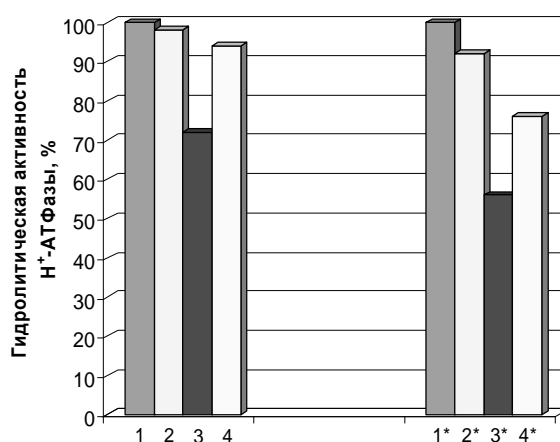


Рис. 8. Гидролитическая активность  $\text{H}^+$ -АТФазы плазматических мембран необлученных везикул (1,2,3,4), и везикул подвергнутых облучению (1\*,2\*,3\*,4\*)

- 1, 1\* - в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации  $10^{-7}$  М
- 2, 2\* - в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации  $10^{-7}$  М и ингибитора протеинкиназы – Н7
- 3, 3\* - в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации  $10^{-4}$  М
- 4, 4\* - в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации  $10^{-4}$  М,

Как видно из рис. 8 добавление в реакционную среду ингибитора протеинкиназы – Н7 в большей степени снимает угнетающее действие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на гидролитическую активность  $\text{H}^+$ -АТФазы у необлученных везикул, чем у везикул, подвергнутых воздействию ионизирующей радиации в малой дозе. Если для необлученных мембран основным механизмом регуляторного эффекта ионов  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* может быть именно  $\text{Ca}^{2+}$ -стимулируемое фосфорилирование фермента (т.е. активация мембраносвязанной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеинкиназы при увеличении концентрации ионов кальция в цитозоле растительной клетки вероятно вызывает фосфорилирование  $\text{H}^+$ -АТФазы, что сопровождается снижением ее активности), то в условиях воздействия ионизирующего излучения вероятно подключаются ранее не задействованные, более эффективные механизмы ингибирующего влияния ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на работу фермента. На основании представленных данных можно заключить, что в условиях воздействия на  $\text{H}^+$ -АТФазу ионизирующей радиации в малой дозе происходит нарушение регуляторных связей данного фермента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, под действием ионизирующей радиации в малой дозе плазматическая мембрана растительных клеток претерпевает значительные структурно-функциональные перестройки. Ионизирующие излучения вызывают окислительное повреждение липидной структуры ПМ и нарушение её барьерных функций.

Анализируя изменение пассивного транспорта протона через мембрану, можно говорить об увеличении протонной проницаемости ПМ, происходящей в первые минуты после облучения. Наиболее быстрая потеря градиента протона везикул происходит после 5-ти минутного облучения, а при последующих сроках облучения скорость пассивного транспорта ионов  $\text{H}^+$  замедляется. В наибольшей степени барьер пассивной протонной проницаемости мембраны везикул оказывается нарушенным при 20-ти и 40-минутном облучении, вследствие значительной потери градиента  $\text{H}^+$  по сравнению с исходным.

Изменение пассивной проницаемости ПМ, происходящее в первые минуты облучения может быть рассмотрено в качестве пускового механизма в проявлении лучевого поражения при действии облучений в малых дозах. В первую очередь, нарушение барьера проницаемости ПМ для протона может быть связано со структурными перестройками

липидного бислоя, вызванными усилением окислительных процессов под действием облучения.

Зарегистрированное увеличение содержания продуктов ПОЛ, таких как МДА и основания Шиффа свидетельствуют об активации в мембране процессов липопероксидации в результате радиационного воздействия. Значительное увеличение содержания продуктов ПОЛ при небольшой временной экспозиции облучения свидетельствует о быстром нарушении окислительно-восстановительного баланса плазмалеммы в условиях повреждающего действия ионизирующей радиации и подтверждает предположение о более высокой чувствительности окислительных процессов к действию низкодозового облучения, чем механизмов репарации, систем антиоксидантной защиты.

Вызванное облучением увеличение  $H^+$ -проницаемости везикул ПМ в результате активации процессов ПОЛ приводит к модификации работы протонного насоса, представленного  $H^+$ -АТФазой, который обеспечивает поддержание  $H^+$ -градиента на плазмалемме. Кроме того, зарегистрированное увеличение интенсивности процессов липопероксидации также оказывает существенное воздействие на работу  $H^+$ -АТФазы, которая являясь интегральным белком, зависит от липидного окружения в мембране.

Результаты исследования работы фермента в условиях воздействия облучения свидетельствуют о высокой чувствительности  $H^+$ -АТФазы, как ключевого фермента плазматических мембран растительной клетки, к воздействию радиации даже в небольшой дозе. Показано, что действие излучения приводит к существенному росту гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы, причем прирост активности имеет немонотонный характер и зависит от времени облучения.

Изучение кинетики ферментативной реакции показало, что облучение плазматических мембран в малой дозе, вероятно, вызывает структурные изменения активного центра  $H^+$ -АТФазы, сопровождающиеся увеличением скорости распада фермент-субстратного комплекса, но не приводит к значительному изменению сродства фермента к субстрату.

В качестве одной из вероятных причин феномена стимулирующего влияния, излучения в малых дозах на активность  $H^+$ -АТФазы, является нарушение регуляторного контроля за её работой. Предварительное облучение везикул плазматических мембран малой дозой радиации приводит к увеличению ингибирующего эффекта  $Ca^{2+}$  на гидролитическую активность  $H^+$ -АТФазы. В условиях воздействия ионизирующего излучения вероятно подключаются ранее не задействованные, дополнительные механизмы ингибирующего влияния ионов  $Ca^{2+}$  на работу фермента.

Таким образом, суммируя полученные данные, схема событий развивающихся в условиях воздействия низкодозового ионизирующего излучения на плазмалемме

растительной клетке представляется нам следующей (Рис. 9). Плазматическая мембрана является весьма чувствительной мишенью действия ионизирующего излучения в малой дозе. В результате такого воздействия происходят изменения как в липидной, так и в белковой компоненте мембраны. Вызванная облучением активация ПОЛ приводит к нарушению протонной проницаемости ПМ, а также изменению вязкости и состава фосфолипидов. Увеличение пассивного транспорта протонов вызывает активацию протонного насоса, представленного  $H^+$ -АТФазой. Кроме того, активность данной ферментной системы зависит от вязкости и состава липидного окружения. Непосредственное действие ионизирующей радиации на белковую молекулу фермента способно приводить к изменению конформации активного центра фермента, что также неизбежно скажется на его чувствительности к регуляторным факторам и как следствие приведет к изменению активности  $H^+$ -АТФазы.

В результате изучения событий, происходящих под действием облучения в малой дозе можно говорить об активации протонной сигнальной системы, которая является одной из ранних реакций растительных клеток на внешние раздражающие стимулы (Тарчевский, 2002). В рамках активации протонной сигнальной можно ожидать изменения метаболизма растительной клетки в целом.

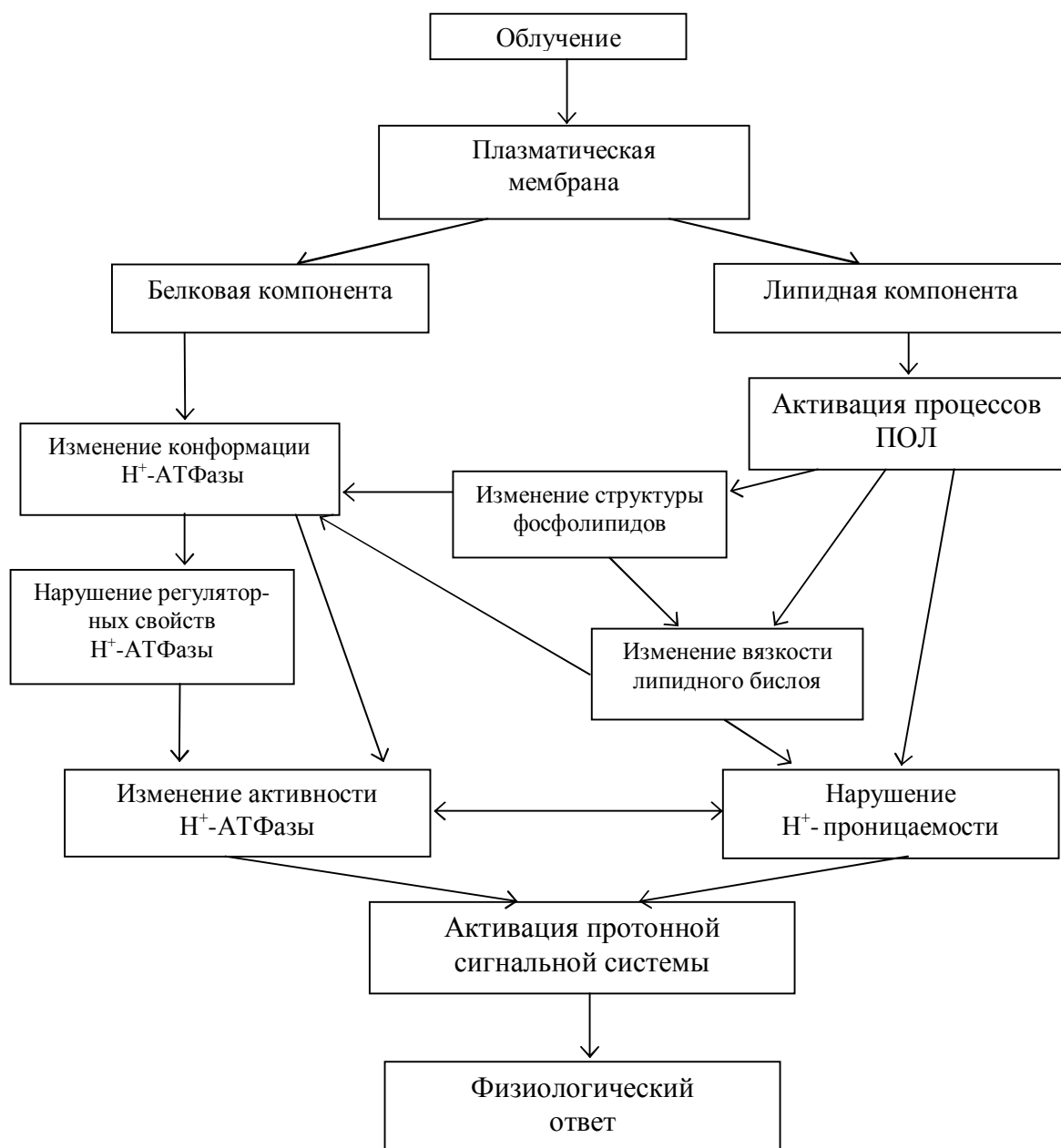


Рис. 9. Предполагаемая схема событий в плазматической мембране, индуцированных действием ионизирующей радиации в малой дозе

## ВЫВОДЫ

1. Воздействие ионизирующей радиации в малой дозе на везикулы ПМ клеток растения приводит к значительному увеличению их протонной проницаемости и диссипации

трансмембранного градиента протона. Увеличение протонной проницаемости коррелирует с повышением уровня липопероксидации в ПМ и может быть следствием окислительного нарушения мембранной структуры, вызванного низкодозовой радиацией

2. Ионизирующая радиация в малой дозе оказывает стимулирующее влияние на активность  $H^+$ -АТФазы, играющей роль протонного насоса. При этом увеличивается скорость распада фермент-субстратного комплекса и нарушается регуляторный контроль за работой фермента (на примере ингибирующего эффекта ионов  $Ca^{2+}$ ). Сродство фермента к субстрату в этих условиях изменяется незначительно.
3. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм влияния ионизирующей радиации в малой дозе на клетки растения включает в качестве важного начального звена активацию протонной сигнальной системы, которая осуществляется при участии систем пассивного (проницаемость) и активного ( $H^+$ -АТФаза) транспорта протонов через ПМ. Предложена схема структурно-функциональных изменений в ПМ клеток растений, вызванных влиянием ионизирующей радиации в малой дозе, которые приводят к активации протонной сигнальной системы.

## **СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Воденеев В.А., **Мокрова (Шибарова) А.Н.** Обоснование возможности участия  $H^+$ -АТФазы плазматических мембран в формировании фазы деполяризации потенциала действия в клетках высшего растения // Тез. докл. шестой нижегородской сессии мол. ученых. Н. Новгород, 2001. С. 152.
2. Орлова О.В., **Шибарова А.Н.**, Пятыгин С.С. Действие малых доз ионизирующей радиации на гидролитическую активность  $H^+$ -АТФазы плазматических мембран клеток высшего растения (*Cucurbita pepo*) // Материалы III сессии школы-семинара «Экологическая и промышленная безопасность». Саров, 2003. С. 263-265.
3. **Шибарова А.Н.**, Орлова О.В., Воденеев В.А., Опритов В.А., Пятыгин С.С. Влияние ионов  $Ca^{2+}$  на гидролитическую активность  $H^+$ -АТФазы плазматических мембран клеток высшего растения (*Cucurbita pepo* L.) при воздействии малых доз ионизирующей радиации // Тез. докл. III съезда биофизиков России. Воронеж, 2004. С.737-738.
4. **Шибарова А.Н.** Регуляторные аспекты функциональной активности  $H^+$ -АТФазы плазматических мембран клеток высшего растения (*Cucurbita pepo* L) в условиях воздействия малых доз ионизирующей радиации // Тез. докл. девятой нижегородской сессии мол. ученых. Н. Новгород, 2004. С. 243-244.
5. **Шибарова А.Н.** Действие ионизирующего излучения в малой дозе на кинетические параметры работы  $H^+$ -АТФазы плазматических мембран клеток высшего растения (*Cucurbita pepo*)// Тез. докл. III международной междисциплинарной конференции «НБИТТ-21». Петрозаводск, 2004. С. 37.
6. **Шибарова А.Н.**, Орлова О.В., Лобкаева Е.П. Влияние импульсного магнитного поля на некоторые биофизические показатели семян тыквы (*Cucurbita pepo* L.) // Вестник ННГУ. Сер. Биология, Вып.1(7), 2004. С. 111-116.
7. Калинин В.А., Глазкова Н.А., **Шибарова А.Н.** Модификация  $H^+$ -проницаемости везикул плазматических мембран клеток растений при действии малых доз ионизирующей радиации // Вестник ННГУ. Сер. Биология, 2005 (в печати).