

## Сайт Биологического Факультета - версия для печати

[Распечатать](#)  
или [вернуться](#)

### НИР на кафедре клеточной биологии и биоинженерии растений Биологического факультета БГУ.

### Научно-исследовательская работа кафедры

Развитие научных исследований на кафедре в последние годы связано с расшифровкой механизмов перестройки функциональных свойств транспортных систем плазматической мембраны и физиолого-биохимических процессов растительных клеток под влиянием экзогенных физико-химических стрессоров. При их действии происходит переключение обмена веществ клетки и растения в целом на новый режим. Для поддержания процессов жизнедеятельности клетки в нормальных и новых условиях среды необходимы взаимосвязанные системы регуляции, включающие генетическую, метаболическую и мембранную. Одной из компонент осуществления мембранной регуляции является изменение свойств транспортных систем плазматической мембраны.

Транспортные системы плазмалеммы обеспечивают неравновесное распределение электролитов и органических веществ по обе стороны мембраны, их поступление, поддержание оптимального внутриклеточного гомеостаза, рецепцию и трансдукцию экзогенных сигналов.

В основе указанных явлений лежит единый первичный рецепторно-конформационный принцип, который в самом общем виде состоит в следующем: взаимодействие белковой молекулы (рецептор) со специфическим эффектором приводит к изменению конфигурации рецептора и последующей передаче сигнала к внутриклеточным мишеням, обеспечивающим быстрый физиологический ответ. Одним из типов рецепторов, встроенных в плазматическую мембрану, являются белковые молекулы, образующие ионные каналы и другие транспортные системы. Экзогенный эффектор, вступая во взаимодействие с транспортными системами плазмалеммы, приводит к модификации их проводимости.

Основными транспортными системами на плазмалемме растительных клеток являются калиевые каналы, H<sup>+</sup>-АТФазная помпа, система транспорта аммония и неселективные ионные каналы.

В зависимости от глубины модифицирующего мембранотропного действия экзогенных факторов изменяется характер и способность клетки и организма в целом адаптироваться к новым условиям.

В этой связи нами была поставлена цель: на основании изучения мембранотропного действия ряда экзогенных факторов (температура, различные виды пестицидов, одно- и поливалентные металлы, полисахариды) выявить возможные модификации транспортно-барьерных свойств плазмалеммы, их влияние на ионный состав, разработать приемы оценки их первичных эффектов и установить изменения в некоторых физиолого-биохимических показателях клетки.

Для осуществления поставленных целей был применены электрофизиологические приемы анализа механизмов воздействия исследуемых стимулов на транспортные системы переноса ионов через плазматическую мембрану растительной клетки, а также использовались радиоизотопные, фотометрические и биохимические методики.

В качестве объектов исследования использовались интернодальные клетки водоросли *Nitella flexilis*, микроводоросли *Chlorella* и проростки ячменя, выращенные в лабораторных условиях.

Рассмотрим вкратце полученные нами за последние годы закономерности действия указанных стрессоров на транспортно-барьерные свойства плазмалеммы растительной клетки.

В результате анализа кратковременного и длительного воздействия повышенной (+32°C) и пониженной (+4°C) температур на клетку *in vivo* установлены механизмы термоиндуцируемой модификации свойств систем пассивного транспорта плазматической мембраны растительной клетки:

- кратковременное повышение температуры ведет к увеличению, тогда как ее снижение - к падению проводимости калиевых каналов. Для наружу- и внутрь выпрямляющих калиевых каналов наблюдается большее снижение входящего тока по сравнению с выходящим. Кратковременное снижение температуры индуцировало замедление, а резкое повышение - ускорение процессов активации и деактивации наружу выпрямляющих калиевых каналов плазматической мембраны;

- длительное воздействие гипотермии не оказывает существенного влияния на свойства калиевых каналов, в то время как в условиях гипертермии происходят значительное падение проводимости наружу- и внутрь

выпрямляющих калиевых каналов плазмалеммы, степень которой зависела от времени воздействия. Отмечается снижение селективности внутрь выпрямляющих калиевых каналов;

- проводимость неселективных ионных каналов падала после кратковременного понижения температуры. Длительное воздействие гипертермии в течение 10 суток приводит к росту, а после 17 суток - к восстановлению проводимости к первоначальному уровню. Проводимость неселективных ионных каналов при гипотермии незначительно уменьшается и выходит на стационарный уровень к 10 суткам экспозиции;

- после 10-суточной экспозиции при повышенных и пониженных температурах наблюдается заметное уменьшение концентрации калия в цитоплазме с последующим ее восстановлением к 17 суткам.

Рецепция экзогенных химических соединений, в частности пестицидов, приводит к функциональным перестройкам ион-транспортных систем плазмалеммы, которые сводятся к следующим:

- пороговые концентрации, т.е. концентрации, вызывающие достоверные сдвиги транспортно-барьерных свойств мембраны, составляют для всех испытанных сим-триазиновых гербицидов и триазоловых фунгицидов  $10^{-6}$  -  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Пиретроидные инсектициды оказывали действие в более низких концентрациях -  $10^{-7}$  моль/л.

- триазоловые фунгициды, сим-триазиновые гербициды и пиретроидные инсектициды характеризуются различной степенью мембранотропной активности, располагаясь по мере ее убывания в соответствующие ряды: пропиконазол тебуконазол ципроконазол; атразин симазин прометрин и эсфенвалерат дельтаметрин циперметрин;

- установленный рост коэффициента селективности  $\alpha = P_{Na}/P_K$  плазмалеммы под действием  $8,4 \cdot 10^{-5}$  моль/л прометрина и  $9,3 \cdot 10^{-5}$  моль/л атразина происходит в результате преимущественного снижения  $P_K$ , а при  $2,3 \cdot 10^{-5}$  моль/л атразина и  $9,9 \cdot 10^{-5}$  моль/л симазина обусловлено увеличением  $P_{Na}$ . Обработка клеток симазином в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л, приводящая к уменьшению альфа, происходит главным образом за счет уменьшения  $P_{Na}$ . Сим-триазины проявляют более выраженное мембранотропное действие в форме неионизированных молекул. В присутствии тебуконазола, а также ципроконазола в концентрациях, не превышающих  $10^{-4}$  и  $3 \cdot 10^{-4}$  М, соответственно, снижается проницаемость плазматической мембраны к ионам  $K^+$ , а в случае ципроконазола и к ионам  $Na^+$ . При экспозициях клеток в растворах, содержащих  $3 \cdot 10^{-4}$  -  $10^{-3}$  моль/л  $Na^+$ , пропиконазол индуцирует рост проницаемости плазмалеммы к ионам  $Na^+$  и, в меньшей степени, к ионам  $K^+$ . Молекулы пропиконазола обладают способностью образовывать более стабильные, по сравнению с двумя другими испытанными триазолами, комплексы с ионами  $Na^+$  и  $K^+$  и, таким образом, выступают в роли ионофора. Пиретроидные инсектициды эсфенвалерат в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л и дельтаметрин вызывают преимущественное падение  $P_K$  и меньшее по величине увеличение  $P_{Na}$ , тогда как циперметрин - уменьшение обоих коэффициентов;

- наиболее значительные эффекты подавления функциональной активности калиевых каналов под действием фунгицидов отмечались в присутствии  $(1,5-3,0) \cdot 10^{-4}$  моль/л ципроконазола,  $(3,5-7,0) \cdot 10^{-5}$  моль/л тебуконазола и  $10^{-5}$  -  $1,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л пропиконазола. Сим-триазины в концентрациях  $(8,4-9,9) \cdot 10^{-5}$  моль/л ингибируют функциональную активность  $K^+$ -каналов, причем наиболее выраженным действием, особенно в отношении внутрь выпрямляющих каналов, обладают атразин и прометрин. Модификация сим-триазинами  $K^+$ -каналов заключается в снижении их селективных свойств, которое проявляется в увеличении относительной проницаемости к одновалентным катионам  $Na^+$ ,  $Li^+$  и  $Cs^+$ . Данный эффект, возможно, обусловлен механическим растяжением стенок канала за счет индуцированного сим-триазином изменения гидрофобного взаимодействия с липидным окружением. Все испытанные инсектициды в концентрациях  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л снижают проводимость наружу выпрямляющих  $K^+$ -каналов; при действии эсфенвалерата также отмечается небольшое снижение, тогда как дельтаметрин и циперметрин практически не влияют на проводимость внутрь выпрямляющих каналов;

- развитие реакции плазмалеммы растительных клеток на присутствие в окружающей среде гербицидов и фунгицидов также обусловлено ростом проводимости неселективной ионной утечки;

- триазолы вызывают подавление функциональной активности светостимулируемой электрогенной  $H^+$ -АТФазной помпы плазмалеммы. Ввиду выраженных липофильных свойств молекул испытанных фунгицидов и гербицидов обнаружено ингибирование, вероятно, осуществляется через изменение липидного микроокружения помпы. Сим-триазины оказывают в зависимости от концентрации и времени экспозиции разнонаправленное воздействие на функционирование фотоиндуцируемой  $H^+$ -АТФазной помпы и системы транспорта ионов  $NH_4^+$ . Наблюдаемые изменения активности  $H^+$ -помпы связаны со взаимодействием гербицидов с активным центром АТФазы на наружной стороне мембраны и изменениями электрического потенциала; ингибирование системы транспорта аммония, наоборот, происходит с цитоплазматической стороны плазмалеммы;

- из гербицидов более выраженным действием на транспортные системы плазмалеммы растительной клетки обладают хлорсодержащие сим-триазины (атразин, симазин) по сравнению с тиометилсодержащими (прометрин), а среди фунгицидов - дихлорсодержащее соединение (пропиконазол). Модификации ион-транспортных свойств плазматической мембраны клетки на действие фунгицидов обусловлены наличием и структурой липофильных заместителей в положении N-1 триазольного кольца, а активность испытанных сим-триазинов связана с наличием в их молекуле алкильных радикалов, причем изопропильные группы обладают большим мембранотропным эффектом по сравнению с этильными.

Из результатов, полученных в радиоизотопных экспериментах отметим следующие:

- накопление стронция в цитоплазме завершается после 5-6 часов выдерживания клеток *Nitella* и корней проростков в радиоактивном растворе;

- в контрольных условиях рост равновесного как калиевого потенциала (переход от полной среды Кнопа к среде Кнопа без калия), так и потенциала двухвалентных катионов (переход от раствора Кнопа к среде Кнопа без кальция и магния) повышает накопление катионов;

- ингибиторный анализ с верапамилом и нифедипином показал, что блокирование кальциевых каналов, т.е. переход проницаемости плазматической мембраны к неселективным каналам, вызывает значительное снижение стационарного уровня накопления стронция. При блокировании неселективных каналов накопление Sr либо не снижается (клетки корней проростков), либо возрастает (клетки *Nitella*).

Следовательно, изменение проницаемости мембраны, обусловленное функционированием того или иного механизма транспорта, влияет на накопление ионов в клетке. Полученные результаты, с одной стороны, указывают на высокую разрешающую способность используемых подходов для оценки рецепторных эффектов, приводящих к сдвигам барьерно-транспортных свойств плазматической мембраны под действием экзогенных стимулов, а, с другой, подчеркивают определенную общность механизмов поступления ионов в клетки различных тканей и органов.

Исследования в области биотехнологии, проводимые на кафедре, направленные на изучение индуцированных полисахаридами изменения ионного транспорта и физиолого-биохимических свойств иммобилизованных растительных клеток позволили установить следующие закономерности:

- показано, что включение клеток в Са-альгинатный гель повышает их жизнеспособность по сравнению с иммобилизованными в агаре и свободными клетками при хранении в различных условиях освещенности и температуры;

- альгинатные гели активируют транспорт нитратов и снижают входящие потоки калия по сравнению с суспендированными клетками;

- мембранотропные эффекты отрицательно заряженных полисахаридов обусловлены взаимодействием с липидным бислоем и выражается в увеличении неселективной ионной проводимости плазматической мембраны;

- в процессе хранения отмечается изменение соотношения хлорофилла а и хлорофилла в. В наибольшей степени стабилизирующее влияние полисахаридных гелей сказывается на содержании хлорофилла а в клетках;

- иммобилизация растительных клеток в полисахаридных гелях (особенно в агаре) оказывает стабилизирующее действие на состояние фотосинтетических пигментов. За 60 суток хранения клеток в темноте при температуре 5°C суммарное содержание хлорофиллов снизилось лишь на 5 %;

- установлено, что иммобилизованные в кальций-альгинатных гранулах клетки суспензионной культуры *Syringa vulgaris* характеризуются более высоким уровнем синтеза и экскреции фенольных соединений по сравнению со свободными клетками культуры.

**В настоящее время научная деятельность кафедры охватывает широкий спектр разделов биологии, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение:**

### **1. Клеточная биология и биофизика растений и животных:**

1.1 Исследование структуры и функции мембранных транспортеров, ионных каналов и рецепторов клеток растений и животных, систем сигнальной трансдукции, вторичных посредников, цитоскелета, клеточной стенки, запрограммированной клеточной гибели, автофагии и других систем растительной клетки. Развитие электрофизиологических методик, таких как пэтч-кламп, люминометрия, спектрофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия, метод меченных атомов, количественный ПЦР-анализ. Развитие метода гетерологичной экспрессии генов ионных каналов растений в клетках человека (HEK 293) с их дальнейшим анализом при помощи техники пэтч-кламп. Развитие метода COMET для детекции повреждения ДНК у растений и животных.

1.2 Изучение роли активных форм кислорода (АФК) в жизнедеятельности растительной клетки. Исследование механизмов окислительного стресса при помощи спектроскопии электронного парамагнитного резонанса. Анализ функций экзогенной L-аскорбиновой кислоты и антиоксидантной системы клетки.

1.3 Установление механизмов перестройки фотосинтетического аппарата высших растений при тепловом стрессе, атаке патогенов и других воздействиях с использованием техники РАМ-флуориметрии (triple PAM).

1.4 Установление механизмов ответа растительной клетки на стрессовые воздействия различной природы, в частности, тяжелых металлов, засоления, экстремальных температур и засухи.

### **2. Системная биология и биоинформатика растений:**

2.1 Создание платформ высокопроизводительного фенотипирования высших растений и водорослей. Разработка нейронных сетей для распознавания видов и сортов растений, а также их физиологического состояния и поражения патогенами. Разработка нейронных сетей для анализа морфологии клеток культур микроводорослей и поврежденных ядер растительных клеток (электрофорез одиночных ядер).

2.2 Математическое моделирование биологических систем, анализ изображений растений.

### **3. Биотехнология и биоинженерия растений:**

3.1 Создание инновационных биотехнологий с использованием широкого спектра покрытосеменных растений, мхов и водорослей. Получение высокопроизводительных культур клеток, тканей и органов растений. Установление физиолого-биохимических механизмов, контролирующих процессы набора биомассы и биосинтеза биологически-активных веществ в культурах *in vitro*.

3.2 Развитие биоинженерных подходов: микрклональное размножение растений, цифровое фенотипирование растений, создание компьютерных программ обработки феномной информации на основе систем машинного обучения, использование техники иммобилизации клеток, разработка инновационных продуктов для укоренения и дезинфекции древесных растений, корневой и черенковый прайминг, зеленый нанобиосинтез, использование наночастиц для стимуляции и контроля метаболических и ростовых процессов в культурах *in vitro*.

### **4. Разработка новых методических подходов:**

Разработка и усовершенствование электронных учебно-методических комплексов для преподавания дисциплин, связанных с клеточной и системной биологией растений, биоинженерией, биоинформатикой и физикой.

---

© 2003-2025 Л. Валентович, П. Тумилович

**Наш адрес:** г. Минск, ул. Курчатова, 10, тел/факс. +375 (17) 209-58-08

**Адрес для корреспонденции:** пр. Независимости, 4, БГУ, Биологический факультет, 220030, г. Минск

<http://www.bio.bsu.by>