



УДК 581.17:581.1.04

Влияние ряда дикарбоновых кислот в сверхмалых концентрациях на барьерную функцию мембраны изолированной вакуоли

А. Л. Верещагин¹, В. Н. Нурминский^{2,3}, В. В. Еремина¹, Ю. И. Захарьева¹,
Н. В. Озолина², Р. К. Саляев²

¹ Бийский технологический институт (филиал)

Алтайского государственного технического университета им. И. И. Ползунова, Бийск

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

³ Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет, Иркутск
E-mail: val@bti.secna.ru

Аннотация. Исследовано влияние органических кислот – интермедиатов цикла Кребса (лимонной, α -кетоглутаровой, янтарной, яблочной, щавелевой кислот) в концентрациях от 10^{-9} до 10^{-11} М на барьерную функцию мембраны изолированной вакуоли. Для проведения сравнительного анализа были использованы два показателя: относительный период полураспада изолированных вакуолей и константа скорости распада вакуолей. Обнаружено выраженное стабилизирующее влияние янтарной кислоты в нано- и фемтомолярных концентрациях на мембраны, а щавелевая кислота, наоборот, повышала скорость распада изолированных вакуолей. Действие смесей кислот неоднозначно и зависит от концентрации. Высказаны предположения о факторах, определяющих стабильность изолированных вакуолей. При действии органических кислот в качестве мембранотропных соединений в сверхмалых концентрациях могут реализовываться, по-видимому, различные механизмы, однако доминирующий связан с их антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: сверхмалые концентрации, интермедиаты цикла Кребса, изолированные вакуоли, барьерная функция мембраны.

Введение

В последние годы благодаря работам Е. Б. Бурлаковой с сотрудниками [1; 10] стали активно исследоваться физиологические эффекты различных соединений в сверхмалых дозах и концентрациях (СМК). Проведённые авторами исследования выявили, что биологически активными оказались нано- и фемтоконцентрации ряда органических кислот [2] – щавелевой, малоновой, лимонной, яблочной, янтарной, этилендиаминтетрауксусной (ЭДТА). Все они, за исключением ЭДТА, являются субстратами цикла Кребса – ключевого этапа дыхания всех клеток, использующих кислород. Органическим кислотам, участвующим в цикле Кребса, уделяется большое внимание при изучении различных физиолого-биохимических процессов растительной клетки. Известно, что органические кислоты, введённые экзогенно, легко проникают внутрь клеток и, попадая в митохондрии, используются так же быстро, как и их эндогенные формы [3]. Применение этих веществ при внекорневой обработке (обработке листовой поверхности) позволило повысить продуктивность редиса в два раза [10]. Ультразвуковое облучение черенков некоторых сор-

тов винограда в растворе янтарной кислоты с концентрацией 10^{-11} М позволило значительно ускорить появление корней (ризогенез) [4]. Принимая во внимание их химическую природу (ди- и трикарбоновые кислоты), было высказано предположение, что эти кислоты в водных растворах при концентрации 10^{-7} М и менее в соответствии с законом разбавления Освальда должны полностью диссоциировать [5]. Таким образом, растворы исследуемых веществ в СМК, возможно, содержат дианионы дикарбоновых кислот, отсутствующие в растворах с обычными концентрациями. Учитывая отмеченное выше, нельзя исключить влияние карбоновых кислот на биологические мембраны. При изменении барьерной функции мембран может происходить нарушение метаболизма и гибель клеток или, напротив, их стабилизация и поддержание высокой функциональной активности. Поэтому особый интерес представляет исследование барьерной функции мембран при оценке мембранотропной активности химических соединений. Было показано, что вещества по мембранотропной активности в зависимости от характера действия и концентрации можно разделить на три группы: спо-

собствующие разрушению мембраны; не оказывающие заметного влияния на барьерную функцию мембраны; стабилизирующие её [7]. В связи этим целью данной работы явилось изучение воздействия дикарбоновых кислот в СМК, когда они представлены дианионами, на барьерные свойства биологических мембран.

Материалы и методы

Действие мембранотропных соединений оценивали по изменению динамики разрушения изолированных вакуолей по сравнению с контролем [7] методом цейтраферной компьютерной видеосъёмки микроскопических объектов, отражающей процесс дестабилизации изолированных вакуолей. Полученная серия изображений обрабатывалась с помощью программы CellsPro v. 1.0, функционирующей в среде Matlab [9]. По результатам обработки составлялись таблицы и строились графики во

времени зависимости площади, занимаемой неразрушенными вакуолями (оцениваемой в процентах). Затем на основании того, что количество сохранившихся вакуолей коррелирует с занимаемой ими площадью, выполнялась оценка длительности периода полураспада изолированных вакуолей ($\tau_{1/2}$).

Изолированные вакуоли получали по методу [8] из клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) в растворе выделения и инкубации, содержащем (мМ): 400 КСl, 10 ЭДТА, 25 Na₂PO₄, рН 8,0, β-аланин (1000 мОсм·кг⁻¹ H₂O), переносили в микрокамеры и помещали в коллектор. В экспериментах использовали водные растворы дикарбоновых кислот, интермедиатов цикла Кребса (янтарной и щавелевой), а также смеси, проявившие высокую ростостимулирующую активность (табл. 1).

Таблица 1

Состав смесей органических кислот, используемых в экспериментах

Раствор	Соотношение кислот, моль				
	Лимонная кислота	α-кето-глутаровая кислота	Янтарная кислота	Яблочная кислота	Щавелевая кислота
№ 1	1	1	1	1	1
№ 2	1	2	3	4	5

Во всех испытаниях в качестве контроля использовался раствор выделения и инкубации.

Параллельно проводили три аналогичных опыта с 3–4-кратной повторностью измерений для каждого варианта. Достоверность различий параметров (относительный период полураспада ($T_{1/2, \text{отн.}}$) и константа скорости распада вакуолей ($\tau_{1/2}$)) оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в

табличном процессоре Excel из пакета MS Office 2007.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования влияния экспериментальных растворов на барьерные свойства тонопласта представлены на рисунке.

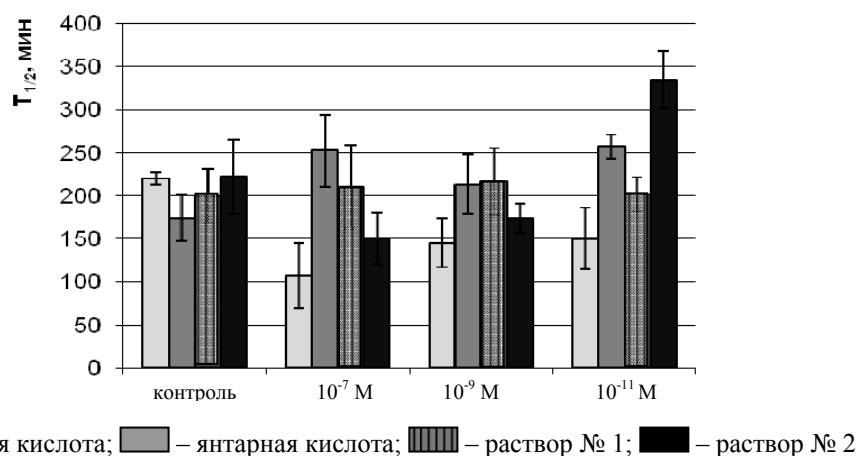


Рис. Влияние растворов дикарбоновых кислот и их смесей разной концентрации на длительность периода полураспада изолированных вакуолей. На графиках обозначено стандартное отклонение

Как видно из рисунка, с разведением в изученном диапазоне концентраций дианионы щавелевой кислоты достоверно ($p < 0,05$) повышают скорость распада изолированных вакуолей (длительность относительного периода полураспада $T_{1/2, \text{отн.}}$ изменяется в пределах от 0,49 до 0,68).

Вместе с тем представленные данные достоверно показывают выраженную стабилизирующую функцию растворов янтарной кислоты в нано- и фемтоконцентрациях ($T_{1/2, \text{отн.}}$ изменяется в диапазоне значений от 1,31 до 1,68).

Действие смесей кислот различно. Так, раствор № 1 можно охарактеризовать как не оказывающий достоверного влияния на скорость

распада мембран ($T_{1/2, \text{отн.}}$ находится в диапазоне от 1,01 до 1,08). В то же время раствор № 2 при концентрациях 10^{-7} и 10^{-9} М оказывает дестабилизирующее действие, а при концентрации 10^{-11} М – стабилизирующий эффект ($T_{1/2, \text{отн.}} = 1,75$) при уровне достоверности 0,95.

Для проведения сравнительного анализа были использованы два показателя – относительный период полураспада изолированных вакуолей ($T_{1/2, \text{отн.}}$ – отношение опытного значения $T_{1/2}$ к контрольному) и константа скорости распада вакуолей, рассчитанная в предположении реакции первого порядка по уравнению $\tau_{1/2} = \ln 2/k_1$ (табл. 2).

Таблица 2

Параметры процесса распада изолированных вакуолей под воздействием сверхмалых концентраций ряда органических кислот и их смесей

Реагент	Концентрация, М	$k_1, \text{мин}^{-1}$	$T_{1/2, \text{отн.}}$
Щавелевая кислота	10^{-7}	$6,4 \cdot 10^{-3}$	0,49
	10^{-9}	$4,7 \cdot 10^{-3}$	0,66
	10^{-11}	$4,6 \cdot 10^{-3}$	0,68
Янтарная кислота	10^{-7}	$2,4 \cdot 10^{-3}$	1,31
	10^{-9}	$2,3 \cdot 10^{-3}$	1,37
	10^{-11}	$1,9 \cdot 10^{-3}$	1,68
Смесь кислот № 1	10^{-7}	$3,2 \cdot 10^{-3}$	1,05
	10^{-9}	$3,2 \cdot 10^{-3}$	1,08
	10^{-11}	$3,4 \cdot 10^{-3}$	1,01
Смесь кислот № 2	10^{-7}	$4,6 \cdot 10^{-3}$	0,68
	10^{-9}	$3,9 \cdot 10^{-3}$	0,81
	10^{-11}	$1,7 \cdot 10^{-3}$	1,75

Из представленных данных следует, что реакция распада вакуолей в растворах органических кислот в изученном диапазоне концентраций подчиняется условиям уравнения первого порядка. Вместе с тем возникает вопрос о механизме стабилизации вакуолей интермедиатами цикла Кребса в нано- и фемтоконцентрациях.

Возможно, в механизме действия изучаемых соединений доминирующей является антиоксидантная активность. В табл. 3 проведено сопоставление антиоксидантной активности изучаемых соединений с полученными ранее данными по влиянию мощного антиоксиданта флавоноидной природы дигидрокверцетина [6].

Таблица 3

Сравнительная антиоксидантная активность ряда препаратов

Реагент	Реакция окисления	Относительная антиоксидантная ёмкость, моль О/моль образца, нормированная по щавелевой кислоте	Относительное время полупревращения, ед., нормированное по щавелевой кислоте
Щавелевая кислота	$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{O} = \text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2$	1	1
Янтарная кислота	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4 + 7\text{O} = 3\text{H}_2\text{O} + 4\text{CO}_2$	3,5	2,5
Дигидрокверцетин	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7 + 29\text{O} = 6\text{H}_2\text{O} + 15\text{CO}_2$	14,5	11,0

На основании рассмотренных данных можно предположить, что антиоксидантная активность изученных препаратов в диапазоне концентраций 10^{-7} – 10^{-9} М коррелирует с периодом полураспада вакуолей. Вместе с тем следует отметить, что состав смеси кислот № 2 при концентрации 10^{-11} М достоверно повышает стабильность вакуолей. Можно предположить, что это связано не с антиоксидантной активностью веществ, а с другим механизмом стабилизации, исследование которого требует дальнейших исследований.

Таким образом, обнаружено, что при действии органических кислот как мембранотропных соединений в зависимости от концентрации могут реализовываться различные механизмы стабилизации вакуолей.

Литература

1. Бурлакова Е. Б. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов / Е. Б. Бурлакова, А. А. Конрадов, Е. Л. Мальцева // Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты; ред. А. Б. Рубин. – М. ; Ижевск : НИЦ «Регуляр. и хаот. динамика», Ин-т компьютер. исслед., 2007. – С. 390–423.

2. Верещагин А. Л. Влияние сверхмалых доз интермедиатов цикла Кребса на рост и развитие ряда двудольных растений / А. Л. Верещагин, В. В. Кропоткина. – Бийск : Изд-во АлтГТУ, 2010. – 94 с.

3. Верхотурова Г. С. Работа цикла Кребса на свету и некоторые механизмы его регуляции / Г. С. Верхотурова, Л. И. Астафурова, Л. И. Кудинова // Вопр. взаимосвязи фотосинтеза и дыхания /

под ред. В. Л. Вознесенского. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 1988. – С. 19–29.

4. Верещагин А. Л. Влияние ультразвукового облучения и регуляторов роста на ризогенную активность растительных объектов / А. Л. Верещагин, А. Н. Хмелева. – Бийск : Изд-во АлтГТУ, 2010. – 73 с.

5. Верещагин А. Л. О механизме ростостимулирующего действия сверхмалых доз природных органических кислот / А. Л. Верещагин, В. В. Кропоткина, А. Н. Хмелева // Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та. – 2010. – Т. 62, № 1. – С. 46–48.

6. Влияние дигидрохверцетина на системы активного и пассивного транспорта ионов вакуолярной мембраны растений / В. Н. Нурминский [и др.] // Изв. РАН. Сер. биол. – 2009. – № 1. – С. 5–10.

7. Влияние мембранотропных соединений на барьерную функцию мембраны изолированной вакуоли / В. Н. Нурминский [и др.] // ДАН. – 2003. – Т. 389, № 2. – С. 283–285.

8. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений / Р. К. Салаяев [и др.] // Физиология растений. – 1981. – Т. 28, № 6. – С. 1295–1305.

9. Технология оценивания состава изображений клеточных препаратов для медико-биологических исследований / М. С. Тарков [и др.] // Материалы Всерос. конф. «Математическое моделирование и вычислительно-информационные технологии в междисциплинарных научных исследованиях» (15–17 июня 2011 г.). – Иркутск, 2011. – С. 109.

10. Maltseva E. L. Natural (α -tocopherol) and synthetic (phenosan potassium salt) antioxidants regulate the protein kinase c activity in a broad concentration range (10^{-4} – 10^{-20} M) / E. L. Maltseva, N. P. Palmina, E. B. Burlakova // Membrane and Cell Biology. – 1998. – Vol. 12, N 2. – P. 251–268.

Influence of a number of dicarbonic acids in super-small concentrations upon the barrier function of isolated vacuole membranes

A. L. Vereshagin¹, V. N. Nurminsky^{2,3}, V. V. Eremina¹, Yu. I. Zakharieva¹,
N. V. Ozolina², R. K. Salyaev²

¹*Biysk Technological Institute, branch of I. I. Polzunov's Altay State Technical University, Biysk*

²*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

³*National Research Irkutsk State Technical University, Irkutsk*

Abstract. Influence of organic acids, Krebs cycle intermediates (citric, α -keto-glutar, succinic, malic, oxalic acids), in concentrations of 10^{-9} to 10^{-11} M upon the isolated vacuole membrane barrier function. For the purpose of comparative analysis we used the two indicators: the relative period of isolated vacuole half-life and the constant of vacuole cytolysis rate. An expressed stabilizing influence of succinic acid upon membranes (in nano- and pemptomolar concentrations) has been revealed, while oxalic acid, vice versa, increased the rate of isolated vacuole cytolysis. The effect of acid mixtures was ambiguous. It was dependent on the concentration. The following assumption on the factors, which determine stability of isolated vacuoles, was made: it is possible that under the effect of organic acids in the capacity of membranotropic compounds represented in super-small concentrations various mechanisms may probably be realized, while the dominant mechanism is bound up with the antioxidant activity of these compounds.

Key words: super-small concentrations, Krebs cycle intermediates, isolated vacuoles, membrane barrier function.

Верещагин Александр Леонидович
Бийский технологический институт (филиал)
Алтайского государственного технического
университета им. И. И. Ползунова
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27,
доктор химических наук, профессор
тел. (3854) 43-53-18
E-mail: val@bti.secna.ru

Нурминский Вадим Николаевич
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
тел. (3952) 42-58-78
E-mail: cell@sifibr.irk.ru

Еремина Валерия Валерьевна
Бийский технологический институт (филиал)
Алтайского государственного технического
университета им. И. И. Ползунова
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27,
кандидат биологических наук, доцент
тел. (3854) 43-53-18
E-mail: kvava@mail.ru

Захарьева Юлия Ивановна
Бийский технологический институт (филиал)
Алтайского государственного технического
университета им. И. И. Ползунова
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27
аспирант
тел. (3854) 43-53-18
E-mail: yuliya414@yandex.ru

Озолина Наталья Владимировна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией
тел. (3952) 42-58-78
E-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Салаяев Рюрик Константинович
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
чл.-корр. РАН, советник РАН
тел. (3952) 42-58-78
E-mail: salyaev@sifibr.irk.ru

Vereshagin Aleksandr Leonidovich
Biysk Technological Institute,
branch of Altay State Technical University

27 Trofimov St., Byisk, 659305
D. Sc. of Chemistry, Prof.
phone: (3854) 43-53-18
E-mail: val@bti.secna.ru

Nurminsky Vadim Nikolaevich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph. D. in Biology, research scientist

phone: (3952) 42-58-78
E-mail: cell@sifibr.irk.ru

Eremina Valeria Valeryevna
Biysk Technological Institute,
branch of Altay State Technical University

27 Trofimov St., Byisk, 659305
Ph. D. in Biology, ass. prof.
phone: (3854) 43-53-18
E-mail: kvava@mail.ru

Zakharieva Yulia Ivanovna
Biysk Technological Institute,
branch of Altay State Technical University

27 Trofimov St., Byisk, 659305
doctoral student
phone: (3854) 43-53-18
E-mail: yuliya414@yandex.ru

Ozolina Natalia Vladimirovna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033

D. Sc. of Biology, Head of laboratory
phone: (3952) 42-58-78
E-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Salyaev Rurik Konstantinovich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Corresponding member of RAS, RAS Advisor
phone: (3952) 42-58-78
E-mail: salyaev@sifibr.irk.ru