

На правах рукописи



**Суслов Максим Алексеевич**

**РЕАКЦИЯ ЭНДОМЕМБРАННОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТОК И ПРОЦЕССА  
МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВОДООБМЕНА В РАСТЕНИЯХ НА ДАВЛЕНИЕ**

03.01.02 — биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2014

Работа выполнена в лаборатории биофизики транспортных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН).

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,  
профессор, заведующий лабораторией  
биофизики транспортных процессов КИББ  
КазНЦ РАН, г. Казань,  
Анисимов Александр Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, заведующий  
кафедрой биофизики Нижегородского  
государственного университета им.  
Лобачевского, г. Нижний Новгород,  
Воденев Владимир Анатольевич

доктор физико-математических наук,  
заведующий отделом ЯМР института проблем  
химической физики РАН, г. Черноголовка,  
Волков Виталий Иванович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки институт биологии  
Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Защита состоится 23 декабря 2014 года в 14<sup>30</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 002.005.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук при КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, а/я № 30, тел/факс (843)2927347, dissovet@mail.knc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке и на официальном сайте КИББ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>.

Автореферат разослан «        » ноября 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Пономарёва Анастасия Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Постановка проблемы и её актуальность.** Несмотря на очевидную фундаментальную и прикладную актуальность исследований механизмов транспорта воды в растении, до настоящего времени нет устойчивых представлений о комплексе движущих сил переноса водных растворов, их регуляции, взаимосвязей при сезонных переключениях. Гидродинамическая регуляторная система растений работает в широком диапазоне влажности и температур внешней среды, что реализуется через систему параллельно функционирующих, переключающихся путей и движущих сил переноса, механизм обратных связей. Очевидно, что в генерации движущей силы переноса воды выступает фактор давления в разных его проявлениях (тургорное, осмотическое, капиллярное, корневое, транспирационное). Его значения для большинства растений простираются до 5 МПа (в замыкающих клетках устьиц), для галофитов до 15 МПа, давление натяжения водных нитей в стволах деревьев достигает -12 МПа (Holbrook, Zwieniecki, 2008). Изменение давления в клеточных компартментах, лежит в основе регуляции множества физиологических процессов: устьичных движений (Ache *et al.*, 2010), роста (Abe, Horikoshi, 1995), настий (Вайнар, 1987). Наконец, так называемая «гидравлическая гипотеза» предполагает, что в биологических объектах гидродинамическое давление может быть переносчиком сигнальной информации (Dzubinska, 2003). Имеющаяся в литературе информация по влиянию давления на биологические объекты, в основном касается давлений от 100 МПа и выше (Rivalain *et al.*, 2010). Результаты изучения влияния давления физиологического диапазона, по крайней мере до 5 МПа, на механизмы водного переноса на клеточном и субклеточном уровнях, весьма ограничены. Отчасти это связано с методическими трудностями регистрации характеристических параметров непосредственно во время приложения давления. В то же время, с наличием данных о влиянии фактора давления на растения, связано решение ряда вопросов и, в частности, вопроса о явлении колебательного режима корневого давления. Широкий диапазон изменения величины давления, разнообразие его ролей, вызывают постановку вопроса: может ли давление в гидросистеме растения выполнять функции регулятора транспорта воды? Перспективным приемом получения ответа на вопрос представляется анализ реакции гидродинамической системы растения на действие внешнего давления, выступающего в качестве адекватного возмущения, выводящего исследуемую систему из положения равновесия. При этом, надо полагать, что эндомембранная система клеток растения может быть первой мишенью для давления.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы – установить, влияет ли давление физиологического диапазона на эндомембранную систему клеток и межклеточный перенос воды, через составляющие конструктивные элементы гидросистемы растения (мембраны, плазмодесмы, клеточные стенки). Для достижения указанной цели ставились следующие **задачи:**

1. Разработать технику подачи на объект исследования давления разной величины и скорости изменения непосредственно на момент ЯМР измерений и фиксации для электронной микроскопии.
2. Оценить влияние давления на физиологические параметры клеток растений (скорость роста, параметры дыхания и тепловыделения).
3. Охарактеризовать методами световой и электронной микроскопии (ЭМ) структурные изменения в эндомембранной системе клеток под давлением.
4. Исследовать изменения трансклеточного и симпластного переноса воды в клетках наземных (корни *Zea mays L.*, *Triticum aestivum*)) и водных (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella maritima*) растений под действием давления до 4 МПа.

#### **Научная новизна работы.**

Предложена методическая схема и разработана соответствующая аппаратура к экспериментальному обоснованию влияния фактора давления физиологического диапазона на структурную организацию эндомембранной системы клеток и регуляцию транспорта воды в растениях. Впервые показано, что под воздействием внешнего давления от 2 до 4 МПа в клетках растений кукурузы (*Z. mays L.*) наблюдаются существенные изменения структурной организации эндомембранной системы. Для наземных растений, имеющих воздухоносные межклеточные объемы, на примере корней кукурузы (*Z. mays L.*) и пшеницы (*T. aestivum*), впервые установлено, что давление приводит к обратимому увеличению интенсивности межклеточного переноса воды по трансмембранному и симпластному пути. Для водных растений, на примере клеток хлореллы (*C. vulgaris*) и дуналиеллы (*D. maritima*), установлен факт резистентности процессов водного переноса к давлению.

**Научно-практическая значимость.** Результаты работы расширяют список методов исследования процессов массопереноса в гетерогенных системах. Разработана установка для воздействия давлением до 5 МПа на биологические объекты непосредственно во время ЯМР эксперимента, с регулируемой скоростью изменения давления, возможностью разрушения клеток, а также их фиксации для электронной микроскопии непосредственно под давлением. Полученные результаты

углубляют понимание механизмов регуляции транспорта воды в растениях, могут быть в определенной степени распространены на животные объекты и применены при решении медицинских задач выяснения механизмов развития инфарктов, инсультов, разработку протоколов баротерапии, выяснению механизмов влияния давления ускорения и адаптации к гравитации после невесомости. Экспериментальные данные, использованные методические приемы, предложенные модели, могут быть применены в учреждениях биологического, биотехнологического, медицинского, сельскохозяйственного профиля, а также при чтении лекций по биофизике, физиологии растений в ВУЗах.

**На защиту выносятся:**

1. Результаты, свидетельствующие о существенных изменениях структурной организации эндомембранной системы клеток растений под давлением до 4 МПа (на примере корней кукурузы);

2. Результаты, свидетельствующие об обратимом увеличении под давлением интенсивности трансклеточного и симпластного переноса воды в тканях растений, имеющих воздухоносные межклеточные объемы (корни кукурузы и пшеницы в сопоставлении с водными растениями хлореллы и дуналиеллы).

**Связь работы с научными программами.** Работа проводилась с 2009 по 2014 г. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Процессы переноса веществ и превращения метаболитов в функционально-адаптивной активности растительных клеток» (государственный регистрационный № 01200901960). Исследования автора как исполнителя поддержаны грантам РФФИ № 08-04-01258. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на: 13-ой международной школе молодых учёных «Actual problems of magnetic resonance and its application» (Казань, 2009); Российской школе молодых учёных «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010); итоговой научной конференции Казанского научного центра Российской академии наук за 2009, 2010 год (Казань, 2009, 2010); 3-ем международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011); 6-ой международной научной школе «Наука и инновации» (Йошкар-Ола, 2011); IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); всероссийской (с международным участием) научной конференции «Актуальные проблемы экологии и физиологии живых организмов»

(Саранск, 2013); XI всероссийском молодежном научно-практическом конгрессе с международным участием (Иркутск, 2013); 18-ой международной школе-конференции молодых учёных «Биология наука XXI века» (Пушино, 2014); международной научной конференции и школе молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014).

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 20 печатных работ, из которых 4 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

**Личный вклад автора.** Автор лично участвовал в постановке задач исследования и интерпретации данных, разработках оригинальной аппаратуры, подготовке образцов и проведении экспериментов методом ЯМР, подготовке образцов для электронной микроскопии (ЭМ).

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 46 рисунков, 5 таблиц. Список литературы включает 194 источника из них 57 отечественных.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**1.1. Объекты.** В качестве объектов исследования были использованы образцы, различающиеся наличием/отсутствием ключевых элементов гидродинамической системы и объемом газовой фазы. В качестве объектов с развитой сетью плазмодесм и сравнительно высоким объемом газовой фазы (воздухоносным объемом межклетников) служили 4-7-дневные растения кукурузы (*Z. mays L.*, сорта Анюта и Кубань), а также пшеницы (*T. aestivum*, сорта Казанская 560). Объектом, с относительно низким объемом газовой фазы, заведомо не имеющим плазмодесм (ПД), но имеющим клеточную стенку, были клетки водной суспензии водоросли *S. vulgaris*. Объектом, не имеющим клеточной стенки и ПД, были клетки водной суспензии водоросли *D. maritima*. Перед ЯМР экспериментом суспензии центрифугировали в тонкостенном тefлоновом контейнере, осадок в контейнере помещали в ампулу высокого давления. Для анализа влияния давления на ростовые процессы, интактные растения кукурузы в среде выращивания вместе с контейнером помещали в камеру высокого давления и подвергали воздействию давления в 2 МПа или 4 МПа в течение 5 часов. Контрольные образцы помещали в аналогичную камеру

и оставляли при атмосферном давлении. Сразу после воздействия давлением и в последующем через каждые сутки производили измерение длины побега и корня растений. В исследованиях водного переноса методом ЯМР использовали сегменты из всасывающей зоны корня и «рукавички» (сегменты из всасывающей зоны корня с удалённым центральным цилиндром).

**1.2. Техника создания статического давления.** Давление создавали с помощью системы (рис. 1), состоящей из баллонов сжатого воздуха, редуктора давления, дроссельных вставок для регулирования скорости подъема и сброса давления, электроклапанов, объединенных пневмомагистралями либо с объемной камерой давления Шоландера для размещения интактных образцов, либо с ампулой высокого давления для сегментов растений. (Анисимов и др., 2012). Измерения начинали после гарантированного установления в образце термического равновесия (5 мин), которое, как известно, смещается при изменении давления в изохорических условиях.

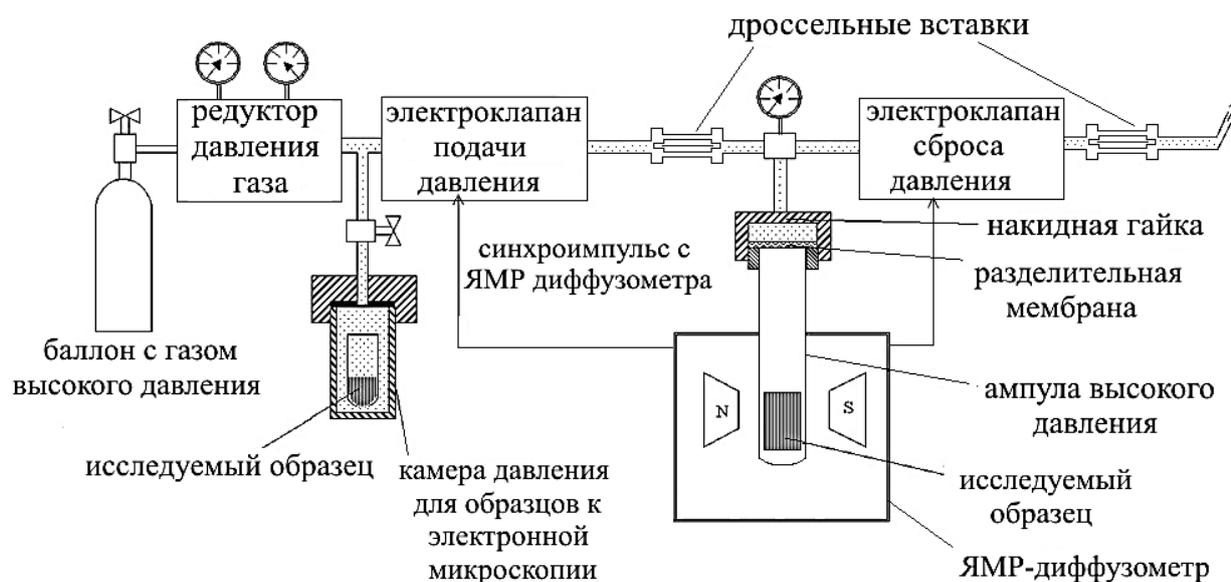


Рис. 1. Схема генератора статического давления, сопряжённого с ЯМР-диффузометром.

**1.3. Методика ЯМР измерений.** Для контроля межклеточного транспорта воды в растениях была использована техника спинового эха с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП) на частоте протонного резонанса 19 МГц (Анисимов, Раткович, 1992). В измерениях использовали трёхимпульсную

последовательность стимулированного эха (Tanner, 1973). Регистрировали относительную амплитуду сигнала спин-эха (фактор R), в зависимости от длительности –  $\delta$  и амплитуды – g импульсов градиента, при изменении интервала  $\Delta$  между ними как параметра. Для количественной оценки диффузионного переноса воды использовали формализм эффективных коэффициентов диффузии (Анисимов и др., 2004). Средний эффективный коэффициент диффузии  $D_{eff}$  определяли по декременту диффузионного затухания (ДЗ) при  $g \rightarrow 0$ , т.е. по наклону начального участка ДЗ экстраполируемого экспонентой (Valiullin, Skirda, 2001):

$$R = \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 t_d D_{eff})$$

где  $\gamma$  – гиромагнитное отношение для протонов,  $\delta$  – длительность импульсов градиента, g – амплитуда импульсов градиента,  $t_d = \Delta - \delta/3$  время диффузии,  $D_{eff}$  – средний эффективный коэффициент диффузии. Увеличение угла наклона ДЗ качественно свидетельствует о росте уровня межклеточного переноса воды. Вычисление проницаемости p клеток образца для воды производили с использованием уравнения Крика (Crick, 1970):

$$\frac{1}{D_{\infty}} = \frac{1}{D_0} + \frac{1}{p \cdot d}$$

где  $D_{\infty}$ ,  $D_0$  - коэффициенты самодиффузии молекул жидкости в пределах бесконечно больших и бесконечно малых времён диффузии соответственно. Характеристический размер ограничений d определяли методом, изложенным в работе (Valiullin, Skirda, 2001). Для выделения из общего межклеточного транспорта воды компоненты переноса по симпласту использовали метод парамагнитного допинга (Анисимов и др., 1983). Парамагнитный допинг использовали также для определения проницаемости плазмалеммы релаксационным методом ЯМР через решение обратной задачи обмена (Балла, 1985). Суть решения обратной задачи заключается в определении истинных (не искажённых обменом) времён релаксации  $T_a$ ,  $T_b$  и населённостей  $P_a$ ,  $P_b$  каждой водной фазы клетки через экспериментально наблюдаемые значения  $T'_a$ ,  $T'_b$ ,  $P'_a$ ,  $P'_b$ , с последующим определением параметров  $\tau_a$ ,  $\tau_b$ , характеризующих обменные процессы. Парамагнитный допинг внедряли во внеклеточное пространство в виде парамагнитного комплекса GdDTPA (соль диэтилентриаминпентауксусной кислоты, 0.025 M). В процедуре внедрения парамагнетика использовали технику вакуумной инфильтрации. Серийный образец для ЯМР исследований приготавливали из 35-40 сегментов корней всасывающей зоны, длиной порядка 15 мм, что позволяло достичь должного усреднения биологической вариации параметров корней. Для сведения к

минимуму разброса данных из-за шумов аппаратуры, во всех измерениях использовали не менее чем десятикратное накопление сигналов намагниченности с 4-х шаговым фазовым циклированием р/ч импульсов (Анисимов и др., 2014).

**1.4. Методы определения тепловыделения и дыхания.\*** Для оценки уровня тепловыделения растений кукурузы в контроле и после действия внешнего гидростатического давления использовали микрокалориметр ампульного типа LKB 2277-201. Измерения проводили по методике, приведённой в работе Алябьева А. Ю. (Алябьев, 1996). Дыхание корней кукурузы определяли с применением аппарата Варбурга по методике, описанной в работе (Семихатова, Чулановская, 1965).

**1.5. Электронная и конфокальная микроскопия.\*\*** Апикальные фрагменты корня кукурузы длиной 7-8 мм фиксировали 12 ч в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2) и постфиксировали 2 ч в 1 %-ном OsO<sub>4</sub> на том же буфере с добавлением сахарозы (34 мг/мл). Образцы дегидратировали в растворах возрастающей концентрации спирта (30-70%) и ацетона (70-100%) с последующим замещением ацетона окисью пропилена (45 мин). Сегменты корня пропитывали эпоксидной смолой Эпон-812 (Германия) и полимеризовали при 37, 45 и 57 °С по 24 ч. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (Швеция), контрастировали раствором уранилацетата (Tander, 1990) и цитратом свинца (Reynolds, 1967). Препараты просматривали в оптическом микроскопе NU-2 (Германия) и в электронном микроскопе JEM-1200 EX (Япония). Фиксация образцов проводилась как непосредственно в камере без сброса давления, так и после сброса давления до уровня атмосферного. Камера давления подсоединялась к газовой системе через спирально свернутую, длинную трубку-пневмопровод, что давало возможность без механических напряжений переворачивать камеру с образцом, находящуюся под давлением. При этом фиксатор глутаровый альдегид заливал исследуемый образец. В качестве определения целостности цитоплазматической мембраны клеток после воздействия давлением использовали краситель Эванс синий (Baker, Mock, 1994).

**1.6. Статистическая обработка.** Все опыты проводили не менее чем в 3-х биологических повторностях при температуре 23 °С. Для статистической обработки данных использовали программу Origin 8.5. На рисунках данные приведены в виде среднеарифметических значений и их стандартных отклонений.

---

\* Опыты выполнены совместно с сотрудниками лаб. Алябьевым А.Ю., Андреевой И.Н., Огородниковой Т.И.

\*\* Опыты выполнены совместно с с.н.с. лаб. продукц. проц. растений КИББ КазНЦ РАН Абдрахимовым Ф.А.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**2.1. Влияние внешнего гидростатического давления на рост растений кукурузы.** Воздействие на растения кукурузы внешним давлением в 2 МПа в течение 5 часов не вызывало достоверных изменений в скорости роста, в то время как действие давления в 4 МПа, в течение такого же времени экспозиции, приводило к торможению роста как наземной так и подземной частей растений. Скорость роста корней после воздействия снижалась с 2.6 см/сут до 0.4 см/сут и полностью восстанавливалась на следующие сутки после снятия давления (рис. 2). У клеток эукариот прекращение деления наблюдается при давлениях на порядок выше, чем те, что использованы нами (Iwahashi *et al.*, 2005), поэтому, причиной торможения роста корней, по всей вероятности, является ингибирование роста растяжением.

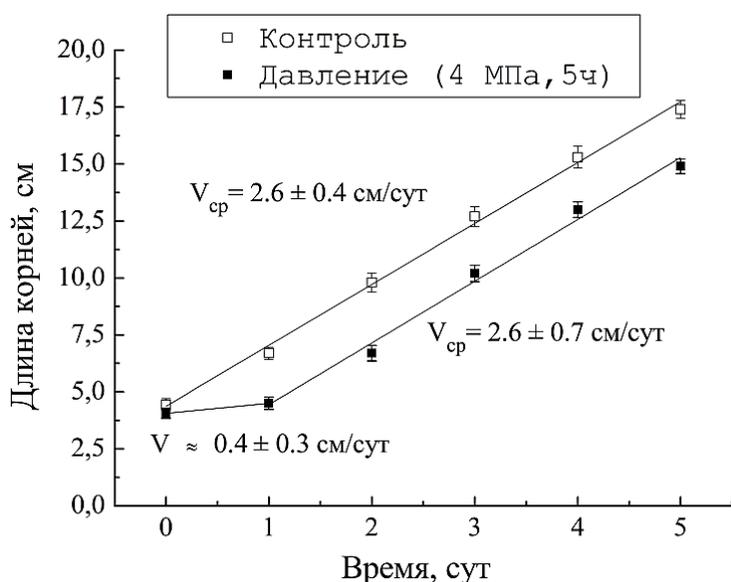


Рис. 2. Скорость роста корней кукурузы в контроле и после воздействия давлением 4 МПа в течение 5 часов.

**2.2. Влияние давления на структурную организацию эндоплазматической системы клеток корней кукурузы.** Изменение ультраструктуры клеток выявляется и при воздействии давления меньшей величины, чем останавливающей рост. В условиях внешнего давления 2 МПа (30 мин) регистрировали кластеризацию элементов эндоплазматической сети (ЭС) (рис. 3, а), и диктиосом аппарата Гольджи (рис. 3, б). На периферии диктиосом наблюдали скопление транспортных везикул, содержащих электронно-плотное вещество (рис. 3, б, стрелки). Редукцию электронной плотности мембраны тонопласта наблюдали наряду с уменьшением в вакуолях количества осмиофильных включений (данные приведены в диссертации). Удвоение величины давления индуцировало возникновение альтераций в тонопласте (рис. 3, в, стрелки). На электроннограммах они выявлялись как области перфораций,

что указывало на нарушение целостности мембраны центральной вакуоли. Резкое снижение гидростатического давления до атмосферного приводило к увеличению деструкций тонопласта. Ни в одном из изучаемых вариантов, не выявлялось нарушение целостности плазмалеммы, что подтверждалось окраской индикатором целостности пограничной мембраны Эвансом синим и методом ЯМР по характерной для целых клеток скорости диффузионного затухания.

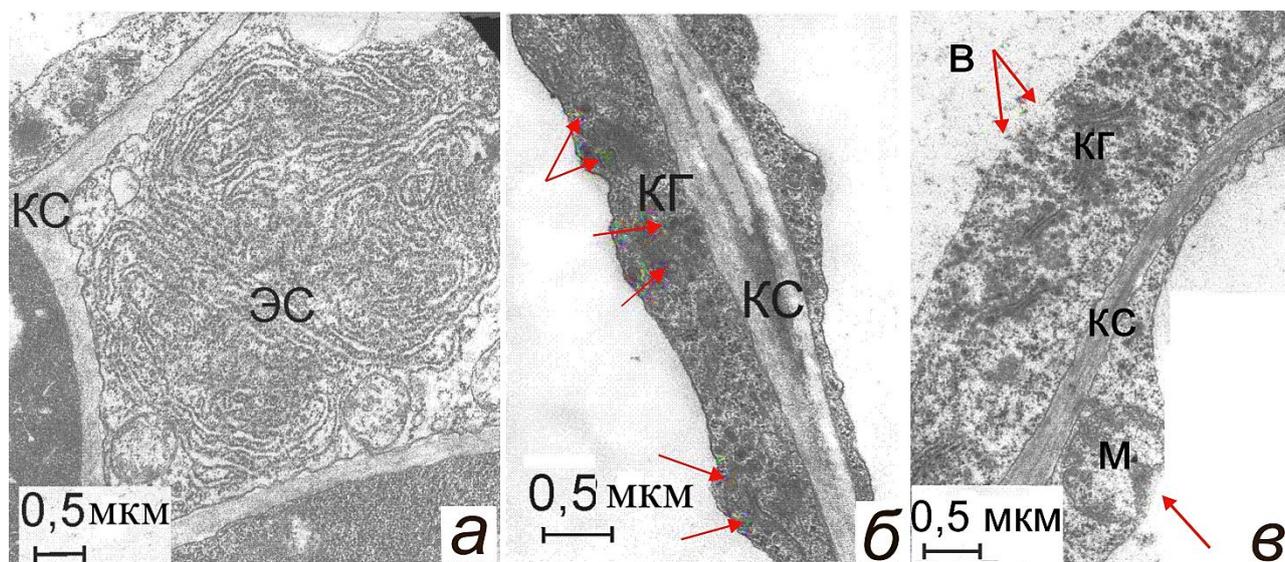


Рис. 3. Ультраструктура клеток коры корней кукурузы из зоны растяжения, зафиксированных при внешнем давлении: *а, б* – 2 МПа (30 мин), стрелки указывают на скопления транспортных везикул; *в* – 4 МПа (30 мин), стрелки указывают на альтерации в тонопласте. *В* - вакуоль, *КС* – клеточная стенка, *М* – митохондрия, *КГ* – комплекс Гольджи, *ЭС* – эндоплазматическая сеть, *Я* – ядро.

По мнению Ю.В. Гамалея, ЭС, как замкнутая система, должна иметь максимальную чувствительность к изменениям внешнего давления (Гамалей, 2004), что и наблюдается в данной работе. Под воздействием давления ЭС формировала агрегаты, часто с хаотично расположенными цистернами (рис. 3, а). Известно, что ЭС как органелла, отвечает за ряд важных физиологических процессов, включая синтез, фолдинг и посттрансляционную модификацию большинства мембранных и секреторных белков (Samali *et al.*, 2010). В 2012 г. в работе (Varadarajan *et al.*, 2012) описан процесс быстрой и обратимой реорганизации ЭС, предшествующий формированию стрессовых реакций в клетках и представляющий собой ремоделирование системы мембран сети (ER membrane remodeling (EMR)). Этот

процесс характеризуется кластеризацией ЭС в большие агрегаты с плотно расположенными каналами, которые по своей морфологии напоминают агрегаты цистерн ЭС, выявленные в нашей работе. Факт кластеризации цистерн ЭС, диктиосом аппарата Гольджи и транспортных везикул, также может указывать на чувствительность к изменениям давления актино-миозинового комплекса, играющего основную роль в организации и динамике элементов эндомембранной системы и трафике транспортных везикул (Sparkes, 2011). В целом, наблюдаемые морфологические изменения клеток корня, прекращение его роста и обратимость функциональных характеристик при декомпрессии скорее соответствуют реакции ЭС, описанной в работе (Varadarajan *et al.*, 2012), чем «классической» реакции ЭС (Fulda *et al.*, 2010). Данные по ингибированию скорости роста растений кукурузы и данные об альтерациях в эндомембранной системе клеток, сопровождаются заметным изменением (уменьшением) под давлением интегральных параметров метаболизма - уровня тепловыделения (данные приведены в диссертации) и дыхания растений кукурузы (рис. 4). Уровень дыхания клеток корней кукурузы, подвергнутых воздействию давления (4 МПа × 60 мин), был достоверно ниже по сравнению с контролем (рис. 4, б).

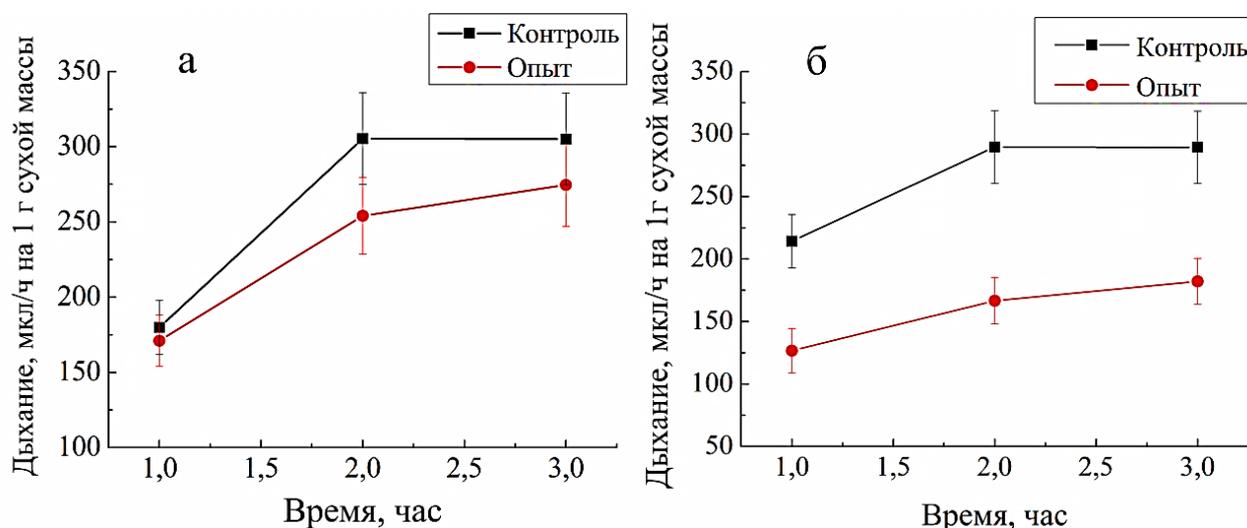


Рис. 4. Уровень дыхания клеток корней кукурузы в контроле и после воздействия давлением 4 МПа (опыт) в течение 15 мин (а) и в течение 60 минут (б).

Таким образом, увеличение гидростатического давления до областей верхней границы физиологических давлений (2-4 МПа) приводит к существенным изменениям в эндомембранной системе, проявляющимся в альтерации органелл, участвующих в мембранном трафике, нарушении целостности тонопласта (при 4 МПа). Наряду с перечисленными изменениями в ультраструктуре, под воздействием давления

происходит снижение физиологических параметров клеток растений, таких как дыхание и тепловыделение, что говорит о замедлении клеточного метаболизма и, по всей вероятности, является причиной ингибирования роста клеток.

### **2.3. Влияние внешнего давления на водный перенос в растениях. Фактор газового компонента.**

**2.3.1. Сравнительный анализ особенностей влияния внешнего давления до 4 МПа на магнитную релаксацию воды клеток корня кукурузы и суспензии клеток хлореллы.** В исследовании транспорта воды под внешним давлением, необходимо учитывать наличие в объектах газового компонента. В тканях наземных растений газовая фаза представлена воздухом межклетников и эндогенными газами. Судя по доступной литературе, связь газовой компоненты растительных тканей с межклеточным водным переносом практически не анализируется, по-видимому, вследствие малой объёмной доли газовой компоненты в клетках растений и сравнительно постоянным давлением внешней среды в зоне обитания того или иного вида растения. Другое дело, когда давление внешней среды может значительно изменяться. В этом случае следует учитывать добавочное растворение в воде газов воздуха (закон Генри), и изменение температуры газовой фазы согласно закону Шарля. Можно полагать, что реакция на давление образца с относительно значимой газовой компонентой (корни), будет отличаться от реакции водных объектов (суспензия клеток хлореллы), которые априори не имеют воздухоносных межклетников. На рис. 5а приведена зависимость времени спин-спиновой релаксации  $T_2$  вакуолярной воды клеток корня кукурузы от величины приложенного давления. При увеличении давления наблюдается укорочение времени релаксации  $T_2$ , с восстановлением к начальному уровню после снятия давления. В клетках хлореллы давление не приводит к заметному укорочению времен релаксации (рис. 5, б). Ускорение релаксации внеклеточной суспензионной среды парамагнитным допингом не повлияло на чувствительность образца к давлению (рис. 5, б). Учитывая наличие заметной газовой составляющей в корне, прежде всего, в виде воздуха межклетников и существенно меньший объем таковой в суспензии водных растительных клеток, наиболее вероятные причины различий в релаксационном поведении, по-видимому, следует искать в эффекте дополнительного растворения в воде газов воздуха, и прежде всего кислорода, являющегося парамагнетиком. Действительно, эксперимент на образце, прошедшем вакуумную инфльтрацию продемонстрировал резкое снижение эффекта укорочения времён релаксации под давлением, что подтверждает

связь укорочения времени релаксации с парамагнитным влиянием кислорода – кислородным допингом.

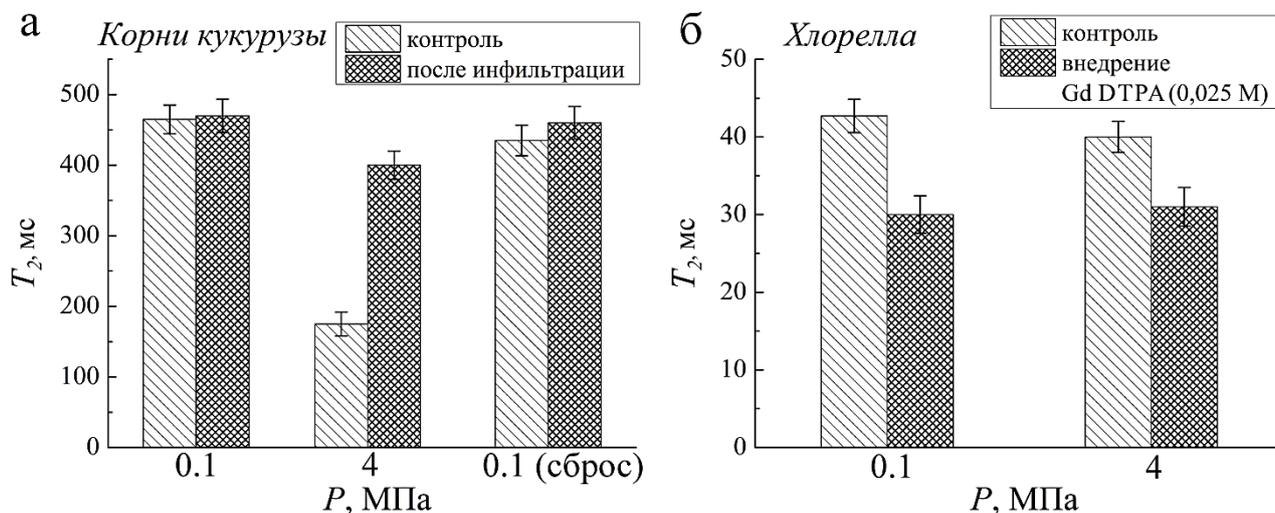


Рис. 5. Зависимость времени спин-спиновой релаксации ( $T_2$ ) для протонов вакуолярной воды от величины внешнего давления: *а* – сегменты корней кукурузы из зоны всасывания в контроле и после вакуумной инфильтрации во фтористом масле; *б* – суспензия клеток хлореллы в контроле и после внедрения во внеклеточное пространство парамагнитного комплекса GdDTPA 0.025 M.

**2.3.2. Особенности диффузионных затуханий намагниченности воды в клетках корней кукурузы при действии давления.** Воздействие внешним давлением на сегменты корней кукурузы увеличивает крутизну диффузионного затухания (ДЗ) намагниченности, что свидетельствует в пользу роста межклеточного диффузионного переноса воды (рис. 6). При этом выдерживание образца при фиксированном значении давления приводит к восстановлению диффузионных затуханий к положению характерному для контроля. Аналогичная реакция ДЗ на давление также показана на корнях пшеницы (данные приведены в диссертации). Объяснение восстановления ДЗ подъемом температуры образца, при сжатии экзо- и эндогенного газа микропор, не проходит, поскольку сброс давления в момент достижения диффузионным затуханием положения, близкого к контрольному, не приводит к ожидаемому охлаждению образца и падению скорости диффузионного переноса (рис. 6, пунктирная линия). Более того, прямые измерения температуры с помощью термопары показали, что в момент подачи избыточного давления, температура образца увеличивается на 0.5 – 0.7 °С, что не соответствует изменениям ДЗ под действием давления.

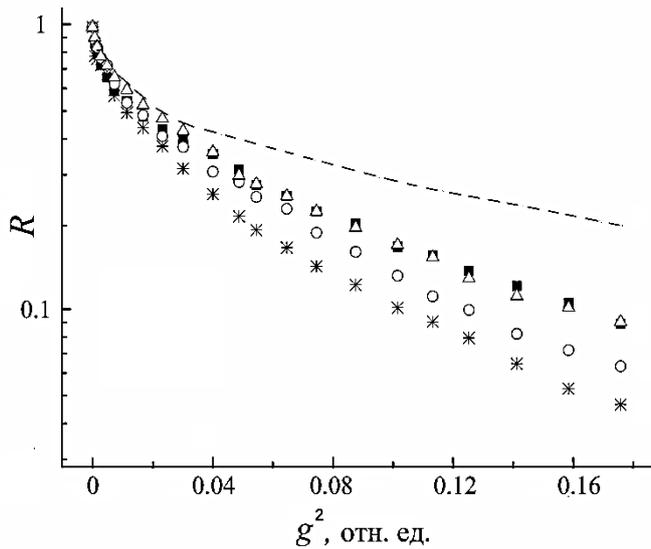


Рис. 6. Релаксация (восстановление) ДЗ к контролю с течением времени после подачи давления: ■ – контроль (при атмосферном давлении), \* - ДЗ непосредственно после включения давления в 3 МПа. ○ - через 10 мин, Δ - через 30 мин, --- – ожидаемое ДЗ при предположении температурного эффекта релаксации ДЗ.

Таким образом, явление подъема температуры при сжатии воздуха в микроскопических полостях образца, по-видимому, не имеет заметного влияния на поведение ДЗ, вероятно, вследствие незначительного количества воздуха, и, разумеется, текущего теплообмена образца с внешней средой. В свою очередь, факт релаксации диффузионных затуханий в условиях фиксированного давления заставляет считать, что на рост диффузионного межклеточного переноса влияет не только абсолютная величина давления, но и динамика его изменения. В отличие от корня кукурузы, для хлореллы влияние давления на средний эффективный коэффициент диффузии ( $D_{eff}$ ) не обнаруживается (рис. 7, а, б), хотя чувствительность  $D_{eff}$  к уровню трансмембранного переноса наглядно демонстрируется в эксперименте с жидким азотом. Воздействие на клетки хлореллы жидким азотом, привело к резкому увеличению  $D_{eff}$  за счет снятия режима ограниченной диффузии, вследствие повреждений плазмалеммы (рис. 7, а). В клетках с повреждённой плазмалеммой, динамика ДЗ определяется в основном барьерной функцией клеточной стенки. Последующее включение давления не вызвало заметных изменений в  $D_{eff}$  от клеток с разрушенной плазмалеммой (рис. 7, а). Этот эксперимент показывает отсутствие барьерной реакции клеточной стенки на давление. Для клеток *D. maritima*, которые изначально не имеют клеточной стенки, наблюдается качественно подобное поведение (данные приведены в диссертации). Искусственное увеличение проницаемости клеток хлореллы раствором аминазина ( $10^{-4}$  М) (Анисимов и др., 2014), как и ожидалось, привело к увеличению  $D_{eff}$ , за счет роста проницаемости плазмалеммы, но последующее воздействие давлением практически не повлияло на значение  $D_{eff}$  (рис. 7, б). Иными словами, суспензии водных растений не подвержены

влиянию давления в той же степени как клетки корня, и в числе очевидных причин, различие объектов по доле газовой компоненты и отсутствию/наличию плазмодесм.

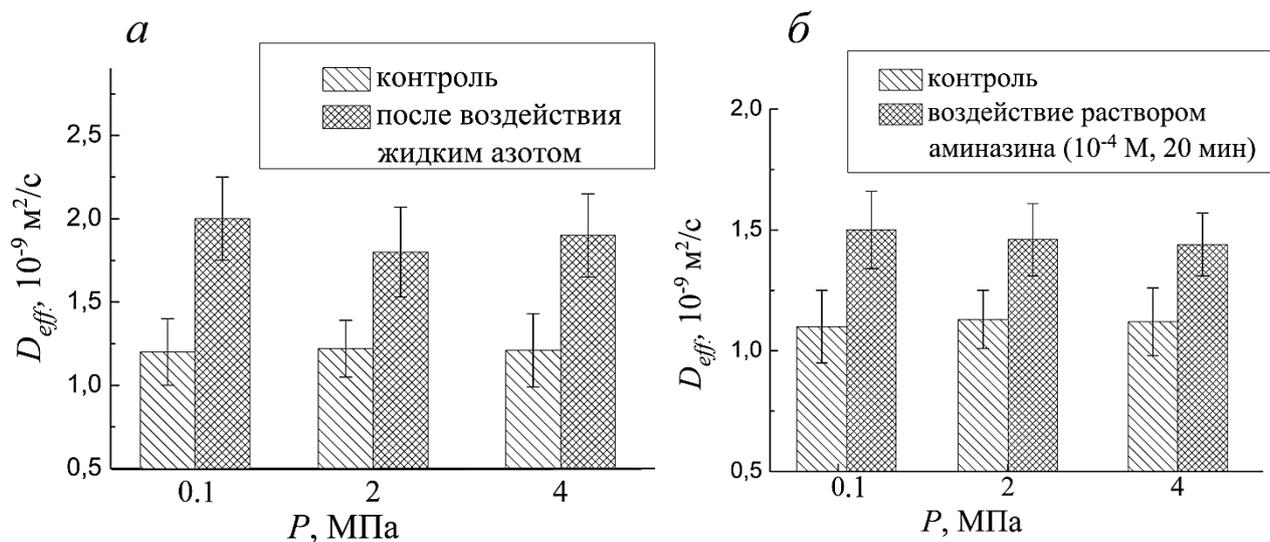


Рис. 7. Зависимость среднего эффективного коэффициента диффузии  $D_{eff}$  воды от давления  $P$  для клеток хлореллы: *а* – контроль и воздействие жидким азотом, *б* – контроль и воздействие раствором аминазина  $10^{-4}$  М, 20 мин.

**2.4. Влияние давления на трансклеточный путь переноса воды в корне растения.** Релаксационные ЯМР эксперименты показали, что под давлением наблюдается укорочение времен магнитной релаксации воды, причем при фиксации давления, регистрируется укорочение времен релаксации со временем (данные приведены в диссертации). Причиной этому может быть: 1) конечная, сравнимая с временной шкалой проведения ЯМР экспериментов, скорость проникновения кислорода в клетки и клеточные органеллы; 2) увеличение скорости трансмембранного обмена, за счет роста проницаемости мембран по механизму перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Гуськов и др., 2009); 3) влияние давления на проводимость аквапоринов по механизму, описанному в работе (Wan *et al.*, 2004). Факт изменения времен релаксации наводит на мысль о применении для оценки проницаемости мембран релаксационного метода ЯМР с парамагнитным допингом. Внедрение парамагнитного допинга GdDTPA (0.025 М) во внеклеточное пространство приводит к отчётливому двухкомпонентному спаду поперечной намагниченности и резко выраженному затуханию сигнала от внеклеточной воды (начальный участок затухания) (рис. 8). Как известно, интенсивность трансмембранного межклеточного переноса в основном определяется уровнем проницаемости плазмалеммы. Заметное различие в поведении релаксационных спадов под давлением для внеклеточной воды,

в отсутствие и присутствии GdDTPA, позволяет полагать, что на ускорение релаксации, вызванное кислородным допингом, накладывается эффект увеличения скорости трансмембранного обмена водой между внеклеточным и внутриклеточным компартментами, за счет роста под давлением проницаемости плазматической мембраны. Действительно, водная проницаемость  $p$  мембранной системы клеток корня кукурузы, вычисленная с помощью решения обратной задачи обмена, увеличивается под влиянием внешнего давления  $P$  (рис. 9). Увеличение проницаемости мембран под давлением, вследствие роста ПОЛ, представляется убедительным, но тенденция к быстрому восстановлению параметров переноса после сброса давления, не исключает механизм влияния давления на проводимость аквапоринов. В любом случае, на примере клеток корней кукурузы, показана чувствительность к давлению трансмембранного межклеточного обмена водой.

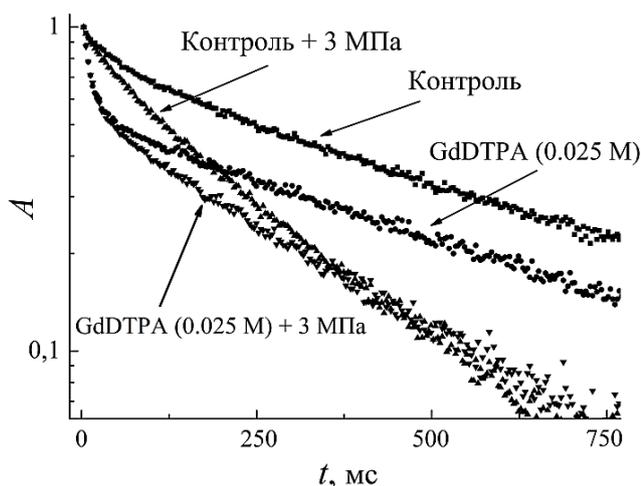


Рис. 8. Релаксационные затухания поперечной протонной намагниченности от воды корня кукурузы в норме (контроль) и под давлением в 3 МПа, в отсутствие и в присутствии парамагнитного допинга GdDTPA 0.025M во внеклеточном пространстве.

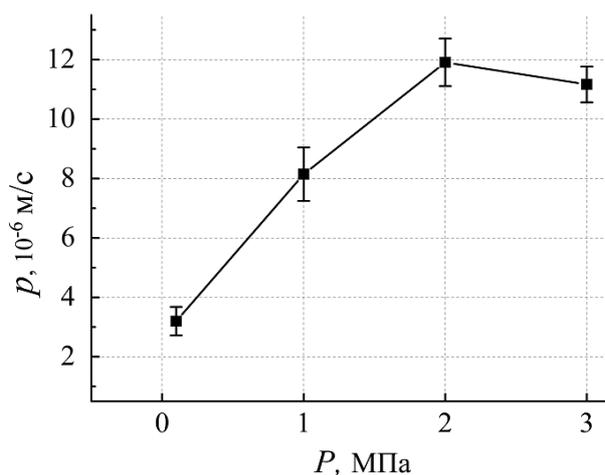


Рис. 9. Зависимость водной проницаемости  $p$  мембранной системы клеток корня кукурузы из зоны всасывания от величины внешнего давления  $P$ .

**2.5. Реакция симпластной системы переноса воды в растении на внешнее давление.** Под воздействием внешнего давления в клетках корней кукурузы происходит увеличение среднего эффективного коэффициента диффузии ( $D_{\text{eff}}$ ) воды и эффективной клеточной проницаемости ( $p$ ) (рис. 10). При этом сброс давления

приводит к возвращению ДЗ к начальному положению (данные приведены в диссертации) и соответственно, к восстановлению параметров  $D_{eff}$  и  $p$ . Иными словами, приложение внешнего давления приводит к заметному увеличению интенсивности межклеточного переноса воды, причём процесс имеет обратимый характер. Возникает вопрос, не связаны ли наблюдаемые эффекты давления с реакцией клеток стелы корня, например, через механизм манжетного сдавливания (Мелещенко, 2002)? Оказалось, что при удалении из корней стелы, т.е. на «рукавичках» из клеток кортекса, зависимости ДЗ от давления качественно аналогичны таковым для целого корня (данные приведены в диссертации).

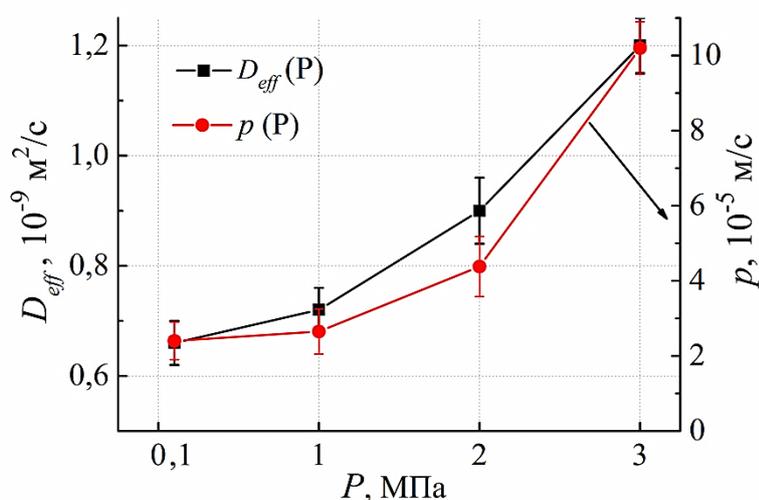


Рис. 10. Зависимость среднего эффективного коэффициента диффузии воды  $D_{eff}$  и эффективной клеточной проницаемости  $p$  от величины внешнего давления для клеток корней кукурузы из зоны всасывания.

Применение парамагнитного допинга в сочетании с выбором в эксперименте длинных времён диффузии (300 мс и выше), позволяет контрастировать путь переноса воды по симпласту. На рис. 11 приведены ДЗ намагниченности для сегментов корня в контроле и с парамагнитным допингом GdDTPA (0.025 М). Диффузионные затухания показывают исчезновение быстро спадающего начального участка ДЗ после внедрения во внеклеточное пространство комплекса GdDTPA, вследствие ускоренной релаксации внеклеточной воды на парамагнетике. В этих условиях, воздействие давлением также приводит к увеличению  $D_{eff}$  воды, что говорит об увеличении водной проводимости по симпластной системе корня (рис. 12). Выше было показано, что не имеющие плазмодесм клетки хлореллы и дуналиеллы, проявляют резистентность к действию давления (рис. 7). Таким образом, можно заключить, что давление способно модулировать межклеточный перенос воды по симпласту корня через плазмодесмы.

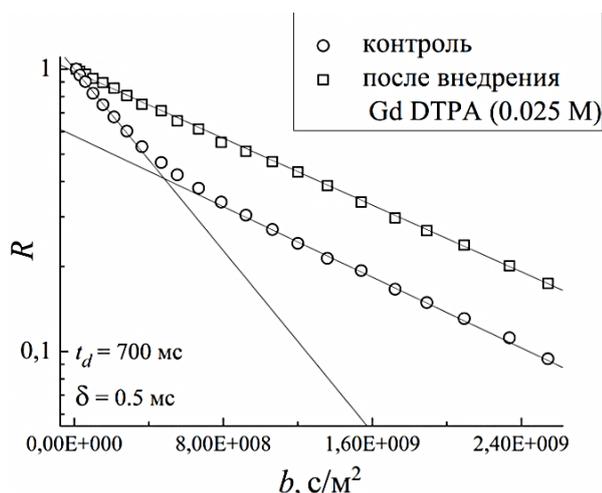


Рис. 11. Диффузионные затухания намагниченности для сегментов корней кукурузы из зоны всасывания в контроле и после внедрения во внеклеточное пространство парамагнитного комплекса GdDTPA (0.025 M), ( $b = \gamma^2 \delta^2 g^2 t_d$ ).

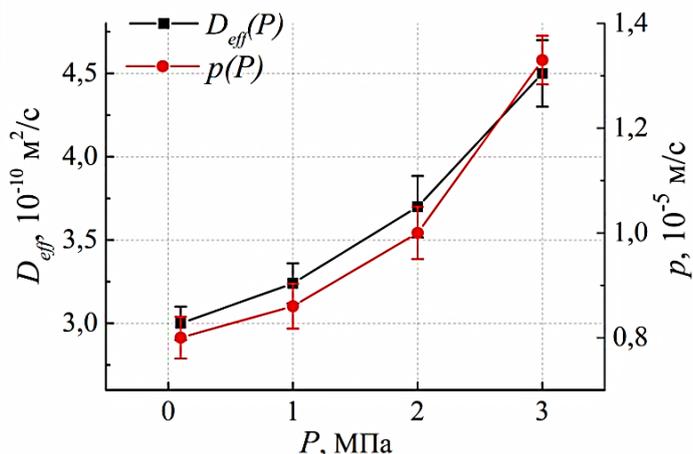


Рис. 12. Зависимость эффективного коэффициента диффузии воды  $D_{eff}$  и клеточной проницаемости симпластной системы клеток корней кукурузы от величины внешнего давления  $P$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фактор давления оказывает влияние практически на все процессы метаболизма клеток как растительного, так и животного происхождения. В данной работе, на примере клеток корней кукурузы, показано, что давление вызывает нелетальные деструкции тонопласта, приводит к альтерациям в эндоплазматической системе клеток, которые сопровождаются изменением (уменьшением) параметров дыхания, тепловыделения и роста. На примере корней кукурузы и пшеницы показано, что внешнее давление обратимо влияет на интенсивность межклеточного переноса воды как трансмембранным путем, с пересечением плазматической мембраны, так и по симпласту через плазмодесмы, путём модуляции их проводимости. В литературе механизм модуляции проводимости ПД, связывается с изменениями апертуры шейных сужений (ШС) ПД (Анисимов, Егоров, 2002). Есть данные о триггерном необратимом закрытии ПД при искусственно созданном между клетками перепаде давления выше 200 КПа, что скорее связано с «аварийной» изоляцией клеток, с целью предотвращения потери воды через симпластную систему при повреждении органа (Oparka, Prior, 1992). Опираясь на литературные данные, цепь событий с включением звена давления может быть следующей: изменение апертуры ПД связано с активацией контрактивных белков (КБ), локализованных в области ШС ПД (Roberts,

Oparka, 2003). В свою очередь, известна связь функционирования КБ с уровнем кальция (Martindale, Salisbury, 1990). В работе (Holdaway-Clarke *et al.*, 2000), показана связь проводимости ПД с уровнем кальция. Наконец, имеющиеся данные о чувствительности концентрации цитоплазматического кальция к величине давления (Yan Wu *et. al.*, 2012), замыкают цепь механизмов модуляции проводимости ПД давлением. Полученные в данной работе экспериментальные факты, в совокупности с литературными данными, напрашиваются на применение в объяснении механизма колебаний тургорного давления в тканях корня, содержащих развитую сеть плазмодесм. Активная фаза роста тургорного давления (набухания) клетки связана с осмотическим механизмом увеличения оводненности. Фаза уменьшения объема – пассивная фаза - обусловлена уменьшением тургорного давления и обеспечивается эластическими свойствами растянутой клеточной стенки. Переход от активной к пассивной фазе создаётся изменением проводимости ПД. После уменьшения тургорного давления, проводимость ПД восстанавливается до нормы, затем вновь происходит фаза роста осмотического входа воды в клетку и т.д. Предлагаемый механизм пульсаций, может быть рабочей гипотезой к феномену автоколебательного режима корневого давления.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан стенд для воздействия давлением в диапазоне до 5 МПа на биологические объекты непосредственно во время ЯМР эксперимента, с регулируемой скоростью изменения давления, с возможностью разрушения клеток, а также их фиксации для электронной микроскопии непосредственно под давлением.

2. Впервые, на примере корней кукурузы, установлено, что под давлением до 4 МПа в цитоплазме клеток происходит образование кластерных агрегатов из составляющих элементов эндомембранной системы, наблюдаются локальные деструкции тонопласта. Для плазмалеммы характерно сохранение ее целостности и барьерных функций.

3. Выявлено замедление роста растений кукурузы под влиянием давления (4 МПа × 5 часов) с полным восстановлением скорости роста через сутки после снятия давления. Ингибирование роста связано с альтерациями органелл эндомембранной системы клеток и торможением метаболических процессов.

4. Показано укорочение времен спин-спиновой и спин-решёточной релаксации воды в клетках корней под давлением, что связано с парамагнетизмом кислорода воздуха межклетников, дополнительно растворяющегося под давлением в водной среде растительного объекта (эффект кислородного допинга).

5. Впервые на корнях кукурузы и пшеницы установлен обратимый рост под статическим давлением межклеточного переноса воды по трансклеточному и симпластному пути.

6. Обнаружено, что давление до 4 МПа не изменяет параметры трансмембранного переноса воды в суспензиях клеток *Chlorella vulgaris* и *Dunaliella maritima*, в отличие от корней кукурузы (*Zea mays L.*) и пшеницы (*Triticum aestivum*). В числе причин, различие объектов по объёмной доле газовой компоненты.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Абдрахимов, Ф.А. Влияние гидростатического давления на структурную организацию клеток корней кукурузы / Ф. А. Абдрахимов, М. А. Суслов, А. В. Анисимов // Цитология. — 2013. — Т. 55, № 6. — С. 414-420.
2. Анисимов, А.В. Оснастка к исследованиям массопереноса под влиянием статического и динамического давления непосредственно в датчике градиентного ЯМР / А. В. Анисимов, М. А. Суслов, В. А. Зуйков // Датчики и системы. — 2012. — № 7. — С. 64-67.
3. Анисимов, А.В. Транспорт воды по симпласту корня модулируется давлением / А. В. Анисимов, М. А. Суслов, А. Ю. Алябьев // Физиология растений. — 2014. Т. 61, № 4. — С. 512-519.
4. Суслов, М. А. Тестер для контроля ЯМР релаксометров – диффузометров / М. А. Суслов, А. В. Анисимов // Метрология. — 2014. № 4. — С. 37-43.

### Работы, опубликованные в материалах научных мероприятий

5. Suslov, M. A. Temperature dependence of water diffusion through aquaporins of plant cells: spin-echo NMR study / I. F. Ionenko, M. A. Suslov // Proceedings / Kazan, 2009. — P. 36-40.

6. Анисимов, А.В. Генерация статического и динамического давления к ЯМР исследованиям массопереноса в гетерогенных объектах / А.В. Анисимов, **М. А. Суслов** // Сб. статей / Йошкар-Ола, 2011. — С. 217-221.
7. Абдрахимов, Ф.А. Влияние гидростатического давления в ткани на структурную организацию клеток на примере корней кукурузы / Ф.А. Абдрахимов, **М.А. Суслов**, И.Ф. Ионенко, Н.Р. Даутова, А.В. Анисимов // Сб. тезисов / Казань, 2011.— С. 3.
8. Анисимов, А.В. К вопросу о гидродинамической сигнальной системе регуляции транспорта воды в растении / А.В. Анисимов, И.Ф. Ионенко, **М.А. Суслов**, Ф.А. Абдрахимов // Сб. тезисов / Казань, 2011.— С. 15.
9. **Суслов, М.А.** К методике исследования гидродинамической сигнальной системы растения спин-эхо методом ЯМР с генератором импульсов давления, использующим лазерное излучение / **М.А. Суслов**, В.А. Зуйков, А.В. Анисимов // Сб. тезисов / Казань, 2011.— С. 179.
10. **Суслов, М.А.** Диффузионный перенос воды в корнях кукурузы под влиянием гидростатического давления / **М.А. Суслов**, И.Ф. Ионенко, Ф.А. Абдрахимов, А.В. Анисимов // Сб. тезисов / Казань, 2010. — С. 57.
11. Анисимов, А.В. Внутриклеточные структурные изменения и транспорт воды в растениях под влиянием давления / А.В. Анисимов, **М.А. Суслов**, Ф.А. Абдрахимов, И.Ф. Ионенко // Сб. тезисов / Нижний Новгород, 2012. — С. 14.
12. Абдрахимов, Ф.А. Альтерации структуры цитоплазмы клеток растительных объектов в диапазоне гиперфизиологических давлений / Ф.А. Абдрахимов, А.В. Анисимов, **М.А. Суслов** // Сб. тезисов / Нижний Новгород, 2012. — С. 220.
13. **Суслов, М.А.** Оснастка к градиентному ЯМР для исследования транспорта воды в биологических объектах под влиянием давления // **М.А. Суслов**, А.В. Анисимов // Сб. тезисов / Нижний Новгород, 2012. — С. 88.
14. Ионенко, И.Ф. Модуляция трансмембранного переноса воды через аквапорины растительных клеток осмотическим и гидростатическим давлением / И.Ф. Ионенко, Ф.А. Абдрахимов, **М.А. Суслов**, А.В. Анисимов // Сб. тезисов / Нижний Новгород, 2012. — С. 103.
15. Анисимов, А.В. К вопросу о движущих силах транспорта воды в растениях / А.В. Анисимов, **М.А. Суслов**, И.Ф. Ионенко // Матер. Всерос. науч. конф. / Изд. мордов. университета. — Саранск, 2013. — С. 17-19.

16. **Суслов, М.А.** Структурная организация клеток (корня кукурузы) под внешним давлением / **М.А. Суслов, Ф.А. Абдрахимов, А.В. Анисимов** // Матер. Всерос. науч. конф. / Изд. мордов. университета. — Саранск, 2013. — С. 183-186.
17. Анисимов, А.В. Фактор давления в межклеточном водопереносе и мембранном трафике в биологических тканях / А.В. Анисимов **М.А. Суслов** Ф.А. Абдрахимов, И.Ф. Ионенко. // Сб. тезисов VI Всерос. с международ. участием Конгресса молодых ученых «Симбиоз-Россия 2013», Иркутск, 2013. — С. 34-36.
18. **Суслов, М.А.** Проницаемость плазматической мембраны клеток корня кукурузы под внешним давлением / **М.А. Суслов, А.В. Анисимов** // Матер. Международной. науч. конф. и школы молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий», Калининград, 2014. — С. 430-432.
19. Анисимов, А.В. Роль давления в межклеточном транспорте воды по симпластной системе / А.В. Анисимов, **М. А. Суслов** // Матер. Международной. науч. конф. и школы молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий», Калининград, 2014. — С. 38-40.
20. **Суслов, М. А.** Влияние гидростатического давления на структурные характеристики клеток и межклеточный транспорт воды в корнях кукурузы / **М.А. Суслов, Ф.А. Абдрахимов, А.В. Анисимов** // Сборник тезисов Международной. Пущинской школы-конф. молодых учёных «Биология наука 21 века», Пущино, 2014. — С. 120.