

УДК 581.1

## ВОДНЫЙ ОБМЕН РАСТЕНИЙ: ИТОГИ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЙ

*Л.П. Хохлова, М.А. Бочкарева*

### Аннотация

В обзорной статье изложены результаты исследований по применению импульсного метода ЯМР для изучения водного обмена растений, начатых в 60-е годы XX века и проводимых в настоящее время на кафедре физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета. Рассмотрены преимущества этого метода по сравнению с другими физическими методами и возможности использования релаксационных ( $T_1$ ,  $T_2$ ) и диффузионных (КСД) параметров для оценки состояния и транспорта воды в тканях и клетках растений без существенного нарушения их состояния. Обращается внимание на то, что гетерогенность и сложность биологических объектов обуславливает многофакторность природы измеряемых показателей и необходимость их объективной интерпретации в сочетании с физиологическими и термодинамическими характеристиками водного обмена. Описаны разработанные в последние годы новые методические подходы к изучению внутри- и межклеточного переноса воды по разным транспортным путям – симпластному и трансмембранному – на основе коэффициентов самодиффузии молекул воды, определяемых из неэкспоненциального спада диффузионного затухания сигнала спинного эха. Экспериментально обосновывается существование в клетках ранее неизвестного механизма водного гомеостаза, основанного на периодической смене направления диффузионных потоков воды между цитозольным и вакуолярным компартментами клетки. Этот механизм рассматривается как часть общей стрессовой реакции растений, адаптационное значение которого состоит в защите клеток от порогового обезвоживания.

**Ключевые слова:** растения, водный обмен, состояние воды, диффузионный транспорт, импульсный метод ЯМР.

---

### Введение

В настоящее время техника ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спиновое эхо) относится к современным методам исследования различных процессов протонсодержащих сред и систем. ЯМР представляет собой резонансное поглощение энергии радиочастотного поля веществами, молекулы которых содержат ядра с магнитными свойствами (для молекул воды – протоны). Эти ядра обладают собственным магнитным моментом – спином. Если систему с такими ядрами поместить в постоянное магнитное поле и подвергнуть воздействию радиочастотных колебаний, то при определенной частоте будет происходить резонансное поглощение радиочастотной энергии и переход ядерных спинов с низшего энергетического уровня на высший, который регистрируется специальной радиотехнической аппаратурой как сигнал ядерного магнитного резонанса. Импульсный метод ЯМР, в отличие от стационарного, основан на слабом воздействии радиочастотных колебаний в течение коротких промежутков

времени на исследуемые объекты. Преимуществом метода ЯМР по сравнению с другими физическими методами является изучение живых растительных и животных тканей без существенного нарушения их состояния. Это объясняется тем, что вклад таких факторов, как влияние магнитного поля, используемого в ходе измерений, а также воздействие радиочастотным импульсным полем в течение микросекундных отрезков времени, пренебрежимо мал [1]. Наряду с этим метод ЯМР отличается высокой чувствительностью к движениям на атомно-молекулярном уровне, поэтому возможности и перспективы использования ЯМР для изучения состояния и транспорта воды в растениях уже многие десятилетия привлекают внимание ученых [2–4]. Основными параметрами, измеряемыми импульсным ЯМР в протонсодержащих системах, являются времена спин-спиновой ( $T_2$ ) и спин-решеточной ( $T_1$ ) релаксации, количество резонирующих протонов (населенность), коэффициент самодиффузии (КСД), характеризующий интенсивность трансляционного (поступательного) движения молекул воды.  $T_2$  – это время, в течение которого устанавливается энергетическое равновесие в системе взаимодействующих ядерных спинов, то есть время возвращения резонирующих ядер (протонов) на исходный (низший) энергетический уровень после прекращения воздействия радиочастотных импульсов.  $T_1$  – это время, необходимое для восстановления энергетического равновесия в системе резонирующих ядер с другими ядрами или молекулами (так называемой «решеткой»).

#### **Состояние воды в клетках растений по данным ЯМР-измерений: дискуссионность вопроса**

Исследования водного режима в связи с обменом веществ, устойчивостью и продуктивностью растений в течение многих лет являются традиционным направлением широко известной Казанской школы физиологов растений, основателем которой заслуженно считается крупный ученый в области водного режима растений профессор А.М. Алексеев, который почти сорок лет (1932–1971 гг.) руководил кафедрой физиологии растений и микробиологии Казанского государственного университета (КГУ).

Первой работой, выполненной на кафедре в начале 60-х годов XX в. с использованием метода спинового эха для изучения водного обмена растений, была студенческая работа [5], руководителями которой являлись профессор И.Г. Сулейманов и ассистент кафедры радиоспектроскопии КГУ В.Д. Корепанов. На ЯМР-установке, сконструированной В.Д. Корепановым (одной из первых в СССР), в разных органах красного клевера – листьях, почках и корнях, отобранных в летний и зимний периоды, были измерены времена спин-спиновой релаксации ( $T_2$ ). Одновременно рассчитывалась степень гидратации по соотношению сухое вещество / связанная вода. Было обнаружено укорочение  $T_2$  в корнях и почках в зимнее время по сравнению с летним периодом. По-видимому, это связано с уменьшением подвижности молекул воды и усилением спин-спинового взаимодействия под влиянием низких температур, которое, в свою очередь, может обуславливать появление воды дальней упорядоченности на поверхности макромолекул и низкомолекулярных веществ, о чем свидетельствует наблюдаемое в опытах повышение степени гидратации сухого вещества. В этой работе также было высказано предположение об изменении структуры

воды в зимнее время, в частности, об усилении упорядоченности клеточной воды, которое впоследствии получило аргументированное теоретическое обоснование [6].

Ввиду того, что в дальнейшем речь будет идти о состоянии воды в клетках, необходимо уточнить содержание этого термина. Под состоянием воды предложено понимать ее термодинамические и физико-химические свойства и связанную с ними структуру, показателями которых являются активность, химический и водный потенциал, подвижность молекул воды, ее рассеиваемость и энергетический уровень [7]. Все эти свойства влияют на структуру воды – характер межмолекулярных водородных связей, плотность ее упаковки и др. Вместе с тем состояние воды характеризуется также ее физиологическими свойствами, к числу которых следует отнести: соотношение «свободной» (с неизменными физико-химическими свойствами) и «связанной» (с измененными физико-химическими свойствами вследствие взаимодействия с неводными компонентами) воды, стабильность состояния воды, определяемую по реакции на воздействующие факторы, и способность к внутри- и межклеточному обмену.

В начале 60-х годов прошлого столетия А.М. Алексеев высказывает точку зрения о необходимости более углубленного изучения состояния внутриклеточной воды на молекулярном уровне с помощью физических методов, прежде всего ЯМР [8]. В опубликованной к этому времени работе Н.А. Мальцева [9] также обосновывается возможность применения ЯМР для прижизненного изучения состояния тканевой и клеточной воды в условиях активного метаболизма и анабиоза. Автором было обнаружено уменьшение коэффициента самодиффузии воды в различных тканях животных и растений по сравнению с чистой водой, что указывает на снижение «структурной температуры тканевой воды». По мнению ученого, различные биологические объекты могут быть охарактеризованы в зависимости от состояния воды в связи с введением понятия «структурная температура тканей». Это следует считать одним из первых указаний на перспективность использования ЯМР-диагностики живых систем, которая, как известно, в настоящее время относится к числу современных и чувствительных диагностических методов.

После появления возможности измерения в растениях коэффициента самодиффузии (КСД) и проведения обширных опытов по определению этой величины в листьях разных видов растений в присутствии и отсутствие электролитов, а также в выделенной из растительных тканей цитоплазме А.М. Алексеев с сотрудниками [8, 10] пришли к выводу о свойственных протоплазменной воде более стабилизированной структуре и меньшей подвижности по сравнению с чистой водой *in vitro*. Исключительно важным является поднятый в этих работах вопрос о физиологическом значении молекулярного состояния внутриклеточной воды. Была установлена прямая зависимость между подвижностью молекул воды и интенсивностью транспирации, что свидетельствует о влиянии молекулярной динамики воды на ход физиологических процессов.

С середины 60-х годов XX века исследования состояния воды в растительных клетках методом ЯМР активно стали проводиться в лаборатории водного обмена Биологического института Казанского филиала АН СССР, которой руководил профессор Н.А. Гусев. Это стало возможным благодаря совместным

работам физиологов с физиками, среди которых, кроме Н.А. Мальцева, были В.Д. Федотов, Л.А. Абецдарская, А.В. Анисимов, Г.А. Великанов и др. В первоначальных работах, в которых было установлено снижение КСД в растительных тканях по сравнению с чистой водой, физиками полностью разделялась точка зрения об особом состоянии клеточной воды [11]. При этом отмечалось, что техника «спинового эхо» является адекватной для изучения состояния тканевой воды в растительных тканях и что вода в клетках растений является однофазной, в них нет свободной воды и вся вода находится под структурным контролем клетки. Безусловно, с этим выводом о полном отсутствии в клетках свободной воды невозможно согласиться, так как в клетках постоянно происходит обмен между связанной и свободной водой, поскольку это соотношение является динамической категорией, способной к непрерывному обновлению, свойственному для любого ингредиента живой системы.

Последовательно придерживаясь до конца своей жизни точки зрения об особом состоянии клеточной воды, А.М. Алексеев, основываясь на последних достижениях физико-химии высокополимерных веществ и данных о структуре воды, в своих работах [12, 13] обращает внимание на необходимость изучения тонких взаимодействий макромолекул белков с молекулами воды, так как состояние воды (степень ее связанности) и конформационное состояние белковых молекул взаимосвязаны и взаимообусловлены. По мнению ученого, эти взаимодействия лежат в основе сложной структуры цитоплазмы как единой целостной и притом подвижной системы, в которой вода наряду с белками является одним из важных ее ингредиентов. Поэтому при характеристике состояния воды в цитоплазме нужно иметь в виду, что структура и состояние цитоплазменной воды определяется всей цитоплазмой как целостной системой. По существу была выдвинута и обоснована новая концепция общебиологического значения структуры цитоплазмы живых клеток. Именно с этих позиций поддавались объяснению многие особенности структуры и свойств протоплазмы (подвижность, проницаемость, передача сигналов внутри клетки, фермент-субстратные взаимодействия), которые не укладывались в рамки прежних представлений о протоплазме как коллоидной системе. О значительном вкладе школы профессора А.М. Алексеева в создание теоретических основ водного обмена растений свидетельствует полученное им приглашение прочитать открытую публичную лекцию на 28-х Тимирязевских чтениях, которые состоялись 2 июня 1967 г. в Институте физиологии растений АН СССР (г. Москва) [13].

Однако в этот период вопрос о состоянии внутриклеточной воды на основании дополнительных ЯМР-измерений в тех же объектах был подвергнут критическому пересмотру физиками [14], которые пришли к точке зрения, прямо противоположной выводам Н.А. Мальцева [11] и физиологов [13]. Они полагали, что вода в клетке не имеет особого состояния, незначительно отличается от чистой воды *in vitro* и что связанной воды в клетке мало (это в основном мономолекулярная гидратная вода). Такому выводу способствовало установление обратной зависимости КСД в растворах белков и тканях растений от времени наблюдения, то есть от длины пробега молекулы воды. Эту зависимость авторы объяснили влиянием «барьеров» (макромолекулы, мембраны, органеллы и др.), снижающих диффузию воды. При уменьшении времени на-

блюдения, то есть среднего смещения молекул, количество барьеров на пути движения молекул уменьшается, вследствие чего КСД увеличивается. Таким образом, истинное значение этой величины для внутриклеточной воды можно получить при наиболее коротких временах наблюдения, когда среднее смещение молекул становится меньше расстояния между барьерами. Другой причиной снижения КСД является гидратация макромолекул и низкомолекулярных веществ, но вклад ее незначителен. Согласно проведенным расчетам снижение КСД в 10%-ном растворе альбумина за счет барьеров составляет  $0.38 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ , а за счет гидратации – всего лишь  $0.05 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ . В результате сходство коэффициентов самодиффузии между барьерами и энергии самодиффузии с чистой водой привело к выводу, согласно которому основная масса воды (до 80–95%) клеток по свойствам почти не отличается от чистой воды и лишь гидратная вода (10–15%) имеет измененные свойства (менее подвижна). Это позволило сделать заключение о том, что «коэффициенты самодиффузии воды в протоплазме отражают в основном структурные особенности протоплазмы клеток разных тканей, обусловленные количеством и качеством микроскопических и субмикроскопических частиц» [14, с. 634].

Безусловно, это мнение является дискуссионным, так как невозможно представить, каким образом чистая вода может сохранить в неизменном виде все свои свойства в такой сложнейшей и гетерогенной системе, как клетка с ее разнообразными взаимодействиями с молекулами других веществ и ионами, где вода выполняет полифункциональную роль, являясь средой, структурообразователем, продуктом и субстратом метаболических процессов, терморегулятором и т. д. Поэтому точка зрения об отсутствии у клеточной воды особого состояния и невозможности влияния его на физиологические процессы является, по-видимому, сомнительной. Проблема воды, ее структуры, состояния и уникального функционального значения для клеточной физиологии как растительных, так и животных организмов исключительно актуальна, но в силу существующих методологических и технических трудностей остается пока нерешенной.

#### **Многофакторная природа динамичности релаксационных и диффузионных параметров в растительных объектах: действие низких температур**

В конце 70-х годов XX века мы стали проводить ЯМР-исследования на кафедре молекулярной физики КГУ с участием доцента В.Д. Скирды (ныне профессора, заведующего кафедрой) и инженера В.М. Орешникова. Эта кафедра располагает чувствительным импульсным когерентным релаксатором, более приспособленным для изучения пористых систем, к которым относится растительная клетка, и диффузомером оригинальной конструкции. В этих работах [15, 16] основное внимание было сосредоточено на измерении времен спиновой релаксации –  $T_2$  по методу Карра и Перселла [17] в модификации Мейбума и Джилла [18]. Согласно данным литературы, по временам релаксации молекул воды в биологических системах можно судить о подвижности молекул воды (чем больше подвижность, тем длиннее времена релаксации), количестве фракций и содержании в них воды, отличающихся релаксационными

характеристиками, содержании незамерзающей (связанной воды), проницаемости мембран [19–22], а также выявить взаимовлияние гидратной воды и динамической структуры макромолекул белков [23]. Однако интерпретация данных ЯМР нередко осложняется из-за многокомпонентности и высокой динамичности биосистем [24]. Поэтому для более объективной оценки состояния и транспорта воды с помощью как релаксационных, так и диффузионных параметров в каждом конкретном случае, например, при действии на растения различных факторов или при изменении физиологического состояния растений, необходимы дополнительные опыты и сопоставление этих параметров с физиологическими показателями водного обмена – общей оводненностью объектов, вододерживающей способностью тканей, соотношением связанная/свободная вода, ее активностью или водным потенциалом.

Показано, что кривая спада амплитуд эхо-сигналов протонов в тканях узлов кущения и выделенных из них митохондриях озимой пшеницы состоит из двух компонент – быстрой и медленной [16]. Это указывает на существование в объектах двух фаз протонов, различающихся подвижностью, что позволило определить в исследуемых образцах по формуле Циммермана и Бриттина [25] два времени спин-спиновой релаксации: короткое  $T_{2(1)}$  и длинное  $T_{2(2)}$ . Обычно многокомпонентные сигналы спинового эхо до нас наблюдали и другие исследователи, но лишь в объектах с низкой влажностью (покоящиеся семена, подсушенные дрожжи) [26, 27] и только в одной работе, проведенной на тканях глаза с нормальной оводненностью (50–80%), был зарегистрирован двухфазный сигнал времени  $T_2$  [28]. Однако причины неоднофазного характера спада намагниченности авторы в своей работе не объяснили. Для выяснения природы короткого и длинного времени  $T_2$  нами были поставлены модельные опыты с лиофильно высушенными и нормально увлажненными образцами (узлы кущения, митохондрии, белок – бычий сывороточный альбумин, липид – лецитин и белок + липид (14 : 6) [16]. Было установлено отсутствие медленной компоненты  $T_{2(2)}$  в лиофильно высушенных тканях, органеллах и биополимерах, что явилось основанием считать, что за величину этой компоненты в объектах с нормальной влажностью (60–80%) ответственны в основном протоны более подвижных (свободных) молекул воды. Интерпретировать природу короткого времени  $T_{2(1)}$  оказалось значительно труднее, так как менее подвижная фаза протонов в клетке весьма гетерогенна по составу и скоростям релаксации. Но тем не менее мы исходили из того, что по сравнению с другими неводными протонсодержащими соединениями белки наиболее широко представлены в клетке. В соответствии с химической природой они должны отличаться от липидов повышенной упорядоченностью структуры и большей заторможенностью движения протонов, о чем свидетельствует меньшая величина  $T_{2(1)}$  в сухом белке по сравнению с  $T_{2(1)}$  липидов. Сказанное позволяет считать, что основной вклад в величину короткого времени  $T_{2(1)}$  в высушенных образцах вносят именно белки (наряду с гидратной водой в оводненных объектах). Кроме того, как показали опыты, в системе белок – липид – вода величина  $T_{2(1)}$  была меньше, чем в системе белок – вода, что, по-видимому, связано с конформационными изменениями белка в присутствии липида вследствие образования упорядоченного липопротеидного комплекса. Следовательно, величина быстрой компоненты

$T_{2(1)}$  зависит не только от скорости релаксации и количества протонов неводных веществ (белков, липидов) и гидратной воды, но и от структурного состояния биополимеров, то есть степени их структурной упорядоченности. В этих же работах [15, 16] помимо измерения времени  $T_{2(1)}$  и  $T_{2(2)}$  в увлажненных образцах нам впервые удалось экспериментально и теоретически определить соотношение населенностей фаз протонов с коротким ( $p_1$ ) и длинным ( $p_2$ ) временем релаксации и выявить относительный вклад протонов отдельных молекул в ту или иную фазу. Показано, что в системе белок – вода экспериментальное и теоретическое значения населенностей близки. Более высокое значение экспериментально определяемого отношения  $p_1/p_2$  в системе белок – липид – вода по сравнению с другими образцами может указывать на то, что во взаимодействие белок – липид вовлекается некоторое количество воды, необходимое для формирования структуры мембран.

Несомненный интерес с точки зрения выяснения роли молекулярной динамики воды в фенотипических ответах растений на условия окружающей среды представляют данные о влиянии низких температур на биофизические показатели водного обмена растений. По нашим данным [16], в тканях узлов кущения и изолированных из них митохондриях растений озимой пшеницы, испытывавших действие постепенного снижения температуры в природных условиях в осеннее время (октябрь – ноябрь) от 4 °С до –8 °С, что соответствует первой и второй фазам закаливания [29], происходило уменьшение сигнала как быстрой, так и медленной компоненты  $T_2$ . Уменьшение  $T_{2(2)}$  и населенности этой компоненты следовало за снижением общей оводненности объектов. В связи с этим можно считать, что причиной укорочения  $T_{2(2)}$  является уменьшение содержания воды в исследуемых тканях и органеллах. Не исключается частичная зависимость этого эффекта и от индуцированного низкими температурами падения подвижности молекул воды.

Более сложную природу имеет явление снижения величины быстрой компоненты –  $T_{2(1)}$ . Детальные исследования влияния низких температур на химический состав образцов (соотношение белок/фосфолипиды), конформацию макромолекул белков по данным метода ИК-спектроскопии, физиологические показатели водообмена (содержание свободной и связанной воды, водоудерживающую способность) позволили заключить, что уменьшение величины  $T_{2(1)}$  в процессе осеннего закаливания обуславливается как количественными, так и качественными изменениями в тканях и органеллах, приводящими к снижению скорости релаксации протонов малоподвижной фазы и изменению относительного вклада протонов в эту фазу от различных веществ клеток. Есть основания полагать, что уменьшение величины короткого времени релаксации  $T_{2(1)}$  в период осеннего закаливания связано с перераспределением химического состава объектов, в частности, с увеличением содержания фосфолипидов, а также с усилением взаимодействий неводных веществ с молекулами воды, отражением чего является повышение содержания связанной воды, и с конформационными изменениями макромолекул белков в сторону усиления их свернутости и компактности [30]. Таким образом, в результате проведенных исследований дано экспериментальное и теоретическое обоснование многофакторной природы и изменчивости времен спин-спиновой релаксации в растениях.

Новые возможности использования импульсного метода ЯМР для изучения водообмена растений открылись в связи с появлением данных о том, что механизм магнитной релаксации в биологических системах зависит от скорости трансмембранного обмена воды через плазмалемму [22] и что величина эффективного коэффициента самодиффузии воды ( $D_{эфф}$ ) характеризует суммарный межклеточный транспорт воды, включающий как перенос воды через плазмалемму (мембранный транспорт), так и по симпласту – через плазмодесмы [31]. Следует отметить, что вычисление  $D_{эфф}$  обычно проводится при больших временах наблюдения, при которых движение молекул ограничено полупроницаемостью мембран, и рассчитывается из уравнения для неограниченной диффузии, где  $D$  заменяется на  $D_{эфф}$  [32]. Следовательно, релаксационные и диффузионные параметры в ЯМР-исследованиях можно использовать для изучения водопроницаемости мембран, а при внедрении парамагнитных зондов во внеклеточное пространство и для оценки скорости переноса воды по симпласту. Исходя из возможности такой интерпретации ЯМР-параметров, ряд авторов наблюдаемое в тканях закаленных низкими положительными температурами растений укорочение  $T_2$  и  $T_1$  объяснили повышением обмена воды между вне- и внутриклеточным пространством из-за увеличения водопроницаемости плазмалеммы [33, 34]. Одновременно зарегистрированное в этих опытах уменьшение величины  $D_{эфф}$  [33], по мнению авторов, отражает перераспределение межклеточного транспорта воды по разным путям: скорость обмена воды через плазмалемму усиливается в результате повышения ее проницаемости для воды, а скорость транспорта воды через симпласт уменьшается.

Подобное объяснение укорочения  $T_1$  и  $T_2$  и уменьшения  $D_{эфф}$  в растениях под действием закаливающих температур нам представляется недостаточным, так как оно не учитывает другие причины динамичности времен релаксации, о чем говорилось выше. В наших опытах укорочение длинного времени  $T_{2(2)}$  (медленной компоненты  $T_2$ ) и уменьшение населенности этой фазы протонов  $p_2$  следуют за снижением оводненности тканей и органелл в закаленных растениях озимой пшеницы [35]. Поэтому частичное обезвоживание объектов, означающее уменьшение общего числа релаксирующих протонов воды, может приводить к уменьшению  $T_{2(2)}$ . Дополнительный вклад также может быть внесен за счет падения доли свободной воды (повышения ВС) и трансляционной подвижности ее протонов [35]. Что касается выяснения механизма уменьшения сигнала быстрой компоненты  $T_{2(1)}$  времени спин-спиновой релаксации, то в этом случае, по-видимому, доминирующее влияние оказывает изменение состояния клеточных структур, прежде всего замедление подвижности полипептидных цепей белковых молекул и снижение на их поверхности протонного обмена в результате усиления связывания воды с макромолекулами, то есть стабилизации процесса гидратации. Последнее согласуется с экспериментами, в которых методом ИК-спектроскопии показано уменьшение дискретности хода кривых сорбции воды лиофильно сухими препаратами митохондрий, содержащими 50–60% белков и полученными из закаленных растений, по сравнению с препаратами органелл из незакаленных растений [36].

Вышеизложенное заставляет еще раз обратить внимание на то, что укорочение времен релаксации в закаленных низкими температурами растительных

объектах имеет многофакторную природу, обусловленную снижением их оводненности и в большей мере – стабилизацией молекулярного состояния внутриклеточной воды, отражающейся в замедлении трансляционной подвижности ее молекул и усилении взаимодействий с макромолекулами белков.

Заключение, сделанное в работе [33] об усилении транспорта воды через плазмалемму на основании нескоррелированных изменений  $D_{эфф}$  и  $T_1$  (обе величины снижались) под влиянием закаливающих температур в тканях озимой пшеницы, противоречит общеизвестной и широко принятой точке зрения, согласно которой именно снижение, а не увеличение проницаемости протоплазмы для воды является одним из ключевых механизмов развития низкотемпературного стресса и морозоустойчивости озимых злаков [37]. Поскольку величина  $D_{эфф}$  является показателем суммарного межклеточного транспорта воды (через плазмалемму и плазмодесмы), то индуцированное низкими температурами ее уменьшение в работе [33] и наших опытах [35], скорее всего, указывает на торможение суммарного межклеточного водного транспорта, включая и замедление переноса воды через мембраны. При этом наиболее вероятным механизмом, ограничивающим водопроницаемость мембран в закаленных к холоду клетках, является «липидизация» мембран, обусловленная дополнительным образованием малопроницаемых для воды липидных зон. О последнем свидетельствуют результаты наших опытов по снижению соотношения белок/фосфолипиды как в целых тканях, так и в изолированных из них митохондриях закаленных растений вследствие накопления в мембранах фосфолипидов при одновременном снижении содержания белков [35, 38]. «Липидизация» мембран, означающая усиление их барьерных свойств, рассматривается нами как основа происходящей при низкотемпературном закаливании растений стабилизации всей мембранной системы клеток. Известно, что чувствительным индикатором проницаемости клеточных мембран является экзоосмос из тканей электролитров. Как показали наши эксперименты, закаливающие температуры вызывали уменьшение электропроводности водных экстрактов растительных тканей озимой пшеницы, указывающее на снижение общей проницаемости мембран [35]. Замедление же диффузионной проницаемости мембран, констатируемое нами по снижению величины  $D_{эфф}$ , является одной из сторон общего стабилизирующего мембраны механизма, обусловленного накоплением в мембранах фосфолипидов у адаптированных к низким температурам растений.

Таким образом, ограничение диффузионного транспорта воды через мембраны наряду с повышением стабильности молекулярного состояния внутриклеточной воды следует отнести к важным составляющим сложного комплекса процессов, способствующих возрастанию водоудерживающей способности клеток во время осеннего закаливания. Такой механизм регуляции внутриклеточного водообмена имеет адаптационное значение, предотвращая пороговое обезвоживание клеток внеклеточным льдом при действии на озимые злаки морозов.

Состояние и транспорт воды мы изучали также в условиях искусственного повышения адаптивного потенциала растений, обрабатывая их новым регулятором роста – картолином, который представляет собой антистрессовый препарат цитокининового типа действия, повышающий устойчивость растений

к различным неблагоприятным факторам среды – засухе, высокой и низкой температуре, некоторым патогенным грибам [39]. Согласно полученным данным картолин ускоряет процессы роста и регенерации растений после промораживания, способствует накоплению биомассы, что положительно сказывается на морозоустойчивости, которая возрастает у обработанных картолином растений на 20–60% в зависимости от способа обработки (выращивание растений на растворе картолина или предпосевная инкрустация семян) [35]. Под влиянием картолина происходили определенные изменения в водообмене растительных клеток – достоверное снижение количества легкоотнимаемой (свободной) воды, повышение ВС и уменьшение  $D_{эфф}$ . И в этом случае, как и при закаливании, возрастанию ВС соответствовало падение величины  $D_{эфф}$ , то есть снижение скорости диффузионного переноса воды через мембраны. Положительная корреляция этого показателя с вызываемым картолином ростом морозоустойчивости растений свидетельствует о защитном эффекте наблюдаемых изменений.

Имеющиеся экспериментальные данные о структурных и функциональных взаимодействиях кортикального цитоскелета с плазматической мембраной и появление в связи с этим концепции о существовании в клетках мембрано-цитоскелетного комплекса [40, 41] предполагают тесную зависимость водопроницаемости мембран от динамической реорганизации кортикального цитоскелета. Для выяснения такой зависимости мы разработали методический подход, основанный на проведении непосредственно в живых тканях (*in situ*) структурной модификации основных компонентов цитоскелета – микротрубочек (МТ) и микрофиламентов (МФ) путем введения в интактные растительные ткани разных органов (листьев, корней, колеоптилей) ингибиторов или стабилизаторов полимеризации тубулиновых белков и последующей регистрации целого комплекса ключевых структурно-метаболических параметров, в том числе физиологических и биофизических показателей водного обмена – ВС,  $T_2$ ,  $D_{эфф}$  [42]. О величине ВС судили по содержанию воды, оставшейся в тканях листьев и корней после инкубации их в течение 1.5–2 ч в гипертоническом 20%-ном растворе ПЭГ-6000 с осмотическим потенциалом, равным  $-0.65$  МПа [43, 44]. В своих многократно повторяемых опытах мы постоянно наблюдали один и тот же эффект. Действие на растения специфических антицитоскелетных агентов – оризалина, колхицина, цитохалазина Б, являющихся деструкторами тубулинового и актинового цитоскелета, приводило к усилению выхода воды из тканей и, соответственно, к снижению ВС [43, 45]. Этот эффект ингибиторов на ВС может зависеть от двух причин. Одна из них – происходящее вследствие дезорганизации цитоскелетной сети изменение состояния клеточной воды (повышение водного потенциала), вызванное дегидратационными процессами как филаментов цитоскелета (МТ и МФ), создающих в цитоплазме вследствие своей сильной разветвленности большую гидрофильную поверхность [46], так и связанных с ними других клеточных структур. Другой, не менее важной причиной уменьшения ВС при действии деструкторов цитоскелета может быть усиление водопроницаемости мембран, о чем свидетельствуют снижение времен спин-спиновой релаксации ( $T_2$ ) и увеличение эффективного коэффициента самодиффузии воды ( $D_{эфф}$ ) [47, 48], которые, как отмечалось выше, являются показателями трансмембранного переноса воды [22]. Усиление

транспорта воды через мембраны и, прежде всего, их осмотической проницаемости, может быть обусловлено структурной и функциональной реорганизацией (числа и проводимости) аквапориновых водных каналов из-за нарушения цитоскелет-мембранных контактов и/или везикулярного транспорта аквапоринов и процессов их эндоцитоза. Возможность такого нарушения вследствие деструкции кортикальных МТ, наблюдаемой нами иммуноцитохимически в клетках озимой пшеницы [49], является вполне вероятной. Так, показано участие МТ и МФ в передвижении по клетке везикул, содержащих аквапориновые белки (AQPs), и во встраивании их в плазмалемму [50]. Кроме того, в колхицин-обработанных клетках в результате разборки МТ блокируется эндоцитоз, что сопровождается субклеточным перераспределением аквапоринов [51] и, соответственно, изменением осмотической проницаемости мембран.

Правильность нашей интерпретации относительно цитоскелет-зависимых изменений релаксационных (снижение  $T_2$ ) и диффузионных (увеличение  $D_{эфф}$ ) характеристик, указывающих на повышение водного мембранного транспорта, была подтверждена экспериментально. Для выяснения вклада цитоскелета в осмотическую водную проницаемость плазмалеммы в качестве информативной физиологической модели нами были использованы изолированные протопласты корней кукурузы *Black Mexican Sweet* [52]. Измерения коэффициента осмотической проницаемости ( $P_f$ ) протопластов проводили на оригинальной автоматизированной системе, позволяющей регистрировать набухание или сжатие протопластов в гипо- или гиперосмотической среде во времени, связанное с поступлением или выходом воды, соответственно, из окружающей среды. Индуцированная цитохалазином Д деполимеризация актина, так же, как деструктивное действие холодового шока (3 °С, 3–8 ч) на протопласты, приводили к устойчивому повышению  $P_f$  и более высоким значениям этого показателя, чем в контроле. Следовательно, установленная в опытах корреляция между укорочением  $T_2$  и увеличением  $D_{эфф}$ , с одной стороны, и повышением коэффициента осмотической проницаемости ( $P_f$ ), с другой, позволяет однозначно считать, что обнаруженные нескоррелированные изменения  $T_2$  и  $D_{эфф}$  обусловлены усилением осмотического транспорта воды через плазмалемму. Тот факт, что в этих же экспериментах ингибитор активности AQPs – флоретин – достоверно снижал  $P_f$  протопластов, обработанных антицитоскелетными агентами, указывает на функциональную связь аквапоринов с цитоскелетом. По нашему мнению, цитоскелетный контроль осмотической водопроницаемости клеток опосредуется через изменение активности AQPs и/или транспорта AQPs-содержащих везикул в плазматическую мембрану [52].

### **Изучение разных путей межклеточного транспорта воды по данным неэкспоненциального спада диффузионного затухания сигнала спинового эха**

В дальнейшем наши исследования были сосредоточены на изучении разных путей межклеточного транспорта воды на основании регистрации процессов ограниченной диффузии молекул воды ( $D_{эфф}$ ). В настоящее время межклеточному транспорту воды в растениях придается исключительно важное значение в связи с его участием в организации сложной сети межклеточных комму-

никаций, включая передачу различных сигналов через предполагаемые синапсоподобные контакты [53].

Известны три основных направления переноса воды в растениях: по апопласту – свободному пространству клеточных стенок и межклетникам; по симпласту, включающему протопласты соседних клеток, объединенных плазмодесмами в единую систему; по трансмембранному пути – из клетки в клетку через плазматическую мембрану. Второй и третий путь относятся к межклеточному транспорту воды. Плазмодесмы, выстланные плазматической мембраной, содержат центральный элемент – десмотрубочку, образованную мембраной эндоплазматического ретикулума [54], способную переходить в другие эндомембраны, что обеспечивает единое мембранное пространство растительной ткани с помощью непрерывной эндоплазматической сети – эндопласта [55]. В работе аспиранта нашей кафедры О.В. Волобуевой [56] в тканях корней озимой пшеницы был обнаружен неэкспоненциальный спад амплитуды диффузионного затухания протонного спинового эха при фиксированном времени наблюдения (100 мс) диффузии. С помощью компьютерного анализа было проведено достоверное разделение мультикомпонентного эха на три экспоненты со своими коэффициентами самодиффузии (КСД) молекул воды –  $D_1$ ,  $D_2$  и  $D_3$ . Была объяснена природа КСД и проведено их соотнесение к определенным фракциям воды в корне [57–59]. При этом Г.А. Великанов с сотрудниками [58, 59] придерживались гипотезы о существовании в растениях вакуолярного симпласта, предполагая присутствие в растительной ткани не только цитоплазматического симпласта, но еще одного надклеточного континуума – вакуолярного симпласта, образованного вакуолями соседних клеток с участием десмотрубочек. По этой гипотезе в плазмодесмах растительных тканей существуют два транспортных канала – цитоплазматический и вакуолярный, соединяющие в единые надклеточные континуумы, соответственно, цитоплазматические и вакуолярные (эндоплазматические) компартменты соседних клеток. Эти результаты ЯМР-исследований можно рассматривать как первые косвенные доказательства присутствия в плазмодесмах двух транспортных каналов [57–61]. Применение парамагнитного допинга и селективных методик также позволило получить другим авторам [62, 63] информацию о трансляционной диффузии воды по апопласту, цитоплазматическому и вакуолярному симпластам растений.

С учетом сказанного было проведено следующее соотнесение трех КСД неэкспоненциального диффузионного затухания спинового эха:  $D_3$  – КСД быстрого компонента ДЗ характеризует диффузию молекул воды по вакуолярному симпласту, а также по апопласту;  $D_2$  – КСД промежуточного компонента ДЗ характеризует диффузию молекул воды по цитоплазматическому симпласту;  $D_1$  – КСД медленного компонента ДЗ характеризует диффузию гидратной (связанной) воды и, возможно, воды, заключенной в мембранах и малых объемах (везикулах, надмолекулярных комплексах и микротельцах) [56, 58, 59]. На основе такой интерпретации природы КСД в цитируемых работах были выяснены механизмы регуляции межклеточного транспорта воды в корнях трех сортов озимой пшеницы в условиях последовательного водного стресса разной силы – слабого, среднего и сильного и структурной модификации цитоскелета под влиянием ингибиторов МТ и МФ – колхицина и цитохалазина Б. Показано, что

и в этом случае межклеточный перенос воды, судя по изменению  $T_2$  и  $D_{эфф}$ , находится под контролем структурной целостности цитоскелета. Направленность и степень проявления этой зависимости генотипически детерминированы и определяются уровнем обезвоживания тканей [56]. Так, при последствии умеренного обезвоживания в корнях устойчивых сортов диффузионные потоки воды увеличиваются по цитоплазматическому симпласту (рост  $D_2$ ) и уменьшаются – по вакуолярному (снижение  $D_3$ ). Повышение водопроводимости цитоплазматического симпласта можно отнести к адаптивной реакции, обеспечивающей поддержание межклеточного водообмена после перенесенного умеренного обезвоживания. У малоустойчивого сорта происходило параллельное возрастание  $D_2$  и  $D_3$  при переходе от нормы к среднему стрессу, что, вероятно, указывает на отсутствие перераспределения потоков воды по различным симпластам. После сильного обезвоживания установлено генотипически обусловленное усиление межклеточных контактов по цитоплазматическому континууму в связи с повышением уровня устойчивости растений. В этих условиях наряду с продолжающимся еще большим усилением водопроводимости цитоплазматического симпласта ( $D_2$ ), а также притока воды в апопласт вследствие увеличения проницаемости плазмалеммы происходило почти полное прекращение транспорта воды по вакуолярному пути. В корнях малоустойчивого сорта эти изменения перераспределения потоков воды по разным путям были слабо выраженными или полностью отсутствовали. Эти результаты указывают на компенсаторный механизм регуляции межклеточного транспорта воды на уровне плазмодесм в корнях устойчивых сортов в условиях нарастающего обезвоживания.

Методом иммунофлуоресцентной микроскопии были обнаружены ассоциированные с десмотрубочками плазмодесм белковые частицы, сходные с актином цитоскелета [64]. Этот контрактильный белок локализуется вдоль всей длины плазмодесм и особенно обильно представлен в местах шейных сужений [65]. По мнению авторов, эти АТФ-зависимые актомиозиновые сфинктеры, находящиеся внутри цитоплазматического кольцевого сечения на обоих концах плазмодесм, контролируют диаметр вакуолярной десмотрубочки, то есть являются важным регулятором межклеточных взаимодействий. Для выявления участия АТФ-зависимых актомиозиновых белков в водопроницаемости плазмодесм изучали изменения КСД молекул воды при действии на корни блокатора полимеризации актина – цитохалазина Б – и ингибитора АТФ-азной активности макромолекул миозина – 2,3-бутандион-монооксида [57, 59, 66, 67]. Установлено, что в бесстрессовых условиях (в норме) цитохалазин Б приводил к повышению переноса воды по цитоплазматическому каналу плазмодесм (увеличение  $D_2$ ), по-видимому, вследствие деструкции их актомиозиновых сфинктеров. Предшествующие слабый и сильный стрессы обезвоживания усиливали влияние цитохалазина Б на водопроводимость плазмодесм, что свидетельствует о синергетическом действии данных факторов (обезвоживания и ингибитора), проявившемся в большей мере у устойчивых к морозу сортов в отличие от малоустойчивого сорта. После сильного обезвоживания это действие сохранялось частично, так как ингибитор, блокируя цитоплазматическое русло, вместе с тем усиливал эффект водного стресса, ограничивая потоки воды по вакуолярному симпласту и одновременно повышая приток воды и ее локализацию в апопла-

сте. Интерес представляет и установленный в работе экспериментальный факт о более высокой чувствительности КСД  $D_2$  и  $D_3$  к воздействующим факторам – водному стрессу и цитохалазину Б – у корней более устойчивых растений, чем у корней менее устойчивых. Сравнительный анализ динамики ВС,  $T_2$  и КСД в ходе нарастающего обезвоживания корней разных по морозоустойчивости сортов позволил сделать заключение о том, что осмоадаптивные процессы водообмена в клетках корней являются сортоспецифичными и формируются более эффективно и ускоренными темпами у устойчивых растений. В то же время антицитоскелетный агент – цитохалазин Б, являющийся деструктором актиновых МФ, – оказывает адаптосупрессорное влияние на эти процессы.

Таким образом, результаты, полученные в этой серии опытов, по регистрации методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ИГМП) неэкспоненциального эха при фиксированном времени диффузии и разделении ДЗ на три экспоненты со своими коэффициентами самодиффузии (КСД) молекул воды, соотношенными с диффузионными потоками воды через разные пути межклеточного переноса, являются основой для нового методического подхода к одновременному контролю функционального состояния двух транспортных каналов плазмодесм при отсутствии какого-либо возмущающего воздействия на такое состояние [59].

Вместе с тем для того, чтобы с большей корректностью использовать КСД молекул воды, определяемые при фиксированных временах наблюдения, для характеристики транспортных процессов воды на разные расстояния – в пределах клетки или между клетками, по-видимому, необходима количественная оценка диффузионных перемещений молекул воды, которые происходят в тех или иных ограниченных компартментах.

### **Изучение направления диффузионных потоков воды в клетках растений при стрессе в условиях длительного ЯМР-эксперимента**

При проведении экспериментов в течение последних лет [68] с целью внесения определенных уточнений в объяснение поведения спинового сигнала ЯМР мы исходили из следующей теоретической предпосылки. В сегментах корней, отделенных от целого растения, которые чаще всего служат объектами для изучения ограниченной самодиффузии молекул воды [59, 63], отсутствует характерный для корневой системы целого растения направленный транспорт воды на далекие расстояния вследствие нарушения непрерывной внутренней водной среды растения – поглощения воды и транспирационного тока. В связи с этим в отсеченных отрезках корней КСД молекул воды могут характеризовать, возможно, даже в большей степени процессы ограниченной диффузии воды, определяемые параметрами клеточной структуры как пористой системы.

В то же время отсеченные корни или их сегменты являются удобным объектом для изучения механизмов стрессового состояния живой системы [69]. Отсечение корней как механический стресс по аналогии с другими видами фитостресса включает целый комплекс происходящих в клетках метаболических и физиологических изменений, названных неспецифическим адаптационным синдромом [70]. На первых этапах действия стрессора эти изменения носят прижизненный характер, проявляющийся в адаптивной перестройке структур-

но-функциональных характеристик клеток/тканей и сложнейшей иерархии регуляторных взаимосвязей. При длительном воздействии повреждающего фактора, когда резервные возможности уже исчерпаны, наступает «фаза истощения», сопровождающаяся глубокой деструкцией, необратимым нарушением метаболизма и гибелью клеток. Применительно к отсеченным корням это явление получило название «адаптивного старения», или «переживания» [69], объяснение сущности которого полностью соответствует современной концепции стресса и общим принципам реактивности живой системы [70, 71]. Однако биофизические аспекты длительной стрессовой реакции корней, в частности ее связи с процессами самодиффузии воды, нуждаются в дополнительных исследованиях и уточненной интерпретации.

В связи с этим в серии опытов, которые будут описаны ниже, мы исследовали зависимость процессов самодиффузии молекул воды от времени «адаптивного старения» (названного нами временем жизни) растительных образцов в условиях продолжительного механического стресса [68]. Опыты проводили на отрезках корней длиной 8 мм с отсеченной меристематической зоной (1.5–2 мм) 7-суточных проростков озимой пшеницы. Отрезки корней соответствовали зоне растяжения и началу зоны дифференциации.

Из 60–70 параллельно расположенных сегментов корней формировали упаковку, которую оборачивали тонкой фторопластовой пленкой и помещали в герметично закрывающуюся стеклянную ампулу диаметром 7.5 мм. Образец располагали в датчике диффузометра перпендикулярно вектору импульсного градиента, что обусловило наблюдение процессов самодиффузии в направлении, перпендикулярном продольной оси корня.

Как известно, первичную информацию о самодиффузии в методе ЯМР с ИГМП получают из анализа диффузионного затухания (ДЗ) спинового эха. Диффузионным затуханием называют зависимость логарифма нормализованной амплитуды спинового эха  $M(k^2) = \ln[A(k^2)/A(0)]$  от квадрата волнового вектора  $k^2 = \gamma^2 \delta^2 g^2$  ( $\gamma$  – гиромагнитное отношение протона,  $\delta$  – длительность,  $g$  – амплитуда импульса градиента) и времени диффузии  $t_d$ . ДЗ регистрировали на диффузомере с компьютерным управлением и резонансной частотой 60 МГц на протонах. Максимальная амплитуда импульса градиента составляла  $\approx 30$  Т/м. Измерения проводили импульсной методикой «стимулированное эхо» [32] при временах диффузии 10, 155 и 350 мс. Время регистрации одного ДЗ определялось числом накоплений (от 4 до 6) и составляло  $\sim 25$ –40 мин. Измерения проводили при температуре 23 °С. Погрешность измерения во всех случаях была  $\sim 10\%$ .

На рис. 1 показано ДЗ в исследуемых образцах при  $t_d = 10$  мс. Видно, что ДЗ является неэкспоненциальным. Подобный вид ДЗ имеет также при  $t_d = 155$  и 350 мс. Во всех случаях ДЗ разделялось на три компонента: быстрый с коэффициентом самодиффузии  $D_3$  и населенностью протонов  $p_3$ , промежуточный – с  $D_2$  и  $p_2$  и медленный – с  $D_1$  и  $p_1$ , причем  $D_1 < D_2 < D_3$ . Разделение ДЗ на компоненты производили методом последовательного вычитания на компьютере средствами «ORIGIN 7.5». КСД и населенности компонентов определяли при их аппроксимации линейными функциями. Значение среднего КСД  $D_{cp}$  определяли по наклону касательной к ДЗ при  $k \rightarrow 0$ .

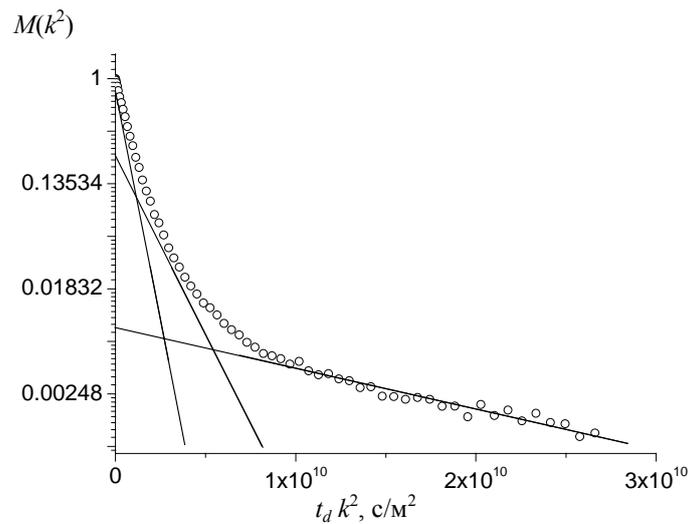


Рис. 1. Диффузионное затухание в сегментах корней при времени диффузии  $t_d = 10$  мс

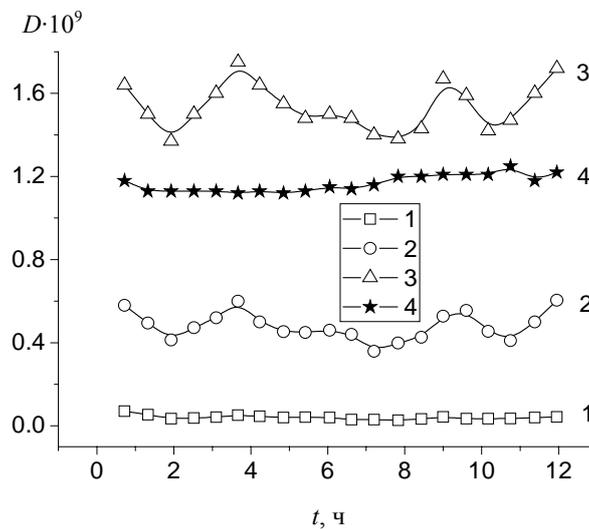


Рис. 2. Зависимости  $D_1$  (1),  $D_2$  (2),  $D_3$  (3) компонентов ДЗ и  $D_{cp}$  (4) от времени жизни образца при времени диффузии  $t_d = 10$  мс

Изучение динамики  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$  компонентов ДЗ и среднего КСД  $D_{cp}$  при времени диффузии  $t_d = 10$  мс в процессе «адаптивного старения» корней показало, что величины  $D_1$  и КСД $_{cp}$  практически не зависят от длительности эксперимента, в то время как  $D_2$  и  $D_3$  испытывают почти периодические изменения (рис. 2). При более длительном времени наблюдения ( $t_d = 155$  мс) зависимости  $D_2(t)$ ,  $p_2(t)$  и  $D_3(t)$  от времени жизни образца имеют экстремальный характер и достигают максимумов по истечении  $\sim 4.5$  ч после начала эксперимента (рис. 3). Кроме того, они более отчетливо выражены и имеют более монотонный характер по сравнению с зависимостью  $D_2$  и  $D_3$  при  $t_d = 10$  мс (рис. 2). Между  $p_3(t)$  и  $p_2(t)$  наблюдается обратная корреляция, о чем свидетельствует почти зеркальный ход

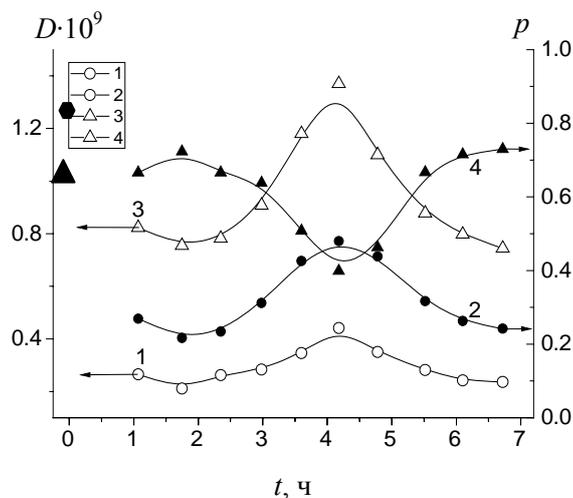


Рис. 3. Зависимости  $D_2$  (1),  $p_2$  (2) и  $D_3$  (3),  $p_3$  (4) от времени жизни образца при времени диффузии  $t_d = 155$  мс; стрелки показывают принадлежность кривых к соответствующим осям ординат

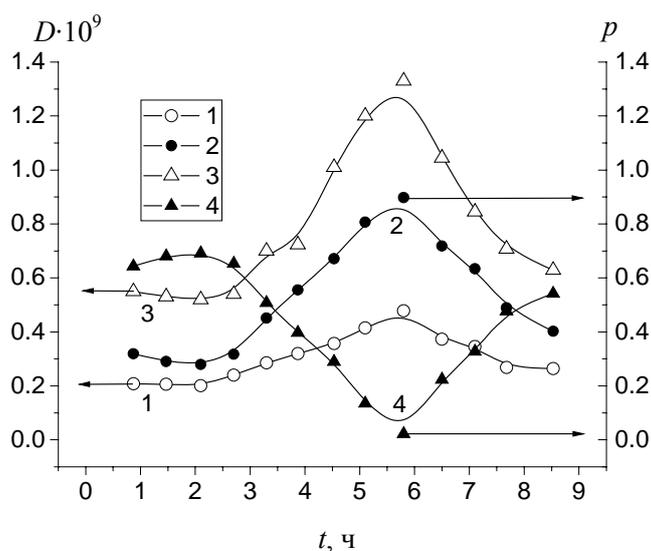


Рис. 4. Зависимости  $D_2$  (1),  $p_2$  (2) и  $D_3$  (3),  $p_3$  (4) от времени жизни образца при времени диффузии  $t_d = 350$  мс

кривых. Во многом сходные результаты получены при измерении этих же параметров при еще большем времени диффузии ( $t_d = 350$  мс). В этом случае изменения параметров промежуточного и быстрого компонентов ( $D_2$ ,  $p_2$ ,  $D_3$ ) происходят также по четко выраженным одновершинным кривым, но с достижением максимумов уже через  $\sim 5.8$  ч от начала измерений (рис 4). Зависимость  $p_3(t)$  также оказалась противоположной  $p_2(t)$ .

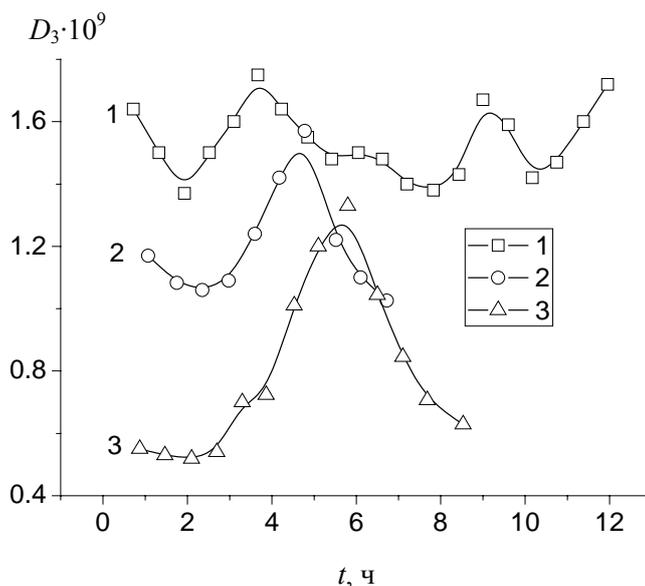


Рис. 5. Зависимости  $D_3$  от времени жизни образца при временах диффузии  $t_d = 10$  (1), 155 (2) и 350 мс (3)

Сравнительный анализ динамики КСД  $D_3$  быстрых компонентов ДЗ при разных временах диффузии (10, 155, 350 мс) показал, что с увеличением  $t_d$  амплитуда максимумов заметно возрастает, кроме того, происходит их закономерный сдвиг в сторону увеличения времени жизни образца (рис. 5). Поэтому возникло предположение о связи этих изменений с ростом среднеквадратичного смещения  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ , которое испытывает молекула воды в направлении градиента за время диффузии. Значение  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  можно оценить, пользуясь уравнением Эйнштейна

$$\langle r^2 \rangle^{1/2} = 2D_s t_d.$$

Оценки показывают, что при  $t_d = 10$  мс величина  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  будет меняться от  $\approx 5.5$  до 5.8 мкм. При времени диффузии  $t_d = 155$  мс значение  $\langle r^2 \rangle^{1/2}$  будет находиться в пределах от  $\approx 19$  до 22 мкм, а при  $t_d = 350$  мс – от  $\approx 19$  до 33 мкм. Это означает, что диффузионные перемещения воды сравнимы с размерами клеток корней, например, ризодермы, коры, эндодермы, паренхимы, центрального цилиндра и др. [72]. Отсюда следует, что измеряемые параметры КСД и населенности быстрого и промежуточного компонентов ДЗ при данных временах диффузии могут характеризовать перенос воды только в пределах клетки. Что касается наблюдаемого смещения максимумов кривых КСД  $D_3$ , то оно, по-видимому, является следствием увеличения зон диффузионного смещения молекул воды, по которым происходит усреднение при измерении. Результаты, представленные на рис. 2–5, свидетельствуют о практически детерминированном изменении трансляционной подвижности молекул воды, начинающемся в клеточном пространстве сегментов корня после их отсечения. Данный процесс следует рассматривать как часть общей реакции клетки на стресс в виде прекращения направленного потока воды и смены водной внешней среды на воздушную.

Известно, что в условиях длительного (в течение нескольких часов) «адаптивного старения» в отсеченных корнях происходят фазные и нередко прямопротивоположные изменения клеточных процессов и структур, которые обуславливают переход корней в разные физиологические состояния, названные фазами реакции, адаптации и гибели [69]. Уникальная регуляторная роль воды в биологических системах и ее влияние на динамическое состояние и функциональные характеристики различных клеточных структур хорошо известны [23]. Очевидно, что указанные изменения, сопровождаясь сменой процессов осморегуляции, гидратации/дегидратации, изменением водопроницаемости мембран и вязкости цитоплазмы, приведут к перераспределению воды между различными «отсеками» клетки и выходу как поверхностной, так и внутриклеточной воды по градиенту водного потенциала через ризодерму корня в пространство ампулы образца. В итоге это скажется на трансляционной подвижности молекул воды в различных областях клетки. Убедительным свидетельством тесной взаимосвязи между трансляционной подвижностью молекул воды и функциональными стрессовыми ответами корней является совпадение положения максимумов диффузионных характеристик ( $D_2$ ,  $D_3$  и  $p_2$ ) в интервале 4.5–6 ч (рис. 4, 5) с экспериментально установленной в [69] наибольшей стимуляцией в клетках отсеченных корней в этом же временном диапазоне целого ряда функциональных систем (дыхания и окислительного фосфорилирования, ионных насосов), а также с гиперполяризацией, восстановлением редокс-цепи и барьерных свойств плазматической мембраны. Следовательно, можно говорить о непосредственном участии диффузионных процессов в функционировании корней при механическом стрессе.

Среди полученных результатов наиболее детального обсуждения заслуживает обнаруженная корреляция между  $D_2$ ,  $p_2$ , с одной стороны, и  $D_3$ ,  $p_3$  – с другой (рис. 2–4). КСД  $D_2$ ,  $D_3$  и населенность  $p_2$  одновременно достигают максимумов, в это же время  $p_3$  имеет минимум. Такое поведение параметров можно объяснить с помощью следующей модели происходящих процессов. Согласно принятому соотношению КСД в быстрый компонент с  $D_3$  ДЗ сегментов корней дают вклад молекулы и апопластной, и вакуолярной воды, а промежуточный компонент  $D_2$  отождествляют с вкладом протонов симпластной цитоплазматической воды [63]. Поскольку в вакуоли находится водный раствор различных органических и неорганических веществ, можно предположить, что КСД ее воды меньше КСД апопластной воды. В то же время, так как объем вакуоли в клетках зоны растяжения корней достигает 80–90% объема клетки [73], вклад протонов воды вакуоли в быстрый компонент ДЗ может быть больше вклада воды апопласта. Данное предположение допустимо, так как в отсеченных сегментах из-за прекращения транспирации и поглощения воды из внешней среды отсутствует градиент гидростатического потенциала. В этих условиях в соответствии с моделью композитного транспорта [74] возрастает роль трансмембранной осмотической составляющей водного переноса. Общеизвестно, что осмотическая водопроницаемость растительных клеток определяется исключительно транспортом воды через аквапориновые водные каналы, локализованные больше всего в вакуолярной мембране (тонопласте – ТПР аквапорины) и меньше всего – в плазматической мембране (плазмалемме – РПР аквапорины) [75].

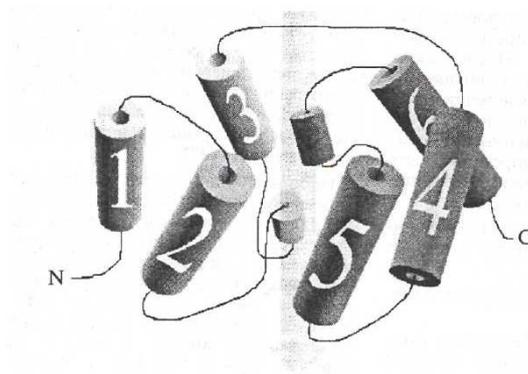


Рис. 6. Схема третичной структуры аквапорина [76]. Трансмембранные  $\alpha$ -спиральные домены пронумерованы. На двух соединительных петлях отмечены короткие  $\alpha$ -спиральные домены

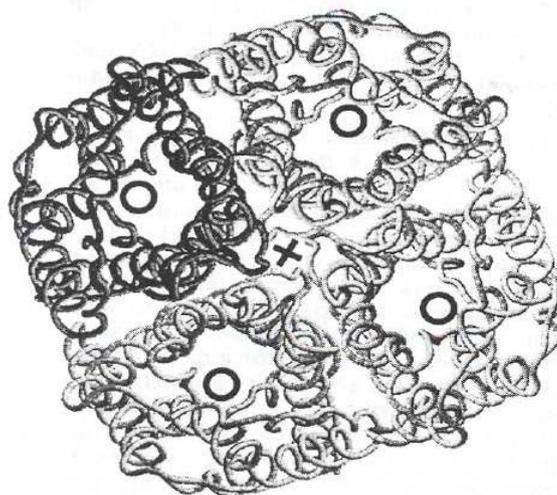


Рис. 7. Схема четвертичной структуры тетрамера Aqr1 [76]. Водные каналы внутри мономеров обозначены черными кольцами, а предположительный участок ионного канала – крестом

Аквапорины – небольшие, гидрофобные трансмембранные белки. Молекула аквапорина состоит из шести пронизывающих мембрану  $\alpha$ -спиральных доменов белка, которые формируют в плоскости мембраны «бочонок» (рис. 6). Непосредственно в формировании водного канала участвуют два коротких  $\alpha$ -спиральных домена, которые расположены напротив друг друга на противоположных сторонах. В мембране аквапорины образуют сложные комплексы – гомотетрамеры [76]. Каждая из четырех субъединиц в составе комплекса формирует независимый водный канал (рис. 7). Эти каналы обеспечивают двунаправленный пассивный перенос молекул воды [76, 77] и проявляют высокую чувствительность к различным стрессовым факторам, в том числе к водному дефициту, действие которого сопровождается возникновением осмотических градиентов между цитоплазмой и вакуолью в результате различного содержания осмолитов [74]. По мнению автора, именно осмотические градиенты контролируют проникно-

вание воды через тонопласт, изменяя обогащенность его аквапоринами и/или активность последних за счет посттрансляционных модификаций (фосфорилирование – дефосфорилирование).

Из рис. 3 и 4 видно, что в первые два часа происходит уменьшение  $D_2$ ,  $p_2$ ,  $D_3$  и повышение  $p_3$ , причем с увеличением времени диффузии этот эффект ослабевает. Возможно, в этом интервале времени в ответ на водный дефицит происходит сжатие протопласта [78] и, как следствие, уменьшение объема вакуоли и повышение в ней осмотического давления. В результате проницаемость тонопласта возрастает, и молекулы воды из цитоплазмы через водные каналы тонопласта диффундируют в вакуоль, что приводит к повышению в цитоплазме концентрации различных веществ и микробарьеров, ограничивающих диффузию воды. Поэтому  $D_2$  и населенность  $p_2$  уменьшаются, а  $p_3$  возрастает.  $D_3$  также уменьшается, так как в вакуоли повышается доля «медленных» молекул воды цитоплазмы, а относительный вклад от протонов «быстрых» молекул воды апопласта уменьшается. Через 3 ч в результате прямопротивоположного изменения осмотического градиента между цитоплазмой и вакуолью происходят обратные процессы. При этом направленность потоков воды через тонопласт и плазмалемму изменяется в сторону цитоплазмы, вследствие чего населенность  $p_3$  (возможно, и объем вакуоли) уменьшается, в то время как  $p_2$  и  $D_2$  цитоплазматической воды растут за счет более подвижных молекул воды вакуоли.  $D_3$  также увеличивается вследствие возможного повышения относительной доли молекул апопластной воды.

Последовательность процессов, лежащих в основе описанной модели, представлена на схеме (рис. 8). При разработке этой модели мы исходили из того, что направленность диффузионных потоков воды из вакуоли в цитоплазму и обратно в процессе длительного действия стресса должна зависеть от осмотических градиентов, создаваемых между цитоплазмой и вакуолью и влияющих на осмотическую водопроницаемость тонопласта и плазмалеммы. Данное предположение согласуется с представлением Стейдл [74], согласно которому при отсутствии градиента гидростатического потенциала, что имеет место в отсеченных от целых растений корнях (при отсутствии транспирации и поглощении воды из внешней среды), возрастает роль осмотической составляющей трансмембранного переноса воды, которая, как известно, зависит в основном от активности аквапориновых водных каналов вакуолярной и плазматической мембран.

Можно полагать, что предложенная модель применима для объяснения механизмов регуляции внутриклеточного водообмена при действии на растения различных стрессовых факторов, а не только механостресса. Физиологическая значимость такой регуляции может заключаться в том, что периодическая смена направления диффузионных потоков воды из цитоплазмы в вакуоль и обратно через аквапориновые водные каналы тонопласта способствует сохранению водного гомеостаза клеток при стрессах и тем самым предотвращает их критическое обезвоживание путем поддержания скоординированных изменений объема и оводненности вакуолярного и цитозольного компартментов. Реальность представленного нами ранее неизвестного механизма регуляции водного гомеостаза растительных клеток вытекает из результатов исследований, полученных на молекулярном уровне наиболее адекватным и современным методом ЯМР с ИГМП.

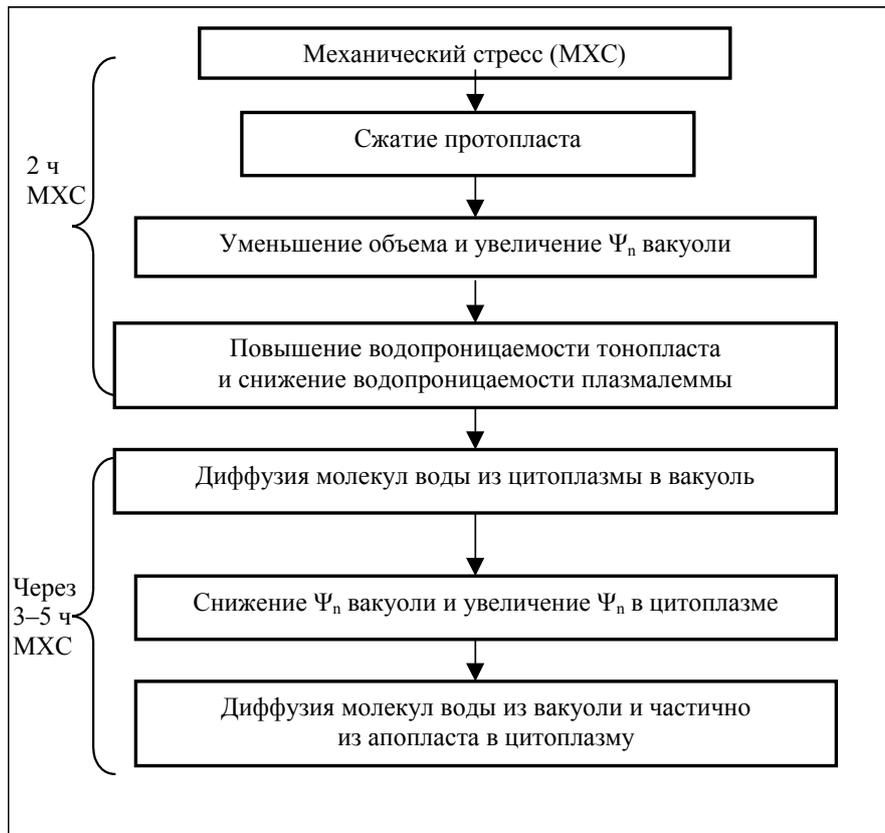


Рис. 8. Схема вероятного направления диффузионных потоков воды в клетках растений при длительном действии механического стресса (МХС):  $\Psi_n$  – осмотический потенциал

Таким образом, в результате проведенных исследований модифицирована техника измерения неэкспоненциального ДЗ спинового эха, коэффициентов самодиффузии и населенностей отдельных компонентов ДЗ в условиях длительного ЯМР-эксперимента и уточнена природа измеряемых характеристик. Предложена модель наиболее вероятного диффузионного переноса молекул воды через аквапориновые водные каналы тонопласта в важнейшие компартменты растительных клеток – цитозоль и вакуоль – при длительном стрессе. Эти результаты могут способствовать более корректному применению в физиологии растений и биофизике импульсного метода ЯМР для изучения водного обмена растений.

### Заключение

Возможности и перспективы применения метода ЯМР с ИГМП для исследования водного обмена растений многие десятилетия привлекают внимание ученых вследствие высокой чувствительности этого метода к движениям на атомно-молекулярном уровне и незначительному возмущающему воздействию на состояние живых систем. Первый этап исследований (60–70-е года XX века) был связан с попытками использовать релаксационные ( $T_1$ ,  $T_2$ ) и диффузионные

параметры (КСД) для оценки состояния внутриклеточной воды. Результаты исследований привели к появлению двух прямо противоположных точек зрения. Согласно первой из них, вода в клетках находится в особом упорядоченном (малоподвижном) состоянии, отличающемся от чистой воды. Вторая точка зрения, учитывая влияние на подвижность воды (величину КСД) в клетке макро- и микробарьеров в форме мембран, надмолекулярных комплексов, везикул и др., отрицала свойственное внутриклеточной воде особое состояние и структуру. С этой точкой зрения трудно согласиться, так как клеточная вода не может сохранить в неизменном виде все свойства чистой воды в такой сложной и гетерогенной системе, каковой является клетка с ее разнообразными взаимодействиями с молекулами других веществ и ионами, где вода выполняет полифункциональную роль, являясь средой, структурообразователем, метаболитом, терморегулятором и т. д. Из многочисленных литературных данных следует, что проблема воды, ее структуры, состояния и уникального функционального значения для клеточной физиологии как растительных, так и животных организмов исключительно актуальна, но в силу существующих методологических и технических трудностей остается нерешенной. Дискуссионность вопроса о состоянии воды в клетках вместе с установлением вклада в механизм магнитной релаксации в биологических системах скорости трансмембранного обмена воды через плазматическую мембрану привели к тому, что начиная с 80-х годов XX века (второй этап) импульсный метод ЯМР больше стал применяться для изучения межклеточного транспорта воды. Был установлен неэкспоненциальный (многокомпонентный) спад ДЗ протонного спинового эха, что позволило с помощью компьютерного анализа осуществить разделение ДЗ на три компонента со своими коэффициентами самодиффузии молекул воды ( $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ). Благодаря различным модификациям техники измерения релаксационных и диффузионных параметров с применением мембранотропных и антицитоскелетных препаратов, парамагнитных зондов и селективных методик было осуществлено соотношение трех КСД с определенными фракциями воды; тем самым были разработаны новые методические подходы к характеристике межклеточного транспорта воды по разным водным путям (каналам) – симпластному (цитоплазматическому и вакуолярному) и трансмембранному. Впервые было показано, что потоки воды по разным путям поддаются регуляции и перераспределению в зависимости от дозы воздействующих факторов (например, нарастающего обезвоживания клеток), проводимости каналов (деструкторов мембран, цитоскелета), уровня фенотипической устойчивости растений к стрессорам и др.

Особую ценность представляют результаты исследований последних лет, полученные на основе длительных ЯМР-измерений растительных образцов в течение многочасовой стрессовой реакции. При анализе ДЗ путем аппроксимации его суммой трех экспонент была обнаружена реакция корней на механический стресс (отделение от целого растения) в виде четко выраженной экстремальной и коррелированной зависимости КСД и населенностей компонентов ДЗ от продолжительности стрессовой реакции. В результате была уточнена природа измеряемых параметров в заданных условиях (при отсутствии в образцах градиента гидростатического потенциала и длительном стрессе) и предложена модель обмена воды между важнейшими компартментами клеток. Эта модель

основана на изменении направления диффузионных потоков воды из цитоплазмы в вакуоль и обратно через аквапориновые водные каналы тонопласта. Физиологический смысл такой внутриклеточной регуляции водного обмена может заключаться в том, что периодическая смена направления диффузии воды способствует сохранению водного гомеостаза клеток при стрессах путем поддержания скоординированных изменений объема и оводненности вакуолярного и цитозольного компартментов и тем самым предотвращает пороговое обезвоживание клеток в стрессовых условиях. Таким образом, из изложенных в статье результатов исследований, полученных почти за полувековой период применения импульсного метода ЯМР в физиологии растений, следует, что проведенные за это время различные модификации техники измерений, более углубленное объяснение природы релаксационных и диффузионных показателей по отношению к растительным объектам имеют значение для более корректного использования метода ЯМР с ИГМП при изучении состояния и транспорта воды в растениях на молекулярном уровне.

Авторы выражают благодарность кандидату физико-математических наук, доценту кафедры радиофизики В.А. Тюрину и доктору физико-математических наук, профессору кафедры молекулярной физики А.И. Маклакову Казанского государственного университета за проведенные в последние годы совместные исследования самодиффузии воды в корнях растений в условиях продолжительного ЯМР-эксперимента.

### Summary

*L.P. Khokhlova, M.A. Bochkareva. Water Exchange of Plants: the Results of NMR-investigations.*

The article presents a historical analytical review (from 1960s up to modern times) of investigations on the application of method with impulse gradient of magnetic field (IGMF) to studying the plant water exchange, which were carried out at Plant Physiology and Biotechnology Department of Kazan State University. The advantages of this method are viewed in comparison with other physical methods. The possibilities are regarded for using relaxational ( $T_1$ ,  $T_2$ ) and diffusive (CSD) parameters for estimating the water state and transport in plant cells and tissues without essential disturbance of their state. It should be taken into account that the heterogeneity and complication of biologic objects stipulate the multi-factor nature of the measured indexes and the necessity of their objective interpretation in combination with physiologic and thermodynamic characteristics of water exchange. The paper describes new methodic approaches to studying intra- and intercellular water transfer by symplast and transmembrane transport ways on the basis of water molecule self-diffusion coefficients determined from the non-exponential drop of diffusive weakening of spin echo signal. The existence in the cells of the earlier unknown mechanism of water homeostasis based on the periodic change of the diffusive water flow direction between cytosole and vacuolar cell compartments is experimentally grounded. This mechanism is examined as a part of the total plant stress reaction, the adaptive importance of which lies in defending the cells from threshold water loss.

**Key words:** plants, water exchange, water state, diffusive transport, impulse NMR method.

## Литература

1. *Попл Дж., Шнейдер В., Бернштейн Г.* Спектры ядерного магнитного резонанса высокого разрешения. – М.: Изд-во иностр. лит., 1962. – 592 с.
2. *Гусев Н.А.* Состояние воды в растении. – М.: Наука, 1974. – 133с.
3. *Аксенов С.И.* Метод ЯМР-релаксации // Новые физические методы в биологических исследованиях. – М.: Наука, 1987. – С. 147–163.
4. *Анисимов А.В., Раткович С.* Транспорт воды в растениях. Исследование импульсным методом ЯМР. – М.: Наука, 1992. – 144 с.
5. *Мазурова Л.* Опыт применения «спинового эхо» для изучения водного режима красного клевера // Вестн. студ. науч. о-ва. Естеств. науки. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1962. – Вып. 2. – С. 8–17.
6. *Сулейманов И.Г.* Структурно-физические свойства протоплазмы и её компонентов в связи с проблемой морозоустойчивости культурных растений. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1964. – 199с.
7. *Гусев Н.А., Самуилов Ф.Д., Пахомова Г.И., Жолкевич В.Д.* Состояние воды в растении // Водный обмен растений. – М.: Наука. 1989. – С. 21–44.
8. *Абдурахманов А.А., Алексеев А.М.* О структурности воды в протоплазме и о влиянии на нее электролитов // Вопросы водообмена культурных растений. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1965. – С. 3–19.
9. *Мальцев Н.А.* О структурной температуре живых тканей // Докл. АН СССР. – 1964. – Т. 156, № 3. – С. 856–859.
10. *Алексеев А.М., Пахомова Г.И.* Подвижность воды в цитоплазме и её значение для процесса транспирации воды листьями // Физиология водообмена и устойчивости растений. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1971. – С. 3–11.
11. *Мальцев Н.А., Мифтахутдинова Ф.Г., Федотов В.Д.* Характеристика состояния воды в живых растительных тканях с помощью импульсного метода ядерного магнитного резонанса // Вопросы водообмена культурных растений. – Казань: Изд-во Казан. ун-та. 1965. – С. 20–28.
12. *Алексеев А.М., Пахомова Г.И.* О связи водного режима с физико-химическими свойствами высокополимерных компонентов протоплазмы // Физиол. растений. – 1965. – Т. 12, Вып. 1. – С. 52–55.
13. *Алексеев А.М.* Водный режим клеток растения в связи с обменом веществ и структурированностью цитоплазмы // Тимирязевские чтения. – М.: Наука, 1969. – Вып. XXVIII. – 35 с.
14. *Абецдарская А.А., Мифтахутдинова Ф.Г., Федотов В.Д.* О состоянии воды в живых тканях (результаты исследований методом ЯМР-спиновое эхо) // Биофизика. – 1968. – Т. 13, № 4. – С. 630–636.
15. *Кузнецова И.Г.* Свойства белкового комплекса митохондрий, активность дыхательных ферментов и водообмен на разных этапах развития: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1979. – 24 с.
16. *Хохлова Л.П., Бондарь И.Г., Елисеева Н.С., Панкратова С.И., Сулейманов И.Г.* Изучение состояния воды в узлах кущения и изолированных из них митохондриях методом ядерного магнитного резонанса // Физиол. растений. – 1977. – Т. 24, Вып. 3. – С. 620–626.
17. *Carr H.J., Purcell E.M.* Effect of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments // Phys. Rev. – 1954. – V. 94, No 3. – P. 630–634.
18. *Meiboom S., Gill D.* Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times // Rev. Sci. Instrum. – 1958. – V. 29, No 8. – P. 688–691.

19. Аксенов С.И., Аскоченская Н.А., Петин Н.С. О фракциях воды в семенах пшеницы // Физиол. растений. – 1969. – Т. 16, Вып. 1. – С. 71–77.
20. Самуилов Ф.Д., Никифоров Е.А., Никифорова В.И. Исследование состояния воды в тканях растений методом ядерного спинового эха // Докл. АН СССР. – 1971. – Т. 196, № 1. – С. 723–726.
21. Мифтахутдинова Ф.Г., Анисимов А.В. Исследование незамерзающей воды растительных тканей методом ЯМР // Физиол. растений. – 1976. – Т. 23, № 4. – С. 799–804.
22. Анисимов А.В., Самуилова И.Ф., Евarestов А.С., Гордон Л.Х. Трансмембранный обменный механизм магнитной релаксации воды в клетках // Докл. АН СССР. – 1983. – Т. 269, № 2. – С. 482–485.
23. Аксёнов С.И. Вода и её роль в регуляции биологических процессов. – М.: Наука, 1990. – 114 с.
24. Cooke K., Kuntz I.D. The properties of water biological systems // Annu. Rev. Biophys. Biolog. – 1974. – V. 3. – P. 95–126.
25. Zimmerman J.R., Brittin W.E. Nuclear magnetic resonance studies in multiple phase systems // Phys. Chem. – 1965. – V. 1, No 9. – P. 1328–1339.
26. Аксенов С.И., Аскоченская Н.А., Петин Н.С. О фракциях воды в семенах пшеницы // Физиол. растений. – 1969. – Т. 16, Вып. 1. – С. 71–77.
27. Аскоченская Н.А., Петин Н.С. Структура воды и ее роль в биологических системах // Усп. соврем. биол. – 1972. – Т. 73, № 2. – С. 288–306.
28. Huggert A., Odeblada E. Proton magnetic resonance studies of some tissues and fluids of the eye // Acta radiol. – 1959. – V. 51, No 5. – P. 385–388.
29. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. – М.: Наука, 1979. – 349 с.
30. Хохлова Л.П., Елисеева Н.С., Ступишина Е.А., Бондарь И.Г., Сулейманов И.Г. Влияние осеннего закаливания на электрофоретические свойства и структуру белков митохондрий озимой пшеницы // Физиол. растений. – 1975. – Т. 22, Вып. 4. – С. 831–837.
31. Анисимов А.В., Евarestов А.С., Самуилова И.Ф., Гусев Н.А. Импульсный метод ЯМР в оценке межклеточного транспорта воды по симпласту // Докл. АН СССР. – 1983. – Т. 271, № 5. – С. 1246–1249.
32. Steiskal E.O., Tanner L. Spin diffusion measurement: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient // J. Chem. Physiol. – 1965. – V. 42, No 1. – P. 288–292.
33. Ионенко И.Ф. Исследование методом ЯМР состояния и транспорта воды в растениях в связи с устойчивостью их к низким температурам: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1983. – 16 с.
34. Gusta L., Fowler D.B., Chen F. et al. A nuclear magnetic resonance study of water in cold-acclimating cereals // Plant Physiol. – 1979. – V. 63, No 4. – P. 627–643.
35. Хохлова Л.П., Елисеева Н.С., Скирда В.Д. Изменение водоудерживающей способности в связи с проницаемостью мембран и состоянием воды в клетках озимых злаков при осеннем закаливании и действии картолина // Зимостойкость сельскохозяйственных растений. – Харьков, 1991. – С. 146–160.
36. Хохлова Л.П., Елисеева Н.С., Ступишина Е.А. и др. Влияние осеннего закаливания на электрофоретические свойства и структуру белков митохондрий озимой пшеницы // Физиол. растений. – 1975. – Т. 22, Вып. 4. – С. 831–837.
37. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс // Тимирязевские чтения. – М.: Наука, 2007. – Вып. XLXIV. – 52 с.

38. Хохлова Л.П. Структурно-функциональное состояние митохондрий в связи с осенним закаливанием растений: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Киев, 1985. – 57 с.
39. Баскаков Ю.А. Новый антистрессовый препарат цитокининового типа действия // Агрехимия. – 1988. – № 4. – С. 103–105.
40. Медведев С.С., Маркова И.В. Цитоскелет и полярность растений // Физиол. растений. – 1998. – Т. 45, Вып. 2. – С. 185–195.
41. Baluška F., Samay J., Wojtaszek P., Volkmann D., Menzel D. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited // Plant Physiol. – 2003. – V. 133. – P. 482–491.
42. Хохлова Л.П. Исторический очерк: становление и развитие физиологии растений в Казанском университете // Материалы Всерос. конф., посв. 75-летию кафедры физиологии и биотехнологии растений Казан. гос. ун-та. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2007. – С. 5–33.
43. Хохлова Л.П., Олиневич О.В., Панкратова О.В. Изменение водоудерживающей способности тканей озимой пшеницы под влиянием структурных модификаторов цитоскелета // Физиол. растений. – 1997. – Т. 44, Вып. 3. – С. 379–384.
44. Хохлова Л.П., Олиневич О.В., Тараканова Н.Ю., Тимофеева О.А. Оризалин-индуцированные изменения водного статуса и цитоскелетные белки проростков озимой пшеницы при закаливании к холоду и действию АБК // Физиол. растений. – 2004. – Т. 51, Вып. 5. – С. 759–772.
45. Хохлова Л.П., Палих Э., Олиневич О.В., Тараканова Н.Ю. Влияние цитохалазина Б и колхицина на водный обмен при холодовом закаливании и разных условиях замораживания-оттаивания // Цитология. – 1997. – Т. 39, № 4–5. – С. 294–304.
46. Clegg J.S. Intracellular water and the cytomatrix: Some methods of study and current views // J. Cell Biol. – 1984. – V. 99, No 1. – P. 167–171.
47. Khokhlova L., Olinevich O., Pahlich E., Tarakanova N., Asafova E., Volovnic I. The effect of tubulin protein modifiers on the water exchange of the non-hardened and cold-hardened plants of winter wheat // J. Acta Agronomica Hungarica. – 1997. – V. 45, No 4. – P. 377–382.
48. Khokhlova L.P., Olinevich O.V., Tarakanova N.Yu., Richkova E.V. Investigations of water transport in different genotypes of winter wheat by the method of NMR: effects of cold acclimation, abscisic acid and oryzalin // Abst. of Intern. conf. "Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport". – Göteborg, 2000. – P. 154.
49. Хохлова Л.П., Олиневич О.В. Реорганизация цитоскелета в клетках *Triticum aestivum* при закаливании растений к холоду и действию абсцизовой кислоты // Физиол. растений. – 2003. – Т. 50, Вып. 4. – С. 528–540.
50. Shmoranzer J., Simon S.M. Role of Microtubules in Fusion of Post-Golgi Vesicles to the Plasma Membrane // Mol. Biol. Cell. – 2003. – V. 14. – P. 1558–1569.
51. Elkjaer M.L., Birn H., Agre P., Christensen E.I., Nielsen S. Effects of microtubule disruption on endocytosis, membrane recycling and polarized distribution of aquaporin-1 and gp. 330 in proximal tubules cells // Eur. J. Cell Biol. – 1995. – V. 67. – P. 57–72.
52. Bochkareva M., Olinevich O., Chepurencova M., Schaumont F., Khokhlova L. The cytoskeleton control of water exchange in plant cell and tissues in normal conditions and after cold hardening and ABA treatment // Abstract Book: The 4th Intern. Conf. on Aquaporins. – Genwal (Brussels), 2005. – P. 91
53. Baluška F., Volkmann D., Menzel D. Plant synapses: actin-based domains for cell-to-cell-communication // Trends in Plant Science. – 2005. – V. 10, No 3. – P. 107–111.

54. *Lazzaro M.D., Thomson W.W.* The Vacuolar-Tubular Continuum in Living Trichomes of Chickpea (*Cicer arietinum*) Provides a Rapid Means of Solute Delivery from Base to Tip // *Protoplasma*. – 1996. – V. 193. – P. 181–190.
55. *Гамалей Ю.В.* Надклеточная организация растений // *Физиол. растений*. – 1997. – Т. 44, Вып. 4. – С. 819–846.
56. *Волобуева О.В.* Влияние ингибиторов белков цитоскелета на водный обмен корней озимой пшеницы при последствии водного стресса: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1999. – 19 с.
57. *Волобуева О.В., Хохлова Л.П., Великанов Г.А., Опанасюк О.А.* Актинрегулируемая водопроницаемость двух транспортных каналов плазмодесм в корнях различающихся по устойчивости сортов озимой пшеницы // *Цитология*. – 2001. – Т. 43, № 5. – С. 477–482.
58. *Великанов Г.А., Волобуева О.В., Хохлова Л.П.* Самодиффузия воды внутри вакуолярного и цитоплазматического симпластов // *Докл. РАН*. – 1999. – Т. 368, № 1. – С. 420–422
59. *Великанов Г.А., Волобуева О.В., Хохлова Л.П.* Изучение водопроницаемости транспортных каналов плазмодесм по данным импульсного метода ЯМР // *Физиол. растений*. – 2001. – Т. 48, Вып. 3. – С. 375–383.
60. *Великанов Г.А., Волобуева О.В., Опанасюк О.А., Хохлова Л.П.* Регуляция водопроницаемости двух транспортных каналов плазмодесм растительных клеток. Исследование импульсным методом ЯМР // *Структура и динамика молекулярных систем*. – М., 2000. – Вып. VII. – С. 126–130.
61. *Великанов Г.А.* Вакуолярный симпласт и методический подход к контролю самодиффузии воды между вакуолями соседних клеток в корне // *Физиол. растений*. – 2007. – Т. 54, Вып. 5. – С. 770–780.
62. *Ионенко И.Ф., Анисимов А.В., Романов А.В.* Влияние водного стресса и хлорида ртути на трансляционную диффузию воды в корнях проростков кукурузы // *Физиол. растений*. – 2003. – Т. 50, Вып. 1. – С. 88–93.
63. *Анисимов А.В., Ионенко И.Ф., Романов А.В.* Метод спин-эхо ЯМР в исследованиях трансляционной диффузии воды селективно по апопласту, цитоплазматическому и вакуолярному симпласту растений // *Биофизика*. – 2004. – Т. 49, Вып. 5. – С. 891–896.
64. *Weite R.G., Badelf K., Overall R.L., Vesik M.* Actin associated with plasmodesmata // *Protoplasma*. – 1994. – V. 180. – P. 169–184.
65. *Radford J.E., White R.G.* Localization of myosin-like protein to Plasmodesmata // *Plant J*. – 1998. – V. 14. – P. 169–184.
66. *Volobuyeva O.V., Khokhlova L.P., Ganyeva G.R., Velikanov G.A.* Influence of inhibitors of cytoskeleton proteins on water exchange of wheat root cells to following water stress // *Cell Biol. Inter.* – 2000. – V. 24, No 6. – P. 383–391.
67. *Volobuyeva O.V., Khokhlova L.P., Velikanov G.A., Opanasyuk O.A.* Genotypically determined actin-regulated water permeability of two plasmodesmatal transport channels // *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*. – N. Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000. – P. 347–356.
68. *Тюрин В.А., Бочкарева М.А., Маклаков А.И., Хохлова Л.П.* Самодиффузия воды в корнях растений при действии стрессового фактора в условиях продолжительного ЯМР-эксперимента // *Электронный журнал «Исследовано в России»*. – 2009. – Т. 104. – С. 1289–1298. – URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2009/104.pdf>.
69. *Пахомова Г.И.* Основные положения современной теории стресса и неспецифического адаптационного синдрома растений // *Цитология*. – 1995. – Т. 37, № 1–2. – С. 66–91.
70. *Браун А.Д., Моженок Т.П.* Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. – Л.: Наука, 1987. – 230 с.

71. *Селье Г.* На уровне целого организма. – М.: Наука, 1972. – 122 с.
72. *Жуковский Т.М.* Ботаника. – М.: Колос, 1982. – 343 с.
73. *Горикова Т.А.* Растительная клеточная стенка как динамичная система. – М.: Наука, 2007. – 428 с.
74. *Steudle E.* Water uptake by plant roots: An integration of views // *Plant Soil*. – 2000. – V. 226. – P. 45–56
75. *Tyerman S.D., Niemietz C.M., Bramley H.* Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles // *Plant, Cell Environ.* – 2002. – V. 25. – P. 173–194.
76. *Шапигузов А.Ю.* Аквапорины: строение, систематика и особенности регуляции // *Физиол. растений*. – 2004. – Т. 51, Вып. 1. – С. 142–152.
77. *Трофимова М.С., Жесткова И.М., Андреев И.М., Свинов М.М., Бобылев Ю.С., Сорокин Е.М.* Осмотическая водная проницаемость вакуолярных и плазматических мембран, изолированных из корней кукурузы // *Физиол. растений*. – 2001. – Т. 48, Вып. 3. – С. 341–348.
78. *Генкель П.А.* Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. – М.: Наука, 1982. – 277 с.

#### Принятые сокращения

- ВС – водоудерживающая способность  
 ДЗ – диффузионное затухание  
 $D_{эфф}$  – эффективный коэффициент самодиффузии воды  
 КСД – коэффициент самодиффузии  
 $D_1$  и  $p_1$  – КСД и населенность медленного компонента ДЗ  
 $D_2$  и  $p_2$  – КСД и населенность промежуточного компонента  
 $D_3$  и  $p_3$  – КСД и населенность быстрого компонента  
 ИГМП – импульсный градиент магнитного поля  
 МТ – микротрубочки  
 МФ – микрофиламенты  
 ПЭГ – полиэтиленгликоль  
 $T_1$  – время спин-решеточной релаксации  
 $T_2$  – время спин-спиновой релаксации  
 ЯМР – ядерный магнитный резонанс  
 AQPс – аквапорины  
 $P_f$  – коэффициент осмотической проницаемости

Поступила в редакцию  
21.04.09

---

**Хохлова Людмила Петровна** – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета.

E-mail: [Ludmila.Khokhlova@ksu.ru](mailto:Ludmila.Khokhlova@ksu.ru)

**Бочкарева Мария Александровна** – аспирант кафедры физиологии и биотехнологии растений Казанского государственного университета.

E-mail: [maria-19\\_08@mail.ru](mailto:maria-19_08@mail.ru)