

УДК 581.121:621.81

ВЛИЯНИЕ СУЛЬФОНАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КАЛИКСАРЕНОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ

*Ю.Н. Валитова, А.И. Хаирова, Л.Х. Гордон, Ю.В. Киселева,
И.С. Рыжкина, С.Е. Соловьева, Л.М. Пилишкина*

Аннотация

Каликсарены – новый класс синтетических макроциклических соединений, обладающих уникальными свойствами. Изучено действие сульфонатного каликсарена на потребление кислорода корнями пшеницы, находящимися в разных физиологических состояниях. Показано, что при добавлении сульфонатного каликсарена к корням в «фазе активации» проявляется его мембранотропный эффект, который, вероятно, обусловлен наличием гидрофобных алкильных цепей, способствующих внедрению каликсарена в мембрану.

Ключевые слова: физиология растений, энергетический обмен, клеточная мембрана, каликсарены.

Введение

В настоящее время получила свое развитие новая междисциплинарная наука – супрамолекулярная химия, предметом изучения которой являются межмолекулярные связи, сформированные в результате ассоциации двух и более химических частиц. Одной из задач, стоящих перед этой наукой, является поиск и изучение молекул, обладающих селективностью. Каликсарены (продукты конденсации фенолов и формальдегидов) имеют гидрофобную ароматическую полость и обладают возможностью модификации «верхнего» и «нижнего» ободов молекулы различными функциональными группами, что открывает широкие возможности использования этих соединений в качестве селективных комплексообразователей, соединений-переносчиков. Каликсарены широко используют как «модели» для исследования более сложных биологических систем, таких как комплексы транспортных белков с металлами, комплексы ферментов с металлами. Одним из производных каликсарена, совмещающих в себе функциональные группы детергента додецил сульфата натрия и корзиноподобную основу каликсарена, является сульфонатный каликсарен. Биохимия пара-сульфонато-каликсаренов очень быстро развивалась в течение последних десяти лет [1]. Применение этих молекул может быть самым различным. Они обладают противовирусной, противотромбной активностью, могут блокировать ферменты и участвовать в комплексообразовании белков. У них многообещающее будущее: показано, что пара-сульфонато-каликсарены могут использоваться в диагностике вирусных болезней. Они нетоксичны, насколько это сейчас известно, по-

этому могут в дальнейшем применяться в изготовлении лекарственных препаратов.

Исследования мембранотропных свойств производных каликсаренов до настоящего времени проводились в основном на модельных мембранах. В этой связи является актуальным изучение физиологического эффекта данных соединений на растительной ткани, в частности исследование энергетического обмена растительных клеток, проницаемость мембран которых модифицирована производными каликсаренов.

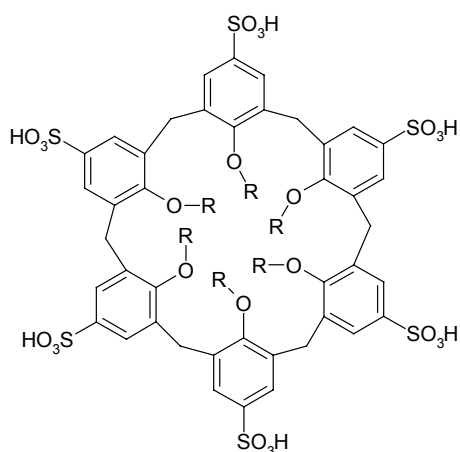
1. Экспериментальная часть

1.1. Объекты, схема и методика исследований. Объектом наших исследований служила яровая пшеница сорта Люба (*Triticum aestivum* L.). Эксперименты проводили с корнями четырехдневных проростков. Определение интенсивности дыхания проводили методом Варбурга. О выделении и поглощении ионов калия корневыми клетками судили по изменению его содержания в инкубационной среде. Измерения проводили на пламенном фотометре ПФМ.

Экспериментальные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием современных компьютерных программ. Биологическая повторяемость опытов трехкратная, аналитическая – двух-трехкратная.

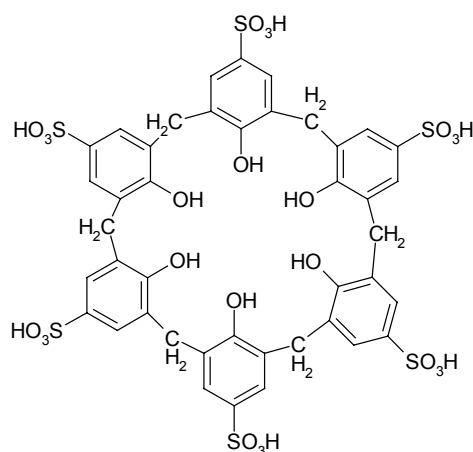
В экспериментах были исследованы следующие вещества:

Сульфонатный каликс[6]арен 10-06



М. в. = 2124

Сульфонатный каликс[6]арен 9-06



М. в. = 1152

Навеску сульфонатного каликс[6]арена 10-06 (5.31 мг) растворяли в 50 мл дистиллированной воды. Концентрация полученного раствора $5 \cdot 10^{-5}$ М. Исходный рН раствора был в пределах 4.0–5.8. В экспериментах рН раствора довели до 6.

Навеску сульфонатного каликс[6]арена 9-06 (2.88 мг) растворяли в 50 мл дистиллированной воды. Концентрация полученного раствора $5 \cdot 10^{-5}$ М. Исходный рН раствора был в пределах 4.1–4.8. В экспериментах рН раствора довели до 6.

1.2. Результаты исследований. Ранее в работах Л.Х. Гордона было показано, что отсеченные корни пшеницы являются хорошей моделью для изучения функционирования сигнальных систем клетки, включения различных программ адаптации и гибели растительных клеток [2]. Исследование адаптивного старения отсеченных корней пятидневных проростков пшеницы показало наличие переходных процессов, соответствующих фазам активации (возбуждения) и состояния относительного покоя (торможения). В фазе активации наблюдается снижение мембранного потенциала, увеличение проницаемости плазмалеммы для ионов калия, усиление образования супероксидного радикала, активация дыхания, увеличение содержания свободных жирных кислот, снижение соотношения стерины/фосфолипиды и насыщенности жирнокислотных остатков фосфолипидов. При переходе в состояние относительного покоя эти процессы изменяются в обратном направлении. В данной работе было изучено влияние сульфонатного каликс[6]арена на интенсивность дыхания корней пшеницы и проницаемость мембраны для ионов калия при разном физиологическом состоянии корней.

При добавлении каликсарена сразу после отсечения корней (фаза активации) и последующем инкубировании в течение 5 ч наблюдалась заметная стимуляция дыхания корней пшеницы (рис. 1). При этом увеличивался выход ионов калия из клеток, а инкубационная среда подщелачивалась (табл. 1). Можно предположить, что происходит подкисление внутриклеточной среды, которое вызывает усиленную работу Н-АТФаз, стремящихся выгнать протоны из клетки. Работа Н-АТФаз требует повышенных затрат энергии, чем и объясняется усиление интенсивности дыхания клетками корней под действием каликсарена.

Далее мы исследовали динамику выхода калия из корней пшеницы при добавлении каликс[6]арена 10-06 сразу после отсечения корней. При этом мы наблюдали усиленный выход калия на всех рассмотренных стадиях инкубации, а также заметное подщелачивание среды (табл. 1).

Затем мы исследовали действие нашего соединения на дыхание при добавлении его через 5 ч инкубации (состояние относительного покоя) (рис. 2). Уровень дыхания корней в присутствии каликсарена был выше контрольного. При этом не наблюдалось увеличения выхода калия из клеток и подщелачивания инкубационной среды (табл. 2), что исследуемому каликсарену не свойственно.

Таким образом, при разных физиологических состояниях корней действие данного каликсарена было различно. При добавлении исследуемого соединения в «фазу активации» клеток корней (сразу после отсечения) наблюдали стимуляцию дыхания и активный выход ионов калия в инкубационную среду. Такой эффект можно объяснить большей лабильностью мембран корней, находящихся в этом физиологическом состоянии, что позволяет каликсарену легче взаимодействовать с мембраной, увеличивая ее проницаемость для ионов. При добавлении каликсарена к корням, находящимся в состоянии «относительного покоя», то есть через 5 ч инкубации, ни увеличения выхода калия из клеток, ни подщелачивания среды не наблюдается. Как известно, к этому времени проницаемость корневых мембран уменьшается, мембраны становятся более «жесткими», что, возможно, затрудняет «внедрение» каликсарена в мембрану.

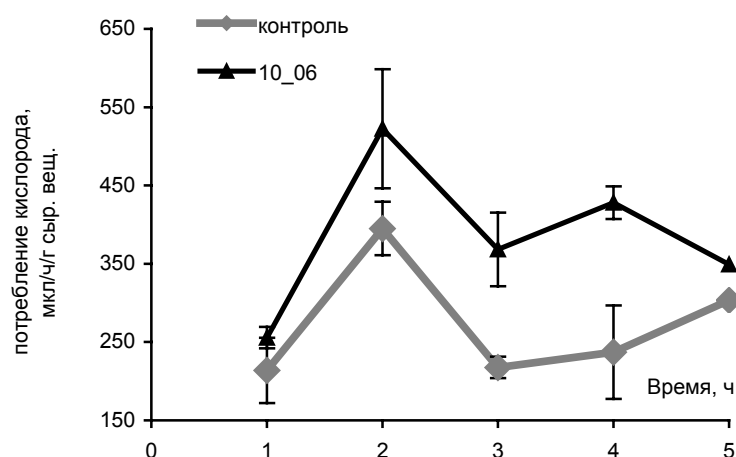


Рис. 1. Динамика потребления кислорода корнями пшеницы под действием каликс[6]-арена 10-06 ($5 \cdot 10^{-5}$ M) в течение 5 ч инкубации

Табл. 1

Динамика выхода калия K^+ (мкэкв/г сыр. вещ.) из корней пшеницы и pH в течение 5 ч инкубации при действии каликс[6]арена 10-06

Варианты	20 мин		1 ч		2 ч		5 ч	
	pH	K^+	pH	K^+	pH	K^+	pH	K^+
Контроль	6.24 ± 0.02	2.93 ± 0.27	6.03 ± 0.14	1.78 ± 0.15	6.05 ± 0.05	2.67 ± 0.8	5.69 ± 0.02	1.83 ± 0.37
	6.34 ± 0.05	2.93 ± 0.27	6.25 ± 0.04	2.84 ± 0.4	6.31 ± 0.01	3.91 ± 0.3	6.08 ± 0.1	3.26 ± 0.6

В таком случае интересен механизм действия каликсарена, выяснение которого и явилось следующим этапом данной работы. Предположительно, исследуемый каликсарен может действовать либо за счет сульфонатных групп, функционализированных на верхнем ободе, либо за счет гидрофобных углеводородных цепей, локализованных на нижнем ободе.

Каликс[6]арен 10-06 примечателен тем, что сочетает в себе свойства детергента и каликсареновой матрицы. Поэтому мы решили сравнить его действие на дыхание корней с действием додецилсульфата натрия (ДСН). Однако ДСН не оказывал видимого эффекта на дыхание. То же самое можно сказать и о выходе калия из клеток: ДСН в данной концентрации никак на этот процесс не влияет. На pH среды действия ДСН также обнаружено не было (табл. 3). Следовательно, действие каликс[6]арена 10-06 на клетки корней пшеницы обусловлено не сульфонатными группами.

Далее мы исследовали действие каликс[6]арена 9-06, который, в отличие каликс[6]арена 10-06, не содержит углеводородных цепей. Оказалось, что каликс[6]арен 9-06 ингибировал дыхание корней. Содержание ионов калия в инкубационной среде в течение 3 ч инкубации при действии каликс[6]арена 9-06 было значительно ниже, чем в контроле, pH инкубационной среды не менялось (табл. 4).

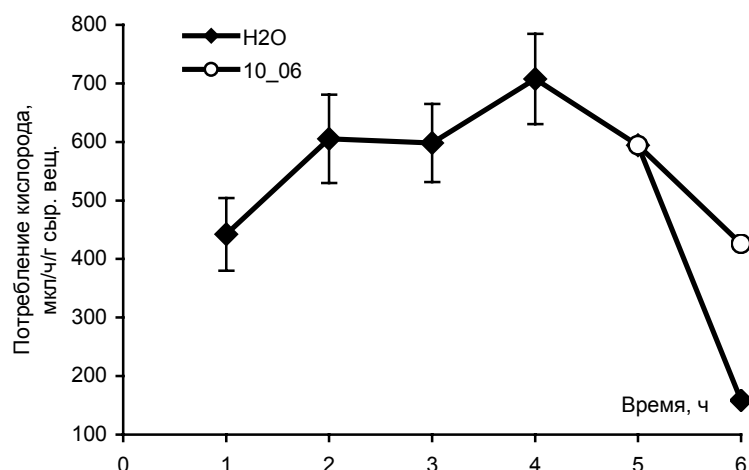


Рис. 2. Динамика потребления кислорода корнями пшеницы под действием каликс[6]-арена 10-06 ($5 \cdot 10^{-5}$ М), добавленного после 5 ч инкубации

Табл. 2.

Содержание ионов калия K^+ (мкэкв/г сыр. вещ.) и рН среды при добавлении каликс[6]арена 10-06 ($5 \cdot 10^{-5}$ М) после 5 ч инкубации

Варианты	K^+	рН
Контроль	2.42 ± 1.26	7.32 ± 0.02
10-06	1.36 ± 0.3	7.27 ± 0.03

Табл. 3

Динамика потребления кислорода корнями пшеницы, содержание ионов калия K^+ (мкэкв/г сыр. вещ.) и рН среды под действием ДСН в течение 5 ч инкубации

Варианты	Потребление кислорода, мкл/ч/г сыр. веса					K^+	рН
	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч		
Контроль	403.24 ± 85.5	594.57 ± 40.6	587.36 ± 120.8	483.48 ± 26.15	301.29 ± 77.6	1.96 ± 0.37	5.69 ± 0.02
ДСН	319.03 ± 65.3	571.69 ± 62.5	601.61 ± 110.2	496.61 ± 104.8	364.48 ± 90	1.99 ± 0.3	5.46 ± 0.08

Табл. 4

Динамика потребления кислорода корнями пшеницы, содержание ионов калия K^+ (мкэкв/г сыр. вещ.) и рН среды под действием каликс[6]арена 9-06 ($5 \cdot 10^{-5}$ М) в течение 3 ч инкубации

Варианты	Потребление кислорода, мкл/ч/г сыр. веса			K^+	рН
	1 ч	2 ч	3 ч		
Контроль	399.32 ± 8.91	473.12 ± 2.23	431.93 ± 26.78	2.39 ± 0.54	5.89 ± 0.06
9-06	335.05 ± 9.52	406.28 ± 23.42	362.34 ± 14.94	0.86 ± 0.15	5.9 ± 0.04

Таким образом, каликс[6]арен 9-06 производит обратный эффект: снижает интенсивность дыхания и препятствует выходу калия из клеток. Возможно, молекулы каликс[6]арена 9-06 связывают ионы калия, удерживая их в полости макроцикла. Следовательно, мы можем предположить, что мембранотропное действие каликс[6]арена 10-06 обусловлено наличием гидрофобных цепей.

3. Выводы

Сульфонатный каликсарен обладает мембранотропным действием при добавлении его к корням, находящимся в «фазе активации», что, возможно, связано с большей лабильностью мембран корней в этом состоянии.

При добавлении данного соединения к корням, находящимся в состоянии «относительного покоя» такого эффекта не наблюдалось, что, возможно, обусловлено увеличением жесткостности мембран корневых клеток, характерным для этого физиологического состояния.

Предполагается, что мембранотропное действие сульфонатного каликсарена обусловлено наличием гидрофобных алкильных цепей, которые способствуют внедрению каликсарена в мембрану.

Summary

Y.N. Valitova, A.I. Hairova, L.H. Gordon. Influence of the Sulfonato-calix[n]arenes on the Physiological Condition of Wheat Roots.

Calixarenes are synthetically available, complex three-dimensional macrocyclic phenols, which are able to form supramolecular aggregates with ions and molecules, simulating the properties of complex biomolecules. In order to determine possible modifying effect of calixarene on the membrane of a living cell, we studied the effect of sulfonato-calix[6]arene derivatives on the energy metabolism (in particular, on the respiratory activity and potassium exchange) in wheat roots being in different physiological conditions. Membranotropic effect was detected after adding sulfonato-calix[6]arene to roots during "period of activation". This calixarene has a hydrophobic alkyl chains that possibly help the sulfonato-calix[6]arene to penetrate the membrane.

Литература

1. *Perret F., Lazar A., Coleman A.W.* Biochemistry of the *para*-sulfonato-calix[n]arenes // Chem. Commun. – 2006. – P. 2425–2438.
2. *Гордон Л.Х.* Функциональная характеристика адаптивного старения отсеченных корней пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. – 1992. – Т. 24, № 2. – С. 128–133.

Поступила в редакцию
27.06.07

Валитова Юлия Наильевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: valitova@mail.knc.ru

Хаирова Альбина Ильдаровна – студент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

Гордон Лев Хаимович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией регуляции клеточного окисления Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН.

E-mail: *gordon@mail.knc.ru*

Киселева Юлия Васильевна – младший научный сотрудник Казанского института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

Рыжкина Ирина Сергеевна – доктор химических наук, доцент, старший научный сотрудник Казанского института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

Соловьева Светлана Евгеньевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Казанского института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.

Пилишкина Лариса Михайловна – кандидат химических наук, научный сотрудник Казанского института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН.