

ЗАЛЕЖНІСТЬ РУХУ ЦИТОПЛАЗМИ ВІД СТАНУ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ ПІД ДІЄЮ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ ТА ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НАДВИСОКОЇ ЧАСТОТИ

Н. В. Тордія, Д. М. Гродзінський

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

Розглядається гіпотеза, згідно з якою зміни швидкості руху цитоплазми рослинної клітини під впливом як іонізуючої радіації, так і неіонізуючого випромінювання надвисокої частоти залежить від проникності клітинних мембран для іонів Ca^{2+} . Експерименти із застосуванням блокатора потенціалзалежних кальцієвих каналів верапамілу дали змогу підтвердити цю гіпотезу.

Вступ

Останніми десятиліттями розвиток цивілізації супроводжується зростанням інтенсивності в поширенні техногенної іонізуючої радіації та електромагнітних полів низької інтенсивності, у зв'язку з чим ще більше загострюється інтерес до сполучення цих чинників та впливу їх на живі організми. Однак дослідження в зазначеній галузі ще не набули систематичного характеру, а деякі аспекти дії електромагнітного випромінювання низької інтенсивності (ЕМВ НВЧ) і не вивчались зовсім. Відсутні відомості щодо впливу ЕМВ НВЧ на диференційовані клітини рослин. Зокрема, не знайшла відповідного освітлення дія ЕМВ НВЧ на функціональний стан клітин за умов дії іонізуючої радіації.

Зручним об'єктом досліджень для вивчення функціонального стану рослинної клітини в умовах радіобіологічного експерименту є клітини вищої водної рослини елодеї (*Elodea canadensis*). У цієї рослини зручно вивчати рух цитоплазми - універсального параметра для будь-яких живих клітин, в якому віддзеркалюються всі зміни їх функціонального стану. Інтегративним показником руху цитоплазми є його швидкість (ШРЦ), яка досліджувалась рядом авторів [1 - 5]. Деякі зі згаданих авторів зверталися до ШРЦ для вивчення різноманітних чинників фізичної та хімічної природи на клітину [3, 5]. Однак показники руху цитоплазми не використовувались для з'ясування механізмів впливу на клітини ЕМВ НВЧ та його комбінованої дії з іонізуючою радіацією. Хоча, на нашу думку, спостереження над циклозом може бути корисним для розкриття процесів, пов'язаних із впливом випромінювання електромагнітної природи на живі організми, з модифікацією радіобіологічних реакцій диференційованих клітин та для розкриття причин їх високої радіостійкості.

Літературні дані свідчать про те, що рух цитоплазми в рослинних клітинах регулюється концентрацією іонів Ca^{2+} . Як відомо, Ca^{2+} -канали в рослинних клітинах було знайдено в плазматичній мембрані, вакуолярних мембранах, ендоплазматичному ретикулумі, клітинних стінках хлоропластів та ядер [6].

Блокатори Ca^{2+} -каналів, у тому числі й верапамілу, інгібіторну дію якого нещодавно було показано на рослинах, можуть виступати як модифікатори механізмів впливу факторів фізичної та хімічної природи на рослинну клітину. Система Ca^{2+} -гомеостазу може реагувати на зовнішні та внутрішньоклітинні сигнали різної природи, що виникають внаслідок дії фізичних, хімічних та біотичних факторів, і через локальні підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів передавати ці сигнали на значні відстані.

Враховуючи суттєву роль системи Ca^{2+} -гомеостазу в сприйнятті зовнішньоклітинних сигналів різноманітної природи рослинними клітинами [7, 8], значення іонів Ca^{2+} для регулювання руху цитоплазми [1, 2, 9], а також розвитку променевого ураження [10, 11] за умови блокування потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів можна припустити, що їх блокування призведе до значних змін у характері руху цитоплазми й дасть відповідь, наскільки ефекти дії іонізуючої радіації та ЕМВ НВЧ пов'язані з порушенням транспорту Ca^{2+} через потенціалзалежні канали.

Метою даної роботи було дослідити стан Ca^{2+} -каналів вищої водної рослини *Eloдея canadensis* під впливом іонізуючої радіації та ЕМВ НВЧ за допомогою блокатора потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів – верапамілу, аналізуючи динаміку інтегративного клітинного показника ШРЦ.

Матеріали та методи

Експерименти проводились на клітинах цілісних листочків вищої водної рослини родини Водокрасових (*Hydrocharitaceae*) - *Eloдея canadensis*. Використовували акваріумну культуру цієї рослини, що вирощувалась за умов денного освітлення при температурі 19 °С на водопровідній воді. Вибір об'єкту був зумовлений особливостями клітинного метаболізму цитоплазми *Eloдея Canadensis* - ротаційним рухом її цитоплазми. Ротаційний рух відносно просто зафіксувати під мікроскопом за допомогою окуляр-мікрометра, секундоміра й отримати кількісні значення, які можна обчислити в стандартних одиницях виміру швидкості [3, 12, 13]. Гарним маркером руху цитоплазми є ротаційний рух хлоропластів, що пересуваються по клітині.

Як контроль використовували культуру, що вирощувалась за тих самих умов, але не опромінювалась. Після відокремлення листочків від пагону їх витримували при температурі 19 °С протягом 30 - 60 хв, що виявилось достатнім для відновлення ротаційного руху цитоплазми. ШРЦ у клітинах листочків *Eloдея canadensis* вимірювали відразу ж після опромінення або будь-якої іншої обробки й далі через кожну годину. Спостереження проводилися в прохідному світлі (мікроскоп NU, об'єктив 63, окуляр 15), швидкість руху хлоропластів розраховували за формулою

$$V = l/t,$$

де V - швидкість руху, мкм/с; l - шлях, пройдений хлоропластом, мкм; t - час, с. Як виявилось, ШРЦ – достатньо варіабельна величина й тому для зручності користувалися відносними одиницями, щоб виключити можливі зміни інтенсивності освітлення та температури протягом проведення експерименту. Відносні одиниці отримували як відношення значення ШРЦ дослідного варіанта до значення відповідного контрольного варіанта.

Опромінення іонізуючою радіацією ізольованих листочків здійснювали на установці “Исследователь” із джерелом радіації ^{60}Co , при потужності дози 0,068 - 0,050 Гр/с, у дозі 25 Гр. Опромінення проводили в умовах вологості камери, щоб виключити можливість підсихання листочків. Як джерело електромагнітних випромінювань використовували генератор високочастотних коливань “Порог”, який забезпечує генерацію імпульсів випромінювання в діапазоні частот 30 - 70 ГГц з частотою повторення 100 Гц, при щільності потоку потужності 10^{-8} Вт/см². Зразки опромінювались з використанням рупорної пірамідальної антени, на відстані 60 мм від її краю. Тривалість опромінення ЕМВ НВЧ становила 30 хв, оскільки з літературних джерел відомо, що прояв ефектів ЕМВ НВЧ не залежить від тривалості опромінення, і згідно з нашими попередніми дослідженнями цього часу цілком достатньо для виникнення зміни ШРЦ у клітині.

Для з'ясування того, чи впливає стан потенціалзалежних Ca^{2+} каналів у клітинах *Eloдея canadensis* на ШРЦ, проводили дослідження за допомогою методу блокування потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів розчином верапамілу (“Sigma”, США). Для цього протягом 15 хв витримували листочки елодеї в розчині верапамілу в концентрації 0,856 мг/мл. Як відомо, верапаміл є блокатором потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів у клітинах тварин [14]. Пізніше в літературі з'явилися дані про його інгібіторні властивості щодо деяких кальційзалежних процесів у рослин [15].

Як контроль використовували неопромінені та необроблені верапамілом препарати, які були ізольовані водночас з дослідними.

Результати досліджень та їх обговорення

На даному етапі розвитку біохімії іони Ca^{2+} розглядають як фундаментальний та універсальний регулятор клітинного метаболізму. Кальцій, завдяки низькій щільності заряду, слабкій гідратованості, здатності утворювати численні комплексні сполуки, може змінювати конформацію макромолекул [7]. Майже всі фізіологічні функції біологічних систем, керуються іонами Ca^{2+} , що діють як внутрішньоклітинний посередник (месенжер), ретранслюючи інформацію всередину клітини. Ca^{2+} -сигнали активізують різні гени, ініціюють поділ клітин, керують їх диференціацією та розвитком [16 - 18]. Нещодавно група вчених [19] виділила два типи міозину з рослин і продемонструвала, що Ca^{2+} при взаємодії з очищеним міозином регулює його рухову активність. Ca^{2+} викликає також полімеризацію та скорочення актинових ниток [20].

Літературні дані свідчать про те, що рух цитоплазми в рослинних клітинах регулюється концентрацією іонів Ca^{2+} [2, 21]. Підвищення рівня Ca^{2+} інгібує рух цитоплазми та органел. Хоча специфічний рушій, який керує цими процесами, ще не ідентифікований, можемо говорити про те, що механізми, якими Ca^{2+} регулює активність цього рушія, уже починають окреслюватись. Автори роботи [22] досліджували ефект Ca^{2+} та інших катіонів на рух хлоропластів в ізольованих краплинах ендоплазми. Після мікроін'єкції Ca^{2+} рух хлоропластів негайно припинявся, але через деякий час відновлювався, що наводить на думку про існування Ca^{2+} -системи в хлоропластах. З рослин арабідопсісу було виділено кальмодулінзв'язуючий моторний допоміжний білок кінезин, причому Ca^{2+} -кальмодуліновий комплекс цього білка з кінезином інгібував здатність мікротрубочок брати участь у процесах внутріклітинного руху [23].

Вивчення інтенсивності руху цитоплазми в клітинах *Elodea canadensis*, що були піддані обробці розчином верапамілу, показало, що перші 60 хв після витримання листочків у розчині спостерігалась повна зупинка руху хлоропластів (рис. 1). Такий ефект можна пояснити нестачею цього регуляторного іона, що вкрай необхідний для забезпечення руху цитоплазми [1, 2, 9]. Рух відновлювався більше ніж через годину після обробки, після перенесення листочків на чисту воду, і на 90-ту хвилину спостерігалось різке підвищення ШРЦ. На 120-ту хвилину після обробки верапамілом рух стабілізується й практично не відрізняється від контролю.

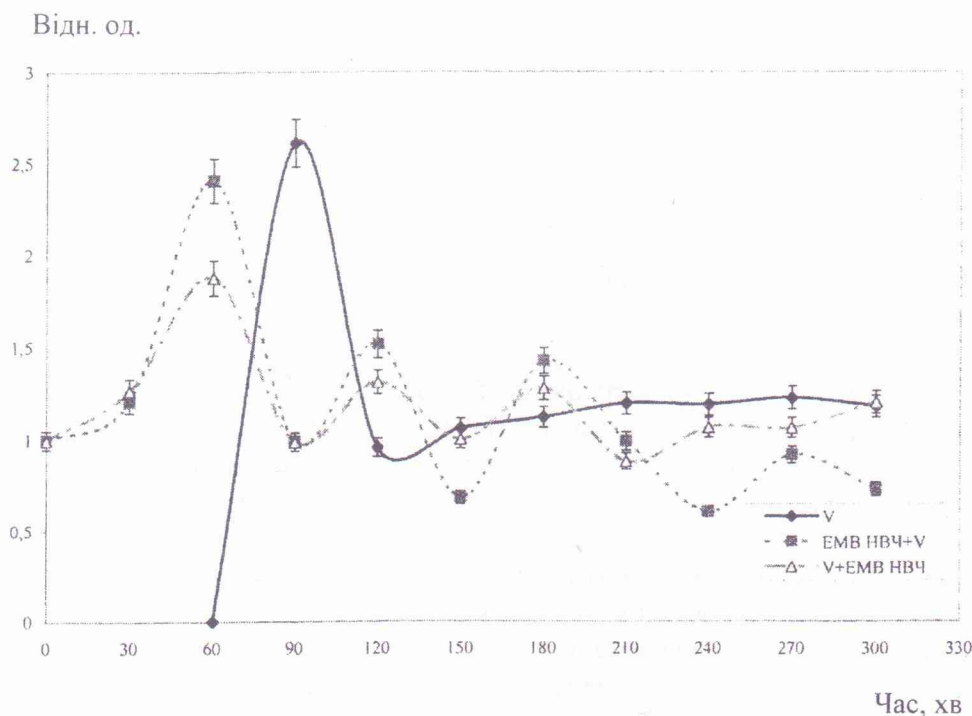


Рис. 1. Динаміка ШРЦ під впливом ЕМВ НВЧ та обробки верапамілом.

Аналізуючи одержані результати, можна припустити, що саме потенціалзалежні Ca^{2+} -канали відіграють провідну роль у надходженні іонів Ca^{2+} в клітини листочків елодеї, оскільки, як було показано, верапаміл є специфічним блокатором саме потенціалзалежних кальцієвих каналів.

Опромінення ЕМВ НВЧ, яке передувало обробці верапамілом, знімало ефект блокування потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів, і ротаційний рух цитоплазми не припинявся. Навпаки, на 60-ту хвилину після опромінення спостерігається підвищення ШРЦ відносно контролю з подальшим зниженням (див. рис. 1). Отже, можна стверджувати, що від моменту комбінованої обробки до опромінення протягом трьох годин відбуваються інтенсивні нелінійні коливання, які поступово затухають. Крива варіанта "V + ЕМВ НВЧ" загалом нагадує обриси кривої варіанта "ЕМВ НВЧ + V".

Рис. 2 демонструє, що комбінований вплив іонізуючої радіації в дозі 25 Гр та верапамілу призводить до загального підвищення ШРЦ з незначними нелінійними коливаннями до 120-ї хвилини при послідовності впливу "25 Гр + V" та симетричної тенденції до зниження до 120-ї хвилини при оберненій послідовності впливу ("V + 25 Гр"). Починаючи приблизно з 120-ї хвилини після комбінованого впливу факторів, ділянки варіантів "25 Гр + V" та "V + 25 Гр" практично не відрізняються одна від одної, спостерігається лише загальне підвищення відносно контролю.

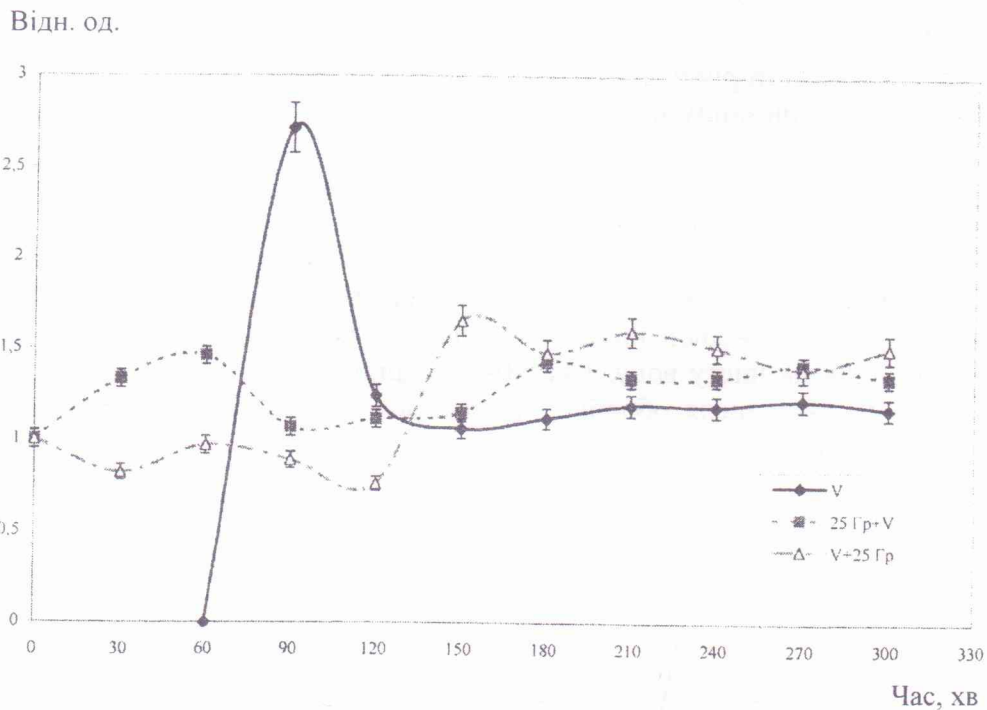


Рис. 2. Динаміка ШРЦ під впливом іонізуючої радіації та обробки верапамілом.

Блокатор кальцієвих каналів верапаміл впливає на ШРЦ та здатний модифікувати реакцію ЕМВ НВЧ та іонізуючої радіації на ШРЦ. При обох послідовностях впливу верапамілу спостерігається поступова стимуляція руху цитоплазми, яка набуває свого піка на 60-ту хвилину після комбінованої дії факторів. Потім відбувається поступове затухання коливального процесу.

Одержані результати можуть мати наступні пояснення. Слід мати на увазі той факт, що в інтегративній відповіді рослинного організму на дію ЕМВ НВЧ, яка відображається у осциляціях ШРЦ, беруть участь різноманітні процеси.

Оскільки зміни проникності реєструються відразу ж після впливу радіації [24], то більш ефективним виявився варіант із попередньо заблокованими Ca^{2+} -каналами.

З літературних джерел відомо, що в мітохондріях можуть накопичуватися катіони Ca^{2+} у вигляді конкрецій фосфатних солей, кількість яких може варіювати залежно від функціонального стану даної клітини та типу диференціювання тканин [25]. Іноді просто необхідно на деякий час вилучити надлишок Ca^{2+} з цитоплазми, що також можуть робити мітохондрії. Після перенасичення гіалоплазми іонами Ca^{2+} відбувається включення системи відкачування іонів Ca^{2+} мітохондріями. Це може призводити до припинення синтезу АТФ (оскільки відбулося переключення мітохондрій на відкачку Ca^{2+}) і, як наслідок, уповільнення руху цитоплазми. Усі ці факти знаходять відбиток у флуктуаціях швидкості руху цитоплазми. Оскільки, як було показано в експериментах, проведених на ліпосомах з включеними комплексами магнійзалежної кальцієвої АТФ-ази, вдалося простежити основні етапи роботи Ca^{2+} -насосів і було доведено, що робота цих молекулярних насосів пов'язана з конформаційними змінами білків, а ЕМВ НВЧ впливає на конформаційний стан білків, ми можемо допустити, що зміни ШРЦ можуть бути пов'язані саме зі зміною проникності мембран під дією ЕМВ НВЧ унаслідок зміни проникності мембран.

Той факт, що після дії верапамілу спостерігається повна зупинка ШРЦ, яка триває більше години, а після комбінованого впливу як ЕМВ НВЧ, так і іонізуючої радіації з верапамілом рух цитоплазми не припиняється і вищезгаданий пік стимуляції ШРЦ зсувається з 90 хв (варіант з верапамілом) на 60 хв (у варіантах комбінованої дії верапамілу та ЕМВ НВЧ або гамма-радіації), свідчить про те, що механізм дії іонізуючої радіації та ЕМВ НВЧ пов'язаний з впливом на потенціалзалежні Ca^{2+} -канали. Можна припустити, що внаслідок змін у білках каналів під впливом ЕМВ НВЧ або внаслідок виникнення акустоелектричних коливань у мембранах їх властивості змінюються і канали стають не сприйнятими до дії верапамілу. Зупинку руху цитоплазми під впливом верапамілу можна пояснити не тільки нестачею Ca^{2+} в клітинах, а й переключенням системи, що забезпечує клітину енергією на відкачування надлишку кальцію. Відомо, що для роботи Ca^{2+} -каналів характерна оберненість роботи: при наявності АТФ вони транспортують іони Ca^{2+} , а при виході останніх з порожнин ендоплазматичного ретикулуму синтезуються молекули АТФ. Можливо, надлишок кальцію й затримка синтезу АТФ унаслідок цього призводить до коливальних стрибків ШРЦ у варіантах комбінованої дії іонізуючої радіації та ЕМВ НВЧ з верапамілом. Після 120-ї хвилини спостереження в клітинах, оброблених верапамілом, відновлюється постійна ШРЦ. У той же час при комбінованій дії систем "ЕМВ НВЧ + верапаміл" та "гамма-радіація + верапаміл" при обох послідовностях впливу немає відмінностей від аналогічних варіантів опромінення без обробки верапамілом. Цей результат може бути пов'язаний із вимиванням верапамілу з цитоплазми клітини.

Таким чином, на основі даних експериментів з використанням верапамілу, можна припустити, що вплив ЕМВ НВЧ та радіаційний вплив у діапазоні відносно невисоких доз можуть впливати на регуляцію функціонування кальцієвих каналів клітин вищої водної рослини *Elodea canadensis*, що позначається на динаміці швидкості руху цитоплазми.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Камія Н. Движение протоплазмы. – М.: Изд-во иностр. лит., 1962. – 306 с.
2. Kamiya N. Physical and chemical basis of cytoplasmic streaming // Ann. Rev. Plant. Physiol. – 1981. – Vol. 32. – P. 205 - 236.
3. Смирнова Н. Н., Сиренко Л. А. Цитофизиологический метод экспресс-оценки токсичности природных вод // Гидробиол. журнал. – 1993. – Т. 29, № 4. – С. 9 - 99.
4. Tordiya N., Grodzinsky D., Danilchenko O. The influence of ionizing irradiation for cytoplasm movement in the *Elodea canadensis* cells // Abstracts of the 29-th Meeting of the European Society for Radiation Biology. – Capri (Italy), 1998. – P. 120.
5. Тордія Н.В., Гродзінський Д.М., Ситнік С.В. Вплив електромагнітного випромінювання низької інтенсивності в діапазоні надвисоких частот на рух цитоплазми диференційованих рослинних клітин // Фізика живого. - 1999. – Т. 7, № 1. – С. 43 - 47.

6. *White P. J.* Calcium channels in higher plants // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2000. – Vol. 1465, No. 1 - 2. – P. 171 - 189.
7. *Білявська Н. О.* Роль іонів кальцію в механізмі гравірецепції у рослин та в ефектах мікрогравітації на клітинному рівні: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. – Київ, 1998. – 32 с.
8. *Дячок Ю. В.* Роль Ca^{2+} як вторинного месенджера в індукції захисних реакцій в культурі клітин *Allium сера L.*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 1995. – 23 с.
9. *Kadota A., Wada M.* Photoinduction of circular F-actin on chloroplast in a tern protonemal cell // *Protoplasma.* – 1989. – Vol. 151. – P. 171 - 174.
10. *Древаль В. И.* Влияние ионизирующего излучения и Ca^{2+} на структуру биологических мембран // *Радиобиология.* – 1993. – Т. 33, № 1. – С.31 - 35.
11. *Шевченко А. С., Габай В. Л., Шевченко Т. С., Алексахин Р. М.* Нарушение проницаемости плазматических мембран для ионов Ca^{2+} при радиационно-индуцированном апоптозе тимоцитов // *Докл. РАН.* – 1997. - Т. 353, № 2. – С. 284 - 286.
12. *Мусієнко М.М.* Фізіологія рослин: Підручник. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 392 с.
13. *Брайон О.В., Чикаленко В.Г., Славний П.С.* Фізіологія рослин: Практикум. – Київ: Вища шк., 1995. – 192 с.
14. *Erdreich A., Rahamimoff H.* The possible involvement of the phospholipid phase of membranes in mediating the effects of verapamil on Ca^{2+} transport // *Biochem. Pharm.* - 1987. – Vol. 36. - P. 1175.
15. *Marme D.* The role of calcium and calmodulin in signal transduction // *Second Messengers in Plant Growth and Development.* /Ed. W.D. Boss, D.J. Morre, A.R. Liss. - New York, 1989. – P. 57 - 80.
16. *Bush D.S.* Calcium regulation in plant cells and its role in signaling // *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* – 1995. – Vol.46. - P. 95 - 122.
17. *Trewavas A. J., Malho R.,* Signal perception and transduction: The origin of the phenotype // *Plant cell.* – 1997. – Vol. 9, No. 7. – P. 1181 - 1195.
18. *Клюшников В.Ю., Асташкин Е.И.* Кальциевый канал управления внутриклеточными процессами как возможная мишень в механизмах сверхчувствительности биологических систем к внешним слабым воздействиям // *Тр. III Междунар. симпоз. «Механизмы действия сверхмалых доз».* - Т. 3 – М., 2002. – С. 228.
19. *Yokota E., Hibara K., Imamichi N. et al.* Possible involvement of protein phosphorylation in the regulation of cytoplasmic organization and streaming in root hair cells as revealed by a protein phosphatase inhibitor, calyculin A // *Protoplasma.* – 2000. – Vol. 211, No.1. – P.245 - 251.
20. *Vacquier V.* The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: calcium ions trigger granule discharge // *Develop. Biol.* – 1975. –Vol. 43, No. 1. – P. 62 –7 4.
21. *Shimmen T., Yokota E.* Physiological and biochemical aspects of cytoplasmic streaming // *In Rev. Cytol.* – 1994. – Vol. 155. - P. 97 - 140
22. *Hayama T., Tazawa M.* Ca^{2+} reversibly inhibits active rotation of chloroplasts in isolated cytoplasmic droplets of *Chara* // *Protoplasma.* – 1980. - Vol. 102. - P. 1 - 9.
23. *Blume Y.B., Smertenko A., Ostapets N.N., Viklicky V.* Post-translation modifications of plant tubulin // *Cell Biol. Intern.* – 1997. – Vol. 21, No. 12, - P. 917 - 920.
24. *Эйдус Л.Х.* Является ли апоптоз “программируемой гибелью клеток” // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 1997. – Т. 37, вып.4. – С. 527 - 532.
25. *Заварзин А.А., Хазарова А.Д.* Основы общей цитологии: Учеб. пособие. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 240 с.

ЗАВИСИМОСТЬ ДВИЖЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ ОТ СОСТОЯНИЯ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СВЕРХВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ

Н. В. Тордия, Д. М. Гродзинский

Рассматривается гипотеза, согласно которой изменения скорости движения цитоплазмы под влиянием как ионизирующей радиации так, и электромагнитного излучения сверхвысокой частоты зависит от проницаемости клеточных мембран для ионов Ca^{2+} . Эксперименты с использованием блокатора потенциалзависимых кальциевых каналов верапамила дали возможность подтвердить эту гипотезу.

DEPENDENS OF CYTOPLASM MOOV FROM Ca^{2+} CHANNELS STATE UNDER THE IONIZING RADIATION AND ELECTROMAGNETIC RADIATION HIGHER FREQUENCY**N. V. Tordiya, D. M. Grodzinsky**

The hypothesis for explanation of the time oscillations of plant cells' cytoplasm moving speed caused by both ionizing radiation and electromagnetic emission of high frequency is suggested. These oscillations are connected with the permeability of the membrane for Ca^{2+} ions. Experiment with using of potentially dependent calcium blocker Verapamil allowed to conform this hypothesis.

Надійшла до редакції 15.09.03,
після доопрацювання – 22.12.03.