

Д. И. СТОМ

ВЛИЯНИЕ НА ЭНДОПЛАЗМУ *NITELLA* ПИРОКАТЕХИНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕСТА ЕГО ПОСТУПЛЕНИЯ В КЛЕТКУ

(Представлено академиком А. И. Опариным 16 V 1974)

Современные представления о физиологической роли нативных фенольных соединений в растении в значительной мере складывались на основе анализа результатов модельных опытов по изучению действия экзогенных фенолов на различные тест-объекты (¹). В противовес постулату, согласно которому о влиянии эндогенных фенолов на растение можно судить по воздействию экзогенных фенолов, было выдвинуто предположение, что опыты с экзогенными фенолами отражают не столько поведение фенолов в нормально вегетирующем растении, сколько их свойства при нарушении проницаемости тонопласта под влиянием экстремальных факторов и выходе фенолов из вакуоли в плазму (², ³). Повышение активности фенолов, по мере их освобождения из вакуоли, обсуждалось также и в других работах (⁴).

С целью экспериментальной проверки двух изложенных точек зрения и была предпринята данная работа. Для решения вопроса сравнивали влияние на клетку *Nitella* sp. растворов полифенола, подаваемых со стороны клеточной стенки (снаружи), и их эффект при введении в вакуолярное пространство (изнутри). Учитывая, что в растениях, в частности у нителлы, основная масса нативных водорастворимых фенольных соединений локализована в вакуолях (⁵), можно ожидать, что в первом случае фенол должен вести себя, скорее, как экзогенное, а во втором — как эндогенное соединение. В качестве модельного фенольного соединения был выбран пирокатехин. Он является простейшим синтетическим полифенолом, наиболее близким к природным фенольным соединениям. В работе использовали методику замены вакуолярного сока испытуемым раствором с одновременным измерением величины движущей силы эндоплазмы и скорости ее течения (⁶). Принцип метода заключается в следующем. Интернодальную клетку нителлы (≈ 4 см), помещенную в установку, предложенную Камия и Тазава (⁶), обрезали с двух концов. Установка смонтирована таким образом, что фрагмент клетки нителлы как бы выполняет роль муфты, осуществляющей контакт растворов, находящихся в камерах, в которые открываются концы клетки. Затем у одного из концов клетки создавали некоторое превышение гидростатического давления. За счет перепада давлений раствор устремлялся внутрь вакуоли и вытеснял ее содержимое, которое постепенно вытекало из другого обрезанного конца клетки. Значение движущей силы находили, определяя величину гидростатического давления, которое необходимо было приложить, чтобы остановить движение эндоплазмы. Критерием повреждающего действия пирокатехина служило прекращение активного движения эндоплазмы. Все опыты выполнены с 30–40-кратной повторностью.

При оценке действия пирокатехина снаружи клетки помещали в 0,07 мл испытуемого раствора. Этот объем соизмерим с объемом раствора, протекающего через вакуоль за время перфузии. Опыты показали, что такой объем раствора пирокатехина при действии снаружи подавляет движение протоплазмы нителлы в концентрации 1 М менее чем за 1 мин.,

0,5 *M* — за 2 мин., $2 \cdot 10^{-2}$ *M* — за 5 мин., 10^{-2} *M* — за 30 мин., а $2,5 \cdot 10^{-3}$ *M* — за 60 мин.

Данные противоположного характера были получены при изучении действия пирокатехина «изнутри». Раствор пирокатехина готовили на изотоническом растворе (0,004 *M* Ca(NO₃)₂, 0,05 *M* NaCl, 0,08 *M* KNO₃) и подавали только после обрезания непосредственно к открытому концу клетки при помощи капилляра.

Опыты показали, что пропускание через вакуолярное пространство растворов пирокатехина в концентрациях $2 \cdot 10^{-3}$ *M*, $4 \cdot 10^{-3}$ *M*, $8 \cdot 10^{-3}$ *M*, $1,6 \cdot 10^{-2}$ *M*, $2 \cdot 10^{-2}$ *M* и даже 1 *M* и выше существенно не влияло на продолжительность сохранения движения эндоплазмы, причем при введении растворов пирокатехина «изнутри», как и в контроле, движение протоплазмы прекращалось только через 1–

Таблица 1
Влияние фенолов и *n*-бензохинона на эндоплазму в целой клетке нителлы и на каплю эндоплазмы *in vitro*

Испытуемое вещество	Концентрация веществ (<i>M</i>) подавляющая через 15 мин движение эндоплазмы в целой клетке (<i>a</i>) и вращение хлоропластов в капле эндоплазмы (<i>б</i>)	
	<i>a</i>	<i>б</i>
<i>n</i> -Бензохинон	$2 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-5}$
Гидрохинон	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-4}$
Пирокатехин	$2 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-4}$
Резорцин	$5 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$
Гваякол	$5 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$

Примечание. Насыщенные растворы ($3 \cdot 10^{-4}$) не останавливали ни движения эндоплазмы, ни вращения диметилового эфира гидрохинона хлоропластов.

1,5 часа за счет уменьшения количества эндоплазмы вследствие ее вытекания. Даже при самых высоких концентрациях растворов пирокатехина не наблюдали уменьшения движущей силы.

Различие в действии пирокатехина «снаружи» и «изнутри» наглядно видно из следующего опыта. Клетку помещали в желобок из парафина. В 5 мм от концов клетки делали перемычки из вазелина. Против одного из концов клетки (А), перпендикулярно ей, помещали вторую клетку (Б) — контрольную. После обрезания обоих концов клетки А создавали избыточное гидростатическое давление раствором пирокатехина на удаленном от клетки Б конце. Наблюдения показали, что 0,5 *M* раствор пирокатехина, прошедший через все вакуолярное пространство клетки А, не теряет своей токсичности и останавливает движение эндоплазмы в клетке Б, причем эндоплазма в клетке А еще продолжает двигаться. Движение эндоплазмы в клетке А при этих условиях превышает в 2–3 раза продолжительность движения эндоплазмы в контрольной клетке Б.

Результаты следующих опытов также свидетельствуют об изменении физиологической активности фенолов в зависимости от места их действия. Сравнивали действие полифенолов на эндоплазму в целой клетке нителлы и на каплю изолированной из нее эндоплазмы, культивируемую *in vitro*. Мерой повреждающего действия испытуемого соединения служила его концентрация, подавляющая вращение хлоропластов в капле эндоплазмы через 15 мин. Каплю эндоплазмы получали по методике, описанной Камия и Курода (?).

Как видно из табл. 1, раствор пирокатехина подавлял движение протоплазмы в междоузлиях нителлы в концентрации на порядок более низкой, чем раствор гидрохинона. Обратное соотношение в токсичности пирокатехина и гидрохинона было получено при испытании действия их растворов на изолированную каплю эндоплазмы нителлы (табл. 1). В этом случае более токсичным оказался гидрохинон. Полученные данные можно объяснить следующим образом. Как было показано нами ранее (?), в междоузлиях нителлы на границе зон клеточная стенка — поверхность кортикального геля обнаруживается наибольшая ортодифенолоксидазная активность. Таким образом, повышенная токсичность пирокатехина по сравнению с гидрохиноном для целой клетки может быть связана с окислением ортоизомера диоксибензола и образованием соответствующего хинона при прохождении пирокатехином внешних слоев протоплазмы, содер-

жащих высокоактивную ортодифенолоксидазу. С другой стороны, в эндоплазме, где отсутствует активная ортодифенолоксидаза, скорость перехода фенола в хинон должна быть выше у гидрохинона, так как параизомеры легче, чем ортоизомеры, подвергаются автоокиссации (⁸). Поэтому гидрохинон при испытании на капле изолированной эндоплазмы оказывается более токсичным соединением, чем пирокатехин. Приведенная трактовка косвенно подтверждается результатами следующих опытов. Если судить о действии испытуемых соединений по их способности подавлять движение эндоплазмы в клетке и вращение хлоропластов в изолированной капле эндоплазмы, то на обоих объектах наибольшую активность из всех испытанных соединений обнаруживал *n*-бензохинон (табл. 1).

В плане зависимости токсичности полифенолов от интенсивности их окисления (⁹) можно рассматривать и низкую активность по отношению к эндоплазме в целой клетке нителлы и ее капле *in vitro* растворов резорцина, диметилового эфира гидрохинона и гваякола (табл. 1). Резорцин значительно труднее, чем *n*- и *o*-диоксibenзол, вовлекается в реакции окисления, и, в отличие от *o*-, *n*-изомеров, отнятие от его молекулы двух атомов водорода не сопровождается образованием хинона.

Этерификация гидроксильных групп резко подавляет способность фенола подвергаться реакциям окисления. Поэтому отсутствие видимого влияния насыщенных растворов диметилового эфира гидрохинона ($\approx 3 \cdot 10^{-4}$ M) в течение 1 часа на движение эндоплазмы в клетке нителлы и хлоропластов в капле эндоплазмы и резкое снижение активности растворов пирокатехина после его метилирования до гваякола хорошо согласуются с положением, согласно которому с падением способности полифенолов окисляться, снижается и их токсичность.

Отсутствием контакта между пирокатехином и ортодифенолоксидазой, обусловленным их пространственным разобщением в клетке, а также трудностью прохождения пирокатехина через тонопласт и протоплазму можно объяснить и пониженную активность растворов пирокатехина при его подаче в вакулярное пространство по сравнению с действием со стороны клеточной стенки.

В заключение следует сказать, что полученные данные находятся в противоречии с мнением об идентичности действия на растительные клетки экзогенных и эндогенных (нативных) фенолов.

Приношу глубокую благодарность В. Я. Кузеванову, Ю. М. Степанову, Н. А. Рогозиной, участвовавшим в выполнении эксперимента, и О. М. Кожовой за постоянное внимание и поддержку в работе.

Биолого-географический
научно-исследовательский институт
при Иркутском государственном университете
им. А. А. Жданова

Поступило
12 V 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Фенольные соединения и их биологические функции, М., 1968; Фенольные соединения и их физиологические свойства, Алма-Ата, 1973. ² Д. И. Стом, В кн. Рост, развитие и устойчивость растений, Тр. III конфер. физиологов и биохимиков растений Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, 1969, стр. 155. ³ Д. И. Стом, Г. Г. Иванова, С. С. Тимофеева, Kurzfassungen der Vorträge Symposium Eutrophierung und Gewässerschutz, Dresden, 1973, p. 134. ⁴ В. И. Кефели, Природные ингибиторы и фотогормоны, М., 1974; Л. В. Меллицкий, О. Л. Озерецковская, Фитоиммунитет, М., 1969. ⁵ Р. П. Тарасова и др., В кн. Вторая конфер. молодых ученых, Иркутск, 1972, стр. 170. ⁶ N. Kamiya, M. Tazawa, Ann. Rep. Biol. Works, Fac. Sci. Osaka Univ., v. 14, 95 (1966). ⁷ N. Kamiya, K. Kuroda, Proc. Japan, v. 4, 33 (1957). ⁸ М. Н. Запорожцев, Биохимия катехинов, М., 1966. ⁹ Д. И. Стом, ДАН, т. 186, № 3, 714 (1969); т. 205, № 4, 989 (1972).