

УДК 581.17:581.1.04

©Коллектив авторов

КОМПЬЮТЕРНАЯ ЦЕЙТРАФЕРНАЯ ВИДЕОСЪЕМКА ФРАКЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ВАКУОЛЕЙ

В.Н. Нурминский, А.М. Корзун, С.В. Розин, Р.К. Салеев

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г.Иркутск
664033, а/я 1243, г. Иркутск, ул. Лермонова-132; факс: (3952)510754,
эл. почта: cell@sifibr.irk.ru

Разработан автоматизированный метод компьютерной цейтраферной видеосъемки фракции изолированных вакуолей. Метод основан на регистрации изменения динамики разрушения вакуолей при действии химических соединений по сравнению с контролем, что позволяет оценить действие соединений на барьерную функцию мембраны. С помощью этого метода проведено тестирование мембранотропной активности химических соединений из классов окислителей-восстановителей, полимеров и стимуляторов роста растений. Установлено, что прооксиданты - пероксид водорода, окисленный глутатион, стимуляторы роста растений - амбиол и фонк, органический растворитель диметилсульфоксид (в высокой концентрации) нарушают барьерную функцию мембраны изолированной вакуоли. Антиоксиданты - дигидрохверцетин и диметилсульфоксид (в низких концентрациях), а также соединения арабиногалактан и бихол повышают стабильность мембраны. Наибольший эффект для стабилизации барьерной функции мембраны проявил дигидрохверцетин - флавоноидный антиоксидант, обладающий липофильными свойствами. На наш взгляд, разработанный метод можно использовать для проведения первичного тестирования многих вновь синтезированных химических соединений на мембранотропность.

Ключевые слова: мембрана изолированной вакуоли, барьерная функция мембраны, цейтраферная видеосъемка, мембранотропность, тестирование химических соединений

ВВЕДЕНИЕ. Многие из естественных и синтетических химических соединений способны при взаимодействии с биологическими мембранами изменять их структурные и функциональные характеристики, т.е. обладают мембранотропными свойствами. Изучение механизмов реакции мембран на химические воздействия необходимо как для понимания принципов функционирования мембранных систем, так и для осуществления направленного поиска новых биологически активных соединений, важных во многих областях практической деятельности.

Интерес к вакуолярной мембране (тонопласту) высших растений, как к модельному объекту при исследованиях мембранотропных эффектов, обусловлен следующими причинами: 1) вакуолярная мембрана может быть достаточно легко получена и доступна для таких исследований в виде фракции изолированных вакуолей или высокоочищенного мембранного препарата [1]; 2) мембрана изолированной вакуоли является "чистой" биологической мембраной; на этом объекте отсутствуют структурные факторы (клеточная стенка, гликокаликс), которые могут влиять на мембранотропное действие веществ; 3) мембрана имеет постоянную ориентацию - цитоплазматической стороной наружу; 4) эта мембрана хорошо изучена в структурном и биохимическом отношении [2-4], исследованы ее основные транспортные системы: системы пассивного транспорта ионов, активного транспорта протонов и метаболитов [5,6].

В настоящее время в мире синтезируется большое количество химических соединений. Причем скорость появления новых соединений значительно превышает возможность получения данных об их действии на биологические мембраны. Существует настоятельная потребность в разработке эффективных подходов и методов тестирования химических веществ на биологическую активность. Для оценки мембранотропной активности новых соединений особый интерес представляет изучение барьерных свойств

биологических мембран, поскольку многие из них могут влиять на мембранную проницаемость и стабильность. Для этой цели нам представляется перспективным использовать оптическую регистрацию процесса разрушения фракции изолированных вакуолей.

МЕТОДИКА. Как известно, цейтраферная (замедленная) регистрация прижизненных процессов, происходящих в биологических микрообъектах, посредством киносъемки позволяет наблюдать в динамике явления недоступные человеческому глазу в обычных условиях [7]. Такая регистрация, на наш взгляд, была бы полезна во многих областях физиологии растений и биотехнологии. Использование современной компьютерной техники, обладающей возможностью записи, хранения и обработки большого количества видеoinформации, способно значительно упростить и расширить эффективность таких исследований. Для увеличения производительности эксперимента важно в одном опыте зарегистрировать изображение не одного, а серии микроскопических образцов. При таком подходе можно варьировать условия эксперимента, осуществлять контроль и различного рода воздействия на образцы, что позволит использовать цейтраферный метод для решения таких задач как испытания влияния физических факторов, действия биологически активных соединений и т.д.

Для решения задачи автоматизации тестирования химических соединений на мембранотропную активность, нами была разработана и создана экспериментальная установка для компьютерной цейтраферной регистрации видеоизображений серии микроскопических образцов, а также программное обеспечение, позволяющее управлять экспериментом и обрабатывать полученные видеоданные.

Общий вид и основные компоненты установки для компьютерной цейтраферной видеосъемки и коллектора микроскопических образцов представлены на рис. 1. Установка (рис. 1а) состоит из инвертированного микроскопа "Биолам П-1" (Россия) (1), закрепленного на столике микроскопа коллектора микроскопических образцов на 12 камер (собственного изготовления) (2), видеокамеры КТП-67 (Россия) (3), установленной на микроскопе через микрофотонасадку МФН-11 (Россия) (4), фиксатора видеокadra на базе приборного интерфейса КАМАК (5), персонального компьютера (процессор Celeron - 600 МГц, RAM - 128 Мб, HDD - 30 Гб) (6).

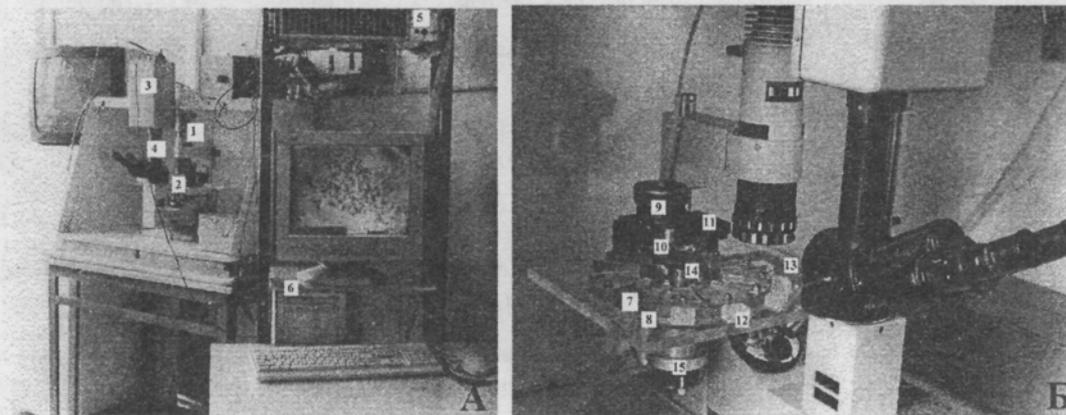


Рисунок 1.

Общий вид установки для компьютерной цейтраферной видеосъемки (А) и коллектор микроскопических объектов (Б). 1 - инвертированный микроскоп, 2 - коллектор микроскопических образцов, 3 - видеокамера, 4 - микрофотонасадка, 5 - фиксатор видеокadra, 6 - персональный компьютер, 7 - верхний диск, 8 - нижний диск, 9 - электродвигатель, 10 - диск привода коллектора, 11 - корпус крепления двигателя, 12 - камера для микроскопических образцов, 13 - винт крепления и регулировки вертикального положения камер, 14 - узел подшипника скольжения, 15 - потенциометр.

Коллектор микроскопических образцов (рис. 1б) состоит из двух дисков коллектора (7,8), выполненных из оргстекла, электродвигателя с редуктором (ДСМ-11-220, 2 об/мин) (9), с закрепленным на валу диском привода коллектора (10), корпуса крепления двигателя (11), 12 камер для микроскопических образцов (12), винтов крепления и регулировки вертикального положения камер (13), узла подшипника скольжения (14), на валу которого закреплены диски коллектора и подвижная система потенциометра (ПЛП) определения

положения коллектора (15). Нижний диск коллектора имеет 12 радиальных разрезов, делящих его на лепестки. На верхнем диске коллектора укреплено 12 выступающих ребер.

Камера для микроскопических образцов (12) представляет собой конструкцию, состоящую из бруска оргстекла с отверстием диаметром 10 мм, наклеенного на край вырезанной половинки стандартного микроскопического предметного стекла. Свободным концом предметного стекла камера вставляется в щель между верхним (7) и нижним (8) дисками коллектора и зажимается винтом (13). Фокусировка изображения осуществляется этим же винтом, вертикальным перемещением камеры, подпружиненной лепестком нижнего диска коллектора. Перемещением (вручную) предметного стекла по горизонтали регулируется положение микроскопического образца в поле зрения микроскопа.

Вращение коллектора осуществляется за счет зацепления ребер верхнего диска коллектора с выступами на диске привода коллектора (10) при работе электродвигателя (9). При попадании заранее заданной области микроскопического образца в поле зрения микроскопа, под действием выступа на диске привода коллектора (10) срабатывает микровыключатель, размыкающий цепь питания электродвигателя (9). Вращение коллектора прекращается. При этом выступ на верхнем диске коллектора (7) жестко фиксируется механической защелкой, что обеспечивает стабильность местоположения образца при многократной прокрутке коллектора.

Блок управления коллектором состоит из схемы определения положения коллектора, схемы управления работой электродвигателя привода коллектора, блока питания (+12 В, +5 В, -12 В) и связан с компьютером через последовательный порт RS-232.

Схема определения положения коллектора содержит мультивибратор на интегральном таймере K1006ВИ1 и формирователь сигнала линии связи на микросхеме K170АП2. В цепь, определяющую частоту выходного сигнала мультивибратора, включен потенциометр ПЛП (15), подвижная система которого закреплена на оси вращения коллектора, в результате чего в компьютер поступает сигнал с частотой, соответствующей номеру камеры микроскопического образца. Схема управления работой электродвигателя содержит усилитель сигнала линии связи (микросхема K170УП2) и буферный усилитель (K155ЛЛ2), нагруженный на электромагнитное реле, через контакты которого подключается электродвигатель привода коллектора.

Фиксатор телевизионного кадра построен на базе приборного интерфейса КАМАК и содержит промышленные модули: быстродействующий аналого-цифровой преобразователь с оперативным запоминающим устройством (Ф4226), счетчик (2×24,111.005), крейтконтроллер (СС83), а так же модуль собственного изготовления с микросхемой строчной развертки телевизионного приема (K174ХА11). Фиксатор оцифровывает черно-белый телевизионный сигнал с разрешением 1024×600 точек по 256 уровням яркости.

Программное обеспечение экспериментальной установки состоит из двух компонент - программы сбора данных и программы обработки.

Программа сбора данных, в соответствии с составленным заранее планом эксперимента, осуществляет управление аппаратной частью установки, отслеживание интервалов времени, прием видеоизображения с фиксатора телевизионного кадра, запись растровых файлов на жесткий диск персонального компьютера. Сбор данных может производиться без вмешательства оператора в течение суток и более.

Программа обработки предоставляет оператору интерфейс для просмотра кадров, выделения круговых областей с целью отметки интересующих оператора микроскопических объектов, подсчета количества выделенных областей и позволяет отслеживать изменение количества объектов в каждом образце в ходе эксперимента. Команды навигации, подаваемые с клавиатуры и манипулятора "мышь", позволяют наблюдать по кадрам динамику состояния образцов с течением времени эксперимента.

Таким образом, экспериментальная установка позволяет регистрировать на протяжении длительного промежутка времени видеоизображения 12-ти микроскопических образцов, а программа обработки данных позволяет наблюдать динамику состояния образцов в течение эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. С помощью компьютерной центрифужной видеосъемки фракции изолированных вакуолей проведено тестирование мембранотропной активности химических соединений из классов окислителей-восстановителей, полимеров и стимуляторов роста растений (таблица).

На рис. 2 показана зависимость относительного количества вакуолей ($N_{\text{отн}}$) от времени инкубации в различных растворах: 1) контрольный раствор (без мембранотропного вещества), 2) с пероксидом водорода (H_2O_2) в концентрации 20 мМ, 3) с

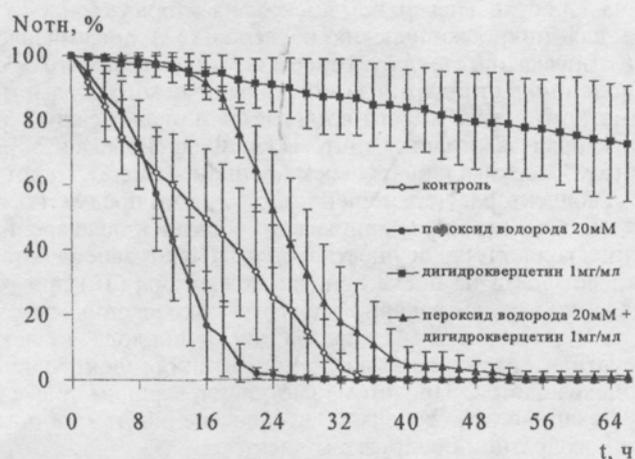


Рисунок 2.
Зависимость относительного количества вакуолей (Notn) от времени инкубации (t) при действии пероксида водорода и дигидрокверцетина.

Таблица. Список соединений, использованных в экспериментах*

№	Вещество	Концентрация	Свойства	Источник
1	Перексид водорода (H ₂ O ₂)	10мМ 20мМ 50мМ	Прооксидант, окисляет метиониновые и цистеиновые остатки, разлагается с образованием гидроксильного радикала	Реахим, Россия
2	Аскорбиновая кислота	10мМ 20мМ	Антиоксидант, взаимодействует с активными формами кислорода и радикалом токоферола	Реахим, Россия
3	L-Глутатион окисленный	20мМ	Прооксидант, инактивирует белки через окисление SH-связей	Sigma, США
4	L-Глутатион восстановленный	20мМ	Трипептид (Glu-Cys-Gly), антиоксидант, предохраняет от окисления SH-связей в белках	Sigma, США
5	Дитиотреитол (ДТТ)	1мМ 10мМ 20мМ	Антиоксидант, восстанавливает S-S-связи	Serva, Германия
6	Диметилсульфоксид (ДМСО)	1мМ, 10мМ, 100мМ	Апротонный органический растворитель, антиоксидант	Реахим, Россия
7	Дигидрокверцетин (ДГК)	0,1мг/мл 1мг/мл 10мг/мл	Флавоноид, антиоксидант, ингибирует процессы ПОЛ	ИХ СО РАН
8	Поливинилпирролидон растворимый (ПВП)	0,1мг/мл 0,5мг/мл 1мг/мл	Полимеры 1-этилпирролидинона-2, адсорбент фенола и хинона	Merck, Германия
9	Арабиногалактан (АГ)	1мг/мл, 10мг/мл	Полисахарид, обладает гепатопротекторным, мембранотропным и иммуностимулирующим свойствами	ИХ СО РАН
10	Сывороточный альбумин бычий (БСА)	1мг/мл	Белок, электростатически взаимодействует с мембранами, адсорбирует фенолы и хиноны, связывает жирные кислоты	Reanal, Венгрия
11	Сывороточный альбумин человеческий (ЧСА)	1мг/мл	- -	Reanal, Венгрия
12	Амбиол (дигидрохлорид 1-метил-4-диметиламинометил-5-гидроксибензимидазола)	0,1мг/мл 0,5мг/мл 1мг/мл	Стимулятор роста растений, предположительно сильный антиоксидант	ИХФ РАН
13	Фонк (фосфат оксиникотиновой кислоты)	1мг/мл 10мг/мл	Стимулятор роста растений, предположительно слабый антиоксидант	- -
14	Бихол	1мг/мл	- -	- -

*Выражаем искреннюю благодарность проф. В.А. Бабкину (ИХ СО РАН, Иркутск) и проф. Е.Б. Бураковой (ИХФ РАН, Москва) за предоставление испытуемых препаратов.

дигидрокверцетином (ДГК) в концентрации 1 мг/мл и 4) вместе с H_2O_2 и ДГК. Подобные эксперименты были проведены со всеми исследуемыми веществами, указанными в таблице.

Из графика на рис. 2 видно, что в контрольном растворе наблюдается постепенный и достаточно быстрый распад вакуолей в суспензии. Очевидно, что при этом происходит изменение барьерной функции мембраны с последующей деструкцией тонопласта. Исходя из того, что стабильность липидного бислоя и клеточной мембраны в целом определяется наличием липидных пор (структурных дефектов в липидном бислое) [8], разрыв тонопласта, прежде всего, является следствием изменений в липидном матриксе мембраны. Причины нарушения целостности липидного бислоя могут быть различны, например, перекисное окисление липидов, гиперактивация катаболических ферментов, изменения в липид-белковых взаимодействиях и др. Эти процессы приводят к образованию стрессовых пор, их последующему расширению и разрыву мембраны. Стрессирование и разрыв мембраны могут быть также вызваны нарушением водно-осмотического равновесия вакуоли, вследствие лизиса крупных молекул внутри вакуоли и повышения осмотической концентрации внутривакуолярного содержимого, что должно привести к поступлению воды в вакуоль, увеличению ее объема и фатальному растяжению мембраны. На графике также отчетливо видно, что естественный ход разрушения вакуолей существенно изменяется в присутствии H_2O_2 и ДГК. В растворе с H_2O_2 распад вакуолей происходил быстрее, а с ДГК - значительно медленнее, чем в контроле. Пероксид водорода сильно нарушал структуру мембраны, вероятно, способствуя формированию и расширению пор в мембране, и она разрушалась за короткое время. Дигидрокверцетин (ДГК), напротив, резко стабилизировал мембраны, сохраняя их барьерную функцию.

Известно, что характерной чертой липидных пор, принципиально отличающей их от известных белковых и пептидных пор, является способность к "самозалечиванию" [8]. По всей видимости, ДГК приводил к залечиванию (затеканию) стрессовых пор напрямую, связываясь с липидным бислоем мембраны, или опосредованно, при замедлении процессов ПОЛ, действуя как антиоксидант [9]. Будучи добавлен к суспензии мембран вместе с H_2O_2 , он оказывал заметное протекторное действие. Как видно из графика, процесс разрушения изолированных вакуолей при добавлении ДГК можно условно разделить на 2 фазы. В первые 14-16 часов инкубации разрушается незначительное количество вакуолей. В этой фазе скорость распада вакуолей в растворах ДГК с H_2O_2 и одного ДГК практически совпадает. Во второй фазе наблюдается более интенсивный распад вакуолей в суспензии, причем динамика распада в этой фазе подобна динамике распада в растворе с H_2O_2 . При добавлении одного дигидрокверцетина характер кривой распада радикально меняется. Как видно из рис. 2, она становится весьма пологой и даже через 64 часа, когда во всех предыдущих вариантах все вакуоли разрушились, в варианте с ДГК остаются целыми почти 80% вакуолей. По результатам экспериментов получены значения периода полураспада изолированных вакуолей $T_{1/2}$ (времени, в течение которого в регистрируемом образце разрушаются 50% вакуолей).

Метод тестирования мембранотропной активности химических соединений с помощью компьютерной цейтраферной видеосъемки позволил разделить исследованные вещества по характеру действия (и в зависимости от концентрации) на три группы (рис. 3): стабилизирующие (столбцы 13-17), дестабилизирующие (столбцы 2-6) и не оказывающие заметного влияния на стабильность вакуолярных мембран (столбцы 7-12).

В наших экспериментах разрушению мембраны способствовали H_2O_2 , ДМСО в высоких концентрациях, амбиол, фонк, окисленный глутатион. Механизм действия указанных веществ, как мы предполагаем, основан на стрессовой дестабилизации липидного матрикса мембраны и связан с процессами перекисного окисления липидов (ПОЛ) или ослаблением молекулярных взаимодействий в матриксе при встраивании в него молекул неполярного органического растворителя (как, например, в случае с ДМСО).

Протекторное действие на стабильность вакуолярных мембран, как видим, оказывали вещества, относящиеся к классу антиоксидантов (ДМСО в низких концентрациях, дитиотреитол (10 мМ) и особенно дигидрокверцетин). Антиоксиданты различной природы могут замедлять и прерывать процессы ПОЛ и тем самым повышать стабильность изолированных вакуолей. Такой механизм отчетливо проявлялся в экспериментах с совместным использованием в опытах H_2O_2 (вещества, приводящего к ускорению ПОЛ) и антиоксидантов, ингибирующих этот процесс. Наиболее сильное протекторное действие на тонопласт оказывал дигидрокверцетин. Период полураспада фракции изолированных вакуолей при его действии в концентрации 1 мг/мл увеличивался

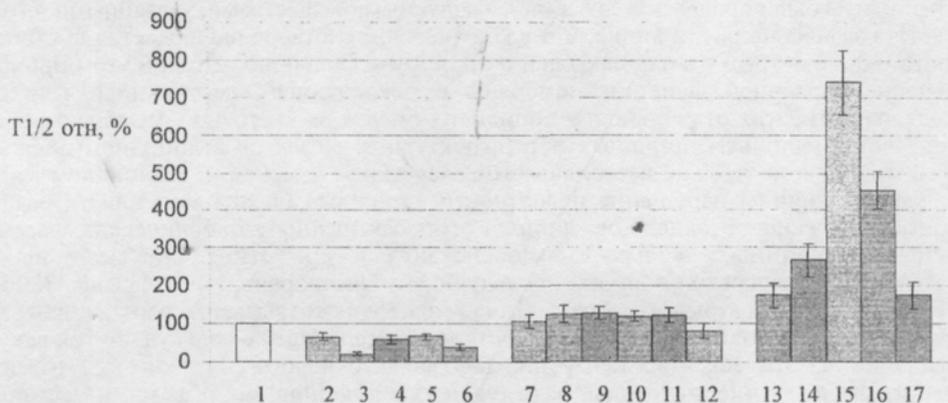


Рисунок 3.

Влияние мембранотропных соединений на период полураспада изолированных вакуолей относительно контроля: 1-контроль, 2-глутатион окисленный 20мМ, 3-ДМСО 100мМ, 4-Н₂О₂ 20мМ, 5-амбиол 1мг/мл, 6-фонк 1мг/мл, 7-ДТТ 1мМ, 8-ПВП 0,5мг/мл, 9-глутатион восстановленный 20мМ, 10-аскорбиновая кислота 20мМ, 11-БСА 1мг/мл, 12-ЧСА 1мг/мл, 13-ДТТ 10мМ, 14-арабиногалактан 1мг/мл, 15-дигидрокверцетин 1мг/мл, 16-бихол 1мг/мл, 17-ДМСО 10 мМ.

в 7,5 раза. В то же время не для всех нами испытанных новых биологически активных соединений (амбиол, фонк и бихол) было выявлено протекторное действие на изолированные вакуоли. Несмотря на то, что амбиол и фонк могут обладать антиоксидантной активностью [10], в условиях нашего эксперимента они сами оказывали повреждающее действие на тонопласт, а вместе с Н₂О₂ лишь ускоряли разрушение вакуолей. Вероятно, эти вещества в данных условиях, кроме замедления процессов ПОЛ, способствовали образованию пор в мембране, что в конечном итоге приводило к снижению ее барьерных свойств. Соединение бихол значительно стабилизировало тонопласт. Период полураспада вакуолей при его влиянии в концентрации 1 мг/мл увеличивался почти в 4 раза. Однако бихол не предотвращал дестабилизирующего действия Н₂О₂. Альбумины (белки, электростатически взаимодействующие с мембраной, которые используют в качестве адсорбента фенол (сильный окислитель) и хинон) незначительно влияли на барьерную функцию тонопласта, причем БСА (бычий сывороточный альбумин) проявил слабое стабилизирующее, а ЧСА (сывороточный альбумин человека) дестабилизирующее воздействие.

Таким образом, влияние испытанных веществ на барьерную функцию мембраны изолированной вакуоли может приводить или к стрессовой дестабилизации тонопласта и разрушению вакуолей (например, при действии прооксидантов, органических растворителей), или стабилизации барьерных свойств мембраны (ДГК, арабиногалактан, бихол).

Процессы, происходящие в наших экспериментах с мембранами, скорее всего, имели разнообразную природу. В пользу того, что при разрушении вакуолей происходит ПОЛ, может указывать протекторное действие антиоксидантов (перехватчиков свободных радикалов, восстановителей SH-групп). Однако, аскорбиновая кислота, эффективный ингибитор ПОЛ, оказывала слабое стабилизирующее действие на мембрану. Стимуляторы роста растений амбиол и фонк, обладающие антиоксидантными свойствами [10], в наших условиях, наоборот, способствовали разрушению вакуолей. Из антиокислителей стабильность мембраны сильно повышали только дигидрокверцетин и ДМСО в концентрации 1-10 мМ.

Флавоноид дигидрокверцетин является исключительно активным антиоксидантом, который ингибирует процессы ПОЛ, реагируя, как предполагают, с липидными радикалами [9]. ДГК весьма эффективно стабилизировал мембраны, сохраняя их барьерную функцию. При добавлении к суспензии мембран вместе с Н₂О₂, ДГК оказывал заметное протекторное действие.

Известно, что взаимодействие флавоноидов со свободными радикалами на мембране происходит в полярной области липидного бислоя [11]. Вероятно, ДГК приводил к "залечиванию" стрессовых пор в тонопласте или напрямую, связываясь с липидным бислоем мембраны, или опосредованно, при замедлении процессов ПОЛ. Антиоксидантный эффект флавоноидов может усиливаться в присутствии таких соединений как аскорбиновая кислота, фосфолипиды и др. Синергизм флавоноидов с аскорбиновой кислотой широко

обсужден в литературе [12,13]. Предполагают, что механизм взаимного усиления действия основан на способности синергистов регенерировать антиоксиданты. Мы исследовали совместное действие ДГК и аскорбиновой кислоты на барьерные функции мембраны изолированной вакуоли, однако отчетливого синергизма этих веществ в отношении протектирования тонопласта не обнаружили.

Эффект ДМСО при стабилизации вакуолярной мембраны, вероятно, объясняется его антиоксидантными свойствами [14] или протектирования белков тонопласта при гидрофобном взаимодействии с их неполярными группами [15]. Однако увеличение концентрации ДМСО, напротив, вызывало разрушение вакуолей. Можно полагать, что мембранотропный эффект обусловлен изменениями в липидном матриксе мембраны, поскольку известно, что это вещество способно модифицировать структуру липидных бислоев [16]. При взаимодействии с мембраной молекула ДМСО образует дефект на ее поверхности, позволяя проникнуть внутрь бислоя молекулам воды [17]. Наиболее вероятно, что в нашем случае этот процесс способствовал возникновению или расширению существующих в мембране пор и их флуктуации под воздействием ДМСО, вплоть до разрыва мембраны.

Одним из следствий ПОЛ является окисление тиоловых групп мембранных белков. Этот процесс, вероятно, приводит к дестабилизации мембраны, поскольку, по нашим данным, окислители SH-групп (окисленный глутатион, пероксид водорода) значительно ускоряли, а восстановитель дитиотреитол в концентрации 10 мМ несколько замедлял распад вакуолей.

Действие фосфолипаз и механическое растяжение мембраны вызывают нарушение ее барьерных свойств. Мембраносвязанные фосфолипазы обнаружены во многих растительных объектах, в том числе в вакуолярной мембране [18], но не известно, присутствуют ли они в тонопласте *Beta vulgaris*. К тому же большинство этих ферментов, например, фосфолипазы A₂ и D, Ca²⁺-зависимы, а наши растворы Ca²⁺ не содержали. Механическое растяжение мембраны при разрушении изолированных вакуолей представляется маловероятным, так как все растворы были выровнены по осмотической концентрации, и вряд ли она изменялась во время эксперимента.

Адсорбция на поверхности липидного бислоя поликатионов или полианионов также приводит к нарушению барьерных свойств мембраны. Мы исследовали влияние альбуминов, поливинилпирролидона и арабиногалактана на стабильность мембран. БСА и ЧСА представляют собой кислые белки животного происхождения, которые являются преобладающими в плазме крови, т.е. белками, определяющими свойства микроокружения пограничных мембран. Однако эти белки не оказывали заметного влияния на процесс распада вакуолей.

Протекторное соединение поливинилпирролидон (ПВП), которое используют в качестве адсорбента фенолов или хинонов (токсических эндогенных компонентов тканей, окисляющих SH-группы белков) мало влияло на стабильность вакуолей. Тонопласт непроницаем для ПВП, поэтому если даже находящиеся внутри вакуоли токсические агенты способствовали нарушению барьерных свойств мембраны, ПВП, оставаясь снаружи, не мог повлиять на этот процесс.

Полисахарид арабиногалактан повышал стабильность изолированных вакуолей. Скорее всего, этот эффект обусловлен его взаимодействием с тонопластом и формированием на поверхности вакуоли примембранного углеводного "слоя" (или пространственной сетки), способствующих сохранению барьерных свойств мембраны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Метод компьютерной центрифужной видеосъемки фракции изолированных вакуолей позволяет проводить тестирование новосинтезированных химических соединений с неизвестными свойствами и выявить вещества, влияющие на барьерные свойства мембран.

Для изучения мембранотропного действия веществ на барьерную функцию мембраны изолированной вакуоли разработан метод автоматизированного слежения за динамикой разрушения изолированных вакуолей с помощью компьютерной центрифужной видеосъемки микроскопических объектов и компьютерной обработки серии телевизионных изображений.

Впервые удалось изучить реакцию барьерной функции мембран изолированных вакуолей на воздействие ряда соединений из групп редокс-агентов, полимерных соединений и стимуляторов роста растений и установить вещества, оказывающие дестабилизирующее и выраженное протекторное действие на мембраны. Проксиданты - пероксид водорода (20 мМ), окисленный глутатион (20 мМ), а также органический

растворитель диметилсульфоксид в высокой концентрации (100 мМ) дестабилизируют мембрану изолированной вакуоли, что приводит к снижению ее барьерной функции, а антиоксиданты - дигидрохверцетин (3,3 мМ), диметилсульфоксид в низкой концентрации (1-10 мМ) и дитиотреитол (10 мМ), а также соединения арабиногалактан (1 мг/мл) и бихол (1 мг/мл) повышают стабильность мембраны.

Наибольший эффект для стабилизации барьерной функции мембраны проявил дигидрохверцетин (3,3 мМ), флавоноид, антиоксидант, обладающий липофильными свойствами (период полураспада фракции изолированных вакуолей превышал контроль в 7,5 раз). В то же время такие антиоксиданты как аскорбиновая кислота (20 мМ) и восстановленный глутатион (20 мМ), не влияли на барьерные свойства тонопласта, как и полимерные соединения, адсорбирующие фенолы и хиноны - поливинилпирролидон (1 мг/мл) и альбумины (1 мг/мл) быка и человека.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Салаяев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. (1981) Физиология растений, **28**, 1295-1305.
2. Салаяев Р.К., Кузеванов В.Я., Озолина Н.В., Каменкова Л.Д., Пузанова Н.А. (1982) Физиология растений, **29**, 933-940.
3. Салаяев Р.К., Козаренко Т.Д., Озолина Н.В., Кузеванов В.Я. (1983) Физиология растений, **30**, 487-491.
4. Kaiser G., Martinoia E., Schmitt J.M. (1986) *Planta*, **169**, 345-355.
5. Тихонова Л.И. (1998) Биол. мембраны, **15**, 245-258.
6. Maeshima M. (2001) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 469-497.
7. Кравченко А.Т., Милютин В.Н., Гудима О.С. (1963) Микрокиносъемка в биологии (цитология, вирусология, риккетсиология), изд-во медицинской литературы, М.
8. Антонов В.Ф., Аносов А.А., Богатырева Н.Э., Вассерман А.Н., Корепанова Е.А., Морозова Е.Р., Шевченко Е.В. (1999) Тез. докл. 2-го Съезда биофизиков России, **2**, 476-477.
9. Теселкин Ю.О., Жамбалова Б.А., Бабенкова И.В., Клебанов Г.И., Тюкавкина Н.А. (1996) Биофизика, **41**, 620-624.
10. Воронина С.С., Жижина Г.П., Лозовская Е.Л. (2001) Биофизика, **46**, 34-38.
11. Ratty A.K., Sumatoto J., Das N.P. (1988) *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 989-995.
12. Ratty A.K., Das N.P. (1988) *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **39**, 69-79.
13. Cholbi M.R., Paya M., Alcaraz M.J. (1991) *Experientia*, **47**, 195-199.
14. Yu Z.W., Quinn P.J. (1994) *Bioscience Reports*, **14**, 259-281.
15. Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. (1990) *Cryobiology*, **27**, 401-415.
16. Smondyrev A.M., Berkowitz M.L. (1999) *Biophys. J.*, **76**, 2472-2478.
17. Paci E., Marchi M. (1994) *Molecular simulation*, **14**, 1-10.
18. Tavernier E., Pugin A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1233**, 118-122.

COMPUTER-BASED STOP-MOTION VIDEO RECORDING OF ISOLATED VACUOLE FRACTION

V.N. Nurminsky, A.M. Korzun, S.V. Rozinov, R.K. Salyaev

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
e-mail: cell@sifibr.irk.ru

An automated technique of computer-based stop-motion video recording of isolated vacuoles fraction is developed. The technique permits to test many newly synthesized compounds for membranotropic properties and to identify substances affecting on membrane barrier characteristics. Using this technique a membranotropic activity testing of various redox-reagents, polymers and plant growth regulators was carried out. The influence of tested substances on membrane barrier function can result in either stress destabilization of tonoplast and destruction of vacuoles (for example, on the action of prooxidants, organic solvents) or stabilization of membrane barrier properties (dihydroquercetin, arabinogalactan, bihol).

Key words: isolated vacuole membrane, membrane barrier function, stop-motion video recording, membranotropic property, chemical compound testing