G. Laskay:

CELL PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF REDUCED DEUTERIUM CONTENT IN THE LEAVES OF ELODEA CANADENSIS

**Физиологические эффекты сниженной концентрации дейтерия**

**на клетки листьев Элодеи канадской**

Следующий выступающий - доктор Ласкей, который расскажет о физиологических эффектах сниженной концентрации дейтерия на клетки листьев Элодеи канадской - надеюсь, я правильно произнёс название.

Добрый день, леди и джентльмены. Я приехал из Сегеда. Возможно, вы не знакомы с географией Венгрии – давайте же посмотрим на карту. Сейчас мы здесь, в Будапеште. Если проехать примерно 170 км на юг или юго-восток – вы приедете в Сегед. Если проехать ещё немного – вы достигнете границы. Как видите, Венгрия – маленькая страна, и дистанция в 200 километров – большое расстояние.

Сегед – милый университетский городок. На 1 фото мы видим театр, летние представления в котором проходят под открытым небом, а на 2 – здание, где находится офис ценных работников и директора нашего университета. Население города – около 160-170 000 человек, 30000 среди которых – студенты. Соответственно, вы видите, насколько кипит жизнь в городе, особенно в учебное время. Можно сказать, весь город - территория университета.

Как мы все знаем, растения – полезные существа, так как они производят для нас пищу – прямо или косвенно – а также кислород, без которого мы не можем высвобождать энергию, полученную из употреблённой пищи. Растения также дают нам почву для физиологических исследований, например, исследований эффектов низкой концентрации дейтерия. Особенно ценные для опытов и многообещающие экземпляры – водные растения, которые находятся в тесном взаимодействии с окружающей их водой. Также в них происходит процесс и фотосинтеза, и дыхания. При процессе фотосинтеза данные растения берут углекислый газ из окружающей среды, при дыхании они выделяют углекислый газ в среду. Поэтому они могут быть интересными объектами для исследования низкой концентрации дейтерия.

Возможно, не все из вас знают, что такое элодея, но благодаря утренней лекции мы знаем, что это любимое водное растение, подводный макрофит, который теперь выращивается и в Европе. Элодея была завезена из Северной Америки, и какое-то время в 50-60-е годы в Европе её принимали далеко не гостеприимно. Элодея вызывала значительные проблемы, так как в Германии, куда она и была привезена вначале, она распространилась в бухтах Рейна (да, добрые старые времена, когда в водах Рейна ещё была жизнь!) и опутывала винты лодок, вызывая поломки и аварии. В Венгрии элодею называют «атокинар», что означает «проклятое морское семя» - возможно, это название берёт истоки из давних времен, когда растение вызывало проблемы.

Теперь мы можем встретить это растение повсюду, и любой человек, у которого когда-нибудь был дома аквариум, знаком с элодеей.

Во-первых, с элодеей легко работать, так как её листья легко отделить, поместить в любую нужную нам для эксперимента среду и после этого производить наблюдения.

Вот данное растение… оно идеально для опытов по физиологии. Растение содержит массу хлоропластов в клетках, поэтому на них можно проводить любые виды опытов.

Как вы знаете, в растениях при дневном свете могут происходить процессы и фотосинтеза, и дыхания. Но фотосинтез обычно превалирует. Растения способны поглощать углекислый газ, производя сахар и кислород, и использовать энергию фотонов. В темноте растения дышат, как и мы, производя АТФ. Растения – единственные существа, которые могут производить энергию несколькими механизмами - с помощью и дыхания, и фотосинтеза.

Итак, химики смогли выяснить, как углекислый газ разлагает воду, и проанализировать некоторые реакции, которые провоцирует углекислый газ, попадая в воду. Согласно этим исследованиям, есть несколько компонентов, которые выделяются при разложении углекислого газа водой, включая угольную кислоту, имеющую способность разлагаться на бикарбонаты, а далее на карбонаты.

Но, согласно закономерностям данным скорости данных реакций, скорость 1 реакции высока в среде с нейтральным pH или pH, близкому к нейтральному; скорость дальнейшей реакции в нейтральной среде очень мала (она ускоряется в средах с высоким pH) – но её не стоит пробовать повышать ради сохранения нормального коэффициента pH.

Имеется 3 необходимых компонента – сохранение уровня этих 3 компонентов – функция pH. Вы можете видеть на графике количество угольной кислоты, углекислого газа и карбонатов в зависимости от уровня pH.

Для наших опытов мы выбрали уровень pH ~6,5, так как на этом уровне в воде присутствует равное количество угольной кислоты и углекислого газа, поэтому растении могут беспроблемно производить карбонаты.

Итак, если мы поместим растение в такую воду при свете, начнётся процесс фотосинтеза , растение начнёт поглощать углекислый газ – это, конечно же, нарушит равновесие и, согласно законам генетического равновесия, норма реакции обратного процесса повысится, и это снизит концентрацию протонов.

Другими словами, при свете начинается процесс фотосинтеза – и ожидаемо понижение концентрации протонов и повышение уровня pH. Совершенно противоположное происходит в темноте.

Итак, что мы выяснили, проведя эксперименты на данных растениях. Сначала эксперименты проводились в обычной воде (их результаты мы позже сравним с результатами экспериментов в лёгкой воде). Итак, при помещении растения в обычную воду при свете, активизируется процесс фотосинтеза и pH повышается (это связано с понижением концентрации углекислого газа). В темноте происходит обратное.

Когда мы провели эксперимент с лёгкой водой (концентрация дейтерия в ней равнялась 87 ppm), мы заметили, что pH, вместо того чтобы постепенно повышаться, сначала резко понижается, а затем постепенно восстанавливается. Наблюдение за поведением углекислого газа же показало более медленное снижение концентрации газа, чем в обычной воде – однако, через полтора часа скорость снижения концентрации выровнялась и стала идентична скорости у растения в обычной воде.

Эксперимент, проведённый в темноте – соответственно, растения могли лишь дышать – показал, что лёгкая вода ускоряет снижение уровня pH, но опять же лишь в первые полтора часа. Что касается углекислого газа – было обнаружено, что снижение уровня pH влияет на концентрацию углекислого газа в крови – хотя, возможно, это было последствие активации дыхания.

Итак, из этих опытов мы уяснили, что в первые же пару минут нахождения растения в лёгкой воде, а затем в течение полутора часа ослабляется процесс фотосинтеза, но стимулируется процесс дыхания. Однако, ни то, ни другое не ведёт к сильному окислению среды, в отличие от того что мы наблюдали в самом начале – когда измеряли уровень pH при свете. Вполне возможно, что такому значительному окислению способствует ещё какой-то дополнительный фактор.

Мы сочли, что важным фактором может быть мембранный потенциал. Как мы хорошо знаем, все живые существа развивают напряжение плазматической мембраны – причинами этого являются:

-неравномерное распределение ионов

- плазматическая мембрана по-разному проницаема с разными ионами

- в цитозоле содержатся непроникающие анионы протеина

- наличие мембранных электрогенных транспортных механизмов (насосов)

К примеру, клетки животных могут быть схематически изображены так. В их цитоплазме имеется масса отрицательно заряженных протеинов, и их заряд компенсируется наличием ионов натрия в окружающей среде. Если плазматическая мембрана не будет подвержена проникновению ионов натрия – так же как проникновению протеинов – это не вызовет проблем, но, к сожалению, мембрана пропускает некоторые ионы натрия внутрь, и поэтому в клетках у животных содержится натриевый насос, и клетки не могут удерживать постоянно нормальный заряд.

В клетках животных имеется Na+/K+ ATP-аза, которая одновременно транспортирует 3 иона натрия из клетки и 2 иона калия внутрь клетки во время функционирования насоса, и это создаёт мембранный потенциал. В клетках растений отсутствует подобный насос в мембранах . У них есть H+ АТР-аза, а так же стенка клетки – и именно H+ АТР-аза создаёт мембранный потенциал.

Мембранный потенциал может быть измерен экстрафизиологическими техниками. Например, если мы берём 2 электрода и вставляем один из них в живую клетку, мы можем измерить текущий потенциал, т.к. в данном опыте стенка клетки играет роль преграды между двумя разнозаряженными жидкостями. Внутренняя часть клетки становится катодом (в этом есть определённые осложнения, т.к. стенки клеток растений хрупки. К счастью,в настоящее время есть другие методы измерения потенциала без введения электрода в клетку). Мы использовали в эксперименте некоторое количество флюоресцентных соединений, которые могли нам помочь, т.к. они имеют возможность проникать в живые клетки, не влияя на заряд и мембранный потенциал. И 1 из этих флюоресцентных красителей… его формулу можно посмотреть на данном слайде – фактически катион липофила. И раз это катион, значит, он очень тесно связан с мембранным потенциалом – чем выше мембранный потенциал, тем большее количество данного красителя будет потребляться в отведённое количество времени. Итак, это принцип измерения: если мембранный потенциал низок, потребляется мало красителя; если высок – много. Т.к. краситель флюоресцентный, мы можем легко посчитать количество флюоресценции в клетках и вычислить мембранный потенциал.

Итак, мы провели этот эксперимент в лёгкой воде и что мы обнаружили. В первую половину эксперимента, проводимого при свете, клетки потребляли огромное количество красителя, а потом количество потребляемого красителя сравнялось с количеством в контрольной группе. Это может объяснить хотя бы частично, почему мы наблюдали ранее столь резкое окисление.

Итак, в завершение мы можем сказать, что клетки растений способны чувствовать изменение концентрации дейтерия в жидкости окружающей среды. Прослеживались небольшие изменения в основных физиологических процессах – и в фотосинтезе, и в дыхании – ослабление поглощения углекислого газа при свете и его усиление в темноте; активизация гиперполяризации (H+ АТР-азы). Один из важнейших моментов заключается в том, что все наблюдаемые изменения имеют временную природу и наблюдаются в клетках в течение первых 1,5 часов, а затем клетки адаптируются к новым условиям.

Вывод, который мы можем сделать: водные растения – подходящие для экспериментов с лёгкой водой объекты, т.к. они проявляют резкие и существенные изменения в тканях. И мы думаем, что эти явления могут быть связаны с изменением соотношения водорода и дейтерия.

Растения быстро адаптируются к новым условиям, но изменения, происходящие в начале экспериментов, дают возможность исследовать влияние лёгкой воды на организм.

Спасибо за внимание.

- Какие-нибудь вопросы? Подождите, пожалуйста, 1 секунду, принесут микрофон.

- Спасибо. Пробовали ли вы оценить результаты, продержав растения в лёгкой воде дольше? Как долго длился эксперимент?

- Именно поэтому я спросил вас в перерыве, сколько времени вы наблюдали за темпом роста… Мы концентрировали внимание на первых часах эксперимента и, честно говоря, не видели более никаких изменений. Но вы дали мне хорошее указание, что, возможно, стоит сделать это.

- Возможно ли заблокировать транспортацию водорода через клеточную мембрану растений с помощью химикатов? Возможно ли, я не знаю.

- Есть соединения, которые могут быть использованы для изолированных клеток – например, соединение натрия. Но я не знаю, проводились ли какие-либо исследования, доказавшие, что они будут работать и внутри живого организма. Может, это всего лишь сказки – данные необходимо проверить.

- Я хотел бы задать вопрос. Как вы считаете, быстрая адаптация (я хотел бы назвать это так) к дефициту дейтерия в растительных системах связана с тем, что растения по какой-то причине начинают ферментацию, особенно когда они вовлечены в переработку углерода, а особенно в фотосинтез, т.е., процессы, которые проявляют избирательность в использовании изотопов - мы знаем, что в у млекопитающих нет эффекта различения изотопов в процессе промежуточного метаболизма. Если мы используем такие же концентрации стабильного изотопа глюкозы в растительных системах - будет проявляться избирательность в выборе изотопов, а именно, предпочтение не будет отдаваться более тяжелому изотопу глюкозы. У вас есть какие-нибудь идеи или же ответы на вопрос - почему такое это происходит и почему происходят различные реакции ферментов в растительных и животных системах?

- Я не знаю точно, можем ли мы что-либо говорить об энзиматическом уровне. Но что мы думаем: можем быть установлен баланс между фотосинтезом и дыханием, т.к. факторы среды обычно воздействуют на них диаметрально противоположным образом. И заманчиво было бы отыскать рычаг баланса между этими двумя процессами – может быть, он одинаково чувствителен и к водороду, и к дейтерию. Но истинная природа этого механизма не познана.

- В качестве заключительной заметки хочу сказать, что меня правда увлекла идея контроля метаболизмов, хоть я и не являюсь в ней экспертом. Мы сотрудничаем с университетом Барселоны, в котором работают признанные эксперты в этой области. Я читал работу, посвященную адаптивности ферментов, то есть, в каждом наборе функций в них есть компонент, отвечающий за приспособляемость, и, скорее всего, недостаток дейтерия является одним из факторов изменения ферментативных реакций, которые также изменяются в нужный момент. Например, использование водорода для восстановления - это не главная функция фермента, как выделение водорода из воды… но вот использование водорода для, например, синтеза веществ... И, даже несмотря на то, что он осуществляет основное управление реакцией, если смотреть с точки зрения взаимодействия электронов, положительной-отрицательной обратной связи и адаптивной регуляции ферментов. Мы видим, что дейтерий и водород, которые на деле являются реагентами воды в реакциях, могут менять кинетические модели, в отличие от источников углерода. Это была идея, которая была у меня во внимании, но я правда не уверен, дадут ли эксперты, с которыми мы сотрудничаем, нам дальше углубиться в изучение этой темы. Я говорю об этом просто потому, что есть несколько свободных минут, я думаю, что это правда интересная тема, но, изучив данные ваших исследований, я пришел к выводу, что растительные ферменты обладают еще более обширными свойствами, чем я предполагал.

- Да, я припоминаю, что во время своей первой речи Габор говорил, что есть различия в растениях, имеющих разные механизмы фотосинтеза, к примеру, реагируют по-разному. Да, это верно.