

О. Подпалова, ассист.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ДИНАМИКА СОКРАЩЕНИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Алкогольная миопатия считается многофакторной болезнью. Механизмы, ведущие к развитию патологии мышц при чрезмерном потреблении алкоголя, имеют несколько вариантов реализации. Хронический прием алкоголя и острая алкогольная интоксикация способны снижать скорость белкового синтеза, в том числе и миофибриллярных белков, приводит как минимум к двум функциональным изменениям показателей сократительных процессов: увеличение времени релаксации и неадекватной, некорректной реализации мышечного сокращения. Хроническое злоупотребление алкоголем способствует ухудшению способности мышц к сокращению, в частности уменьшению силы и механокинетических параметров сокращения, что может быть следствием нарушения ультраструктурной организации миоцитов, их атрофии, поскольку этанол способен напрямую взаимодействовать с мембранными структурами миоцитов. Нарушение целостности мембранных структур и повышение активности Ca^{2+} -АТФазы приводят к изменению гомеостаза кальция и нарушению сократительной функции мышц. Признаком алкогольной миопатии также является слабость скелетных мышц, которая обусловлена уменьшением относительной массы сократительных белков – миозина, десмина, актина и тропонина, и сократительных – титина и небулина, ведь этанол и ацетальдегид выступают мощными ингибиторами синтеза миофибриллярных и саркоплазматического белков. Целью исследования было сравнение динамики параметров сокращения скелетных мышц алкоголизованных крыс при применении электростимуляции с разным временем релаксации. В первой серии эксперимента мы провели стимуляцию *m.tibialis* крыс электрическими импульсами длительностью 2, 3, 4, 5 секунд. С периодом релаксации 30 с. В следующей серии экспериментов мы увеличили время релаксации до 1 мин. В данных стимулирующих условиях миопатические мышцы обнаруживают тенденцию к увеличению времени релаксации, а не к качественному или количественному изменению динамики ее сократительных процессов.

Ключевые слова: этанол; алкоголь; миопатия; сокращения; релаксация; динамика.

O. Podpalova, assist.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MUSCLE CONTRACTIONS DYNAMICS DURING CHRONIC ALCOHOLIZATION

Alcoholic myopathy is considered a multifactorial disease. The mechanisms leading to the development of muscle pathology in the case of excessive alcohol consumption have several implementation options. Chronic alcohol intake and acute alcohol intoxication can to reduce the rate of protein synthesis, including myofibrillar proteins, leading to at least 2 functional changes in contractile processes: increased relaxation time and inadequate, incorrect muscle contraction. Chronic alcohol abuse contributes to the impairment of muscle contraction, including the reduction of the force and mechanokinetic parameters of contraction, which may be the result of the ultrastructural organization disruption of myocytes and their atrophy, because ethanol is able to interact directly on membrane structures. Impaired membrane structures and increased Ca^{2+} -ATPase activity lead to changes in calcium homeostasis and impaired muscle contractile function. Alcohol myopathy is also represents by skeletal muscles weakness, which is caused by a decrease of the relative weight of myosin, desmin, actin and troponin, titin and nebulin, as ethanol and acetaldehyde act like as potent inhibitors of synthesis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins. The purpose of the study was to compare the dynamics of the parameters of skeletal muscle contraction of alcoholic rats using electrical stimulation with different relaxation times. In the first series of the experiment, we performed stimulation of *m.tibialis* rats with electrical pulses of 2.3.4.5 seconds. With a relaxation period of 30 s. In the next series of experiments, we increased the relaxation time to 1 min. In these stimulating conditions, myopathic muscles tend to increase the relaxation time rather than qualitatively or quantitatively change the dynamics of its contractile processes.

Keywords: ethanol; alcohol; myopathy; contraction; relaxation; dynamics.

УДК 577.352.4:581.43

М. Рудницька, асп., Т. Палладіна, д-р біол. наук, проф.
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна

ВПЛИВ ПРЕПАРАТІВ МЕТІУРУ ТА ІВІНУ НА ВАКУОЛЯРНИЙ $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ АНТИПОРТЕР КЛІТИН КОРЕНЯ *ZEА МАУС L.* ЗА УМОВ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

Оскільки кальцій відіграє важливу роль у регуляції процесів росту і розвитку рослинного організму, а також формуванні специфічної фізіологічної реакції на дію різних стресових факторів, виконуючи функцію вторинного месенджера, метою роботи було вивчити вплив гетероциклічних препаратів Метіуру та Івіну на $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортер у вакуолярних клітинах кореня *Zea mays L.* за умов сольового стресу. Для цього корені проростків кукурудзи гібриду Остреч СВ експонували в присутності 0,1 М хлориду натрію протягом 1 та 10 діб. Вакуолярні мембрани отримували із гомогенату коренів кукурудзи шляхом центрифугування в подвійнастом градієнті в сахарозі. Активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортера оцінювали за шходом центрифугування в дотриманні іонів кальцію в інкубаційне середовище, виражаючи в $\Delta F\%$ на мг протеїну за хвилину. Встановлено, що за контрольних умов гетероциклічні препарати Метіур та Івін не впливають на активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера у вакуолярних мембранах кореня кукурудзи і істотно не сприяють розвитку стрес-реакції у рослин. Однак за умов сольової експозиції проростків кукурудзи було виявлено протилежно направлений вплив препаратів Метіуру та Івіну на активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера в мембранах вакуолей кореня. За умов тривалої сольової експозиції Метіур підвищує активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера у вакуолярній мембрані кореня, а Івін, навпаки, знижує її, що може бути пов'язано з хімічним складом цих гетероциклічних препаратів. Отримані результати вказують на те, що солепротекторна дія гетероциклічного препарату Метіур може бути зумовлена також і його впливом на функціональну активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера у вакуолярній мембрані кореня кукурудзи.

Ключові слова: $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортер, вакуолярна мембрана, корінь, кукурудза, засолення, Метіур, Івін.

Вступ. Ca^{2+} відіграє важливу роль у процесах регуляції росту, розвитку рослинного організму та формуванні специфічної фізіологічної реакції на дію різних стресових факторів, виконуючи функцію вторинного месенджера [1]. Ця функція забезпечується функціонуванням системи Ca^{2+} -залежної трансдукції сигналів, що починається з підвищення концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) та активації відповідних протеїнів [2]. На-

ступним етапом є відновлення концентрації цього йону в цитоплазмі, до початкового рівня, порядку 100-200 нмоль/л, оскільки довготривала висока концентрація Ca^{2+} може викликати цитотоксичні ефекти: агрегацію протеїнів і нуклеїнових кислот, осадження фосфатів, порушення цілісності мембран в результаті високої реакційної здатності Ca^{2+} [3]. У генерації Ca^{2+} -сигналів і підтримці його клітинного гомеостазу вирішальну роль

відіграють Ca^{2+} -транспортери, серед яких виділяють Ca^{2+} -канали, Ca^{2+} -АТФази і клас $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортерів (CAH), які забезпечують спряжений транспорт. Останні використовують рушійну силу протона, створену H^{+} -АТФазою, та відіграють життєво важливу роль у стресостійкості, беручи участь в системі трансдукції Ca^{2+} сигналів і тим самим формуючи захисну реакцію у рослин на дію стресового фактора [4]. У клітинах рослин $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортери локалізуються у плазматичній мембрані [5, 6], вакуолярній мембрані (далі ВМ) [7, 8], та в мембранах мітохондрій [9].

$\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортер є важливим компонентом вакуолярної мембрани, що забезпечує разом, а також Ca^{2+} -АТФазою, зниження рівня Ca^{2+} в цитоплазмі рослинної клітини після тимчасового його підвищення у відповідь на зовнішні стимули і при виконанні клітиною певних фізіологічних функцій, таких як секреція і полярний ріст.

Серед абіотичних факторів найбільш згубним для рослинних організмів є засолення ґрунту, котре викликає в них пригнічення росту та розвитку. Негативна дія цього чинника пов'язана з токсичною дією на клітинний метаболізм найпоширенішого катіона солей Na^{+} , який призводить до формування сильного іонного дисбалансу, що викликаний зменшенням поглинання K^{+} у результаті конкурентного процесу з високими концентраціями Na^{+} . Адаптація рослинних організмів до дії сольового стресу головним чином полягає у відновленні іонного гомеостазу шляхом відтоку токсичного йону Na^{+} в екстрацелюлярний простір та вакуолі. Формування стрес-реакції рослинами на збільшення концентрації Na^{+} в цитоплазмі відбувається шляхом підвищення рівня кальцію, який призводить до активації специфічної Ca^{2+} -залежної системи (SOS, Salt overly sensitive system), що включає три сенсорні протеїни. В клітині відбувається активація каскадного шляху від SOS3-SOS2 до SOS1 ($\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -антипортер ВМ), останній переходить в активний стан та забезпечує видалення Na^{+} із цитоплазми клітини у вакуолі. Таким чином, як вже згадувалось вище, в цих процесах бере участь $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортер, що характеризується високою пропускну здатністю та є низькоспорідненим до Ca^{2+} транспортером, забезпечуючи видалення надлишку Ca^{2+} з цитоплазми, та знижуючи його концентрацію до мікромолярного рівня після підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ у результаті дії подразника, тоді як Ca^{2+} -АТФаза здійснює подальше зниження $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, відновлюючи кальцевий гомеостаз. Встановлено, що експерименти з сенсорами Ca^{2+} дозволяють підвищувати стійкість до багатьох стресів. Так, спостерігалися зміни чутливості рослин з мутаціями по CAH до таких абіотичних стресів, як засолення і холодострес [4].

У попередніх дослідженнях наукової групи Т.О. Палладіної [10, 11] було виявлено солепротекторну дію препаратів циклогексанового ряду Метіуру (6-метил-2-меркапто-4-гідроксипіримідин) та Івіну (N-оксид-2,6-диметилпіридин) на корені кукурудзи. У зв'язку з цим, для з'ясування можливого механізму їх дії було поставлено за мету дослідити вплив цих препаратів на активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера вакуолярної мембрани клітин кореня за умов засолення, спричиненого NaCl .

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були 8- або 17-добові корені проростків кукурудзи (*Zea mays* L.) гібриду Остреч СВ. Проростки вирощували на поживному середовищі Хогленда за температури 24°C , за умов 16-годинного світлового дня та освітлення 50 Вт/м^2 . У тижневому віці їх експонували в присутності $0,1 \text{ M NaCl}$ протягом 1 та 10 діб. У роботі для отримання мембранних фракцій використовували корені. Синтетичні препарати застосовували шляхом замочування насіння протягом доби в їх 10^{-7} M водних розчинах.

Препарат вакуолярної мембрани отримували з гомогенату тканин коренів рослин шляхом центрифугування на ультрацентрифузі Optima TM L-90K Beckman Coulter в ступінчастому градієнті сахарози (10/23%) [12]. Мембранний склад оцінювали із застосуванням біохімічних маркерних ензимів, частку правильно орієнтованих везикул – за впливом детергенту Тритону X-100 на гідроліз АТФ [13].

Активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортера оцінювали за виходом H^{+} із везикул при додаванні Ca^{2+} в інкубаційне середовище, виражаючи у $\Delta F\%$ на мг протеїну за хвилину [14]. CaCl_2 вносили після того, як градієнт концентрації йонів H^{+} , утворений роботою одного із протонних насосів, досягав максимальної величини і виходив на стаціонарний рівень. Величину градієнта H^{+} вимірювали за зниженням поглинання оптичного зонду акридинового оранжевого при 495 нм [15] на спектрофотометрі 2000СФ. Оцінювали початкову швидкість зміни поглинання акридинового оранжевого і максимальне значення (що відповідає градієнту концентрації йонів H^{+} між вмістом везикул і зовнішнім середовищем при досягненні реакцією рівноваги). Розрахунок концентрації іонізованого Ca^{2+} , в реакційному середовищі, проводили за програмою Ca-Mg-ATP-EGTA -TS – Maxchelator (<http://maxchelator.stanford.edu/CaMgATPEGTA-TS.htm>) із застосуванням 1 mM EGTA . Вміст протеїну в мембранних препаратах визначали за методом Бредфорда [16].

Усі досліди здійснювали в чотирьох біологічних і трьох аналітичних повтореннях, визначаючи достовірність отриманих даних за t-критерієм Стюдента.

Результати та їх обговорення. Фракція вакуолярної мембрани, отриманої із гомогенату 8- або 17-добових коренів проростків кукурудзи за даними біохімічного аналізу має високий ступінь очищення. Склад препаратів ВМ становив: вакуолярна мембрана – 85%, плазматична мембрана – 6,4%, мембрани мітохондрій і апарату Гольджі – по 4,3% для кожної групи.

Транспорт, опосередкований $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ обміном, був оптимальним при $\text{pH } 7,0$. Залежність початкової швидкості виходу H^{+} від концентрації Ca^{2+} має насичувальний характер, задовільно описується кінетикою Міхаеліса-Ментен ($K_m = 11 \text{ мкМ}$), та відображає транспортну специфічність для Ca^{2+} .

Показано, що за нормальних умов гетероциклічні препарати Метіур та Івін істотно не впливають на активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера вакуолярної мембрани коренів 8- та 17-добових проростків кукурудзи (табл.1). Це вказує на те, що ці гетероциклічні препарати не беруть безпосередньої участі у процесах підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу кальцію.

Таблиця 1. Активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера вакуолярної мембрани клітин коренів 8- та 17-добових проростків кукурудзи за дії препаратів Метіур та Івін

Варіанти	Вік проростків	
	8 діб	17 діб
	$\Delta F\%$ на мг протеїну за 1 хв	$\Delta F\%$ на мг протеїну за 1 хв
Контроль	0,65±0,12	0,93±0,11
Метіур	0,69±0,08	1,02±0,09
Івін	0,66±0,21	0,96±0,07

$M \pm m$; $n=4$

При дослідженні активності $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера вакуолярної мембрани за умов сольової (0,1 М хлориду натрію) експозиції проростків упродовж 1 або 10 діб (табл. 2) було виявлено відмінний за своїм характером вплив цих гетероциклічних препаратів. Так, Метіур посилював активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера вакуолярної мембрани, яка зростала з подовженням терміну сольової експозиції проростків кукурудзи до 10 діб. Разом з

тим, при обробці цих проростків Івіном було виявлено невелике за величиною, але статистично значиме зниження активності $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера вакуолярної мембрани так за довготривалої експозиції. Різниця між реакціями на обрані препарати вказує на відмінність механізмів їх дії, що може бути пов'язано зокрема з особливостями хімічного складу препаратів.

Таблиця 2. Активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера вакуолярної мембрани клітин коренів 8- та 17-добових проростків кукурудзи, експонованих у присутності 0,1 М NaCl впродовж 1 і 10 діб, відповідно, та за дії препаратів Метіур та Івін

Варіанти	Термін сольової експозиції/вік проростків	
	1 доба/8 діб	10 діб/17 діб
	$\Delta F\%$ на мг протеїну за 1 хв	$\Delta F\%$ на мг протеїну за 1 хв
Контроль + NaCl	2,45±0,09	2,63±0,06
Метіур + NaCl	4,51±0,05*	6,82±0,06*
Івін + NaCl	2,28±0,07	2,13±0,08*

$M \pm m$; $n=4$, $P<0,05$, * вірогідно відносно контролю за умов сольової експозиції

Висновки. Гетероциклічні сполуки Метіур та Івін можуть впливати на активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера вакуолярної мембрани. Встановлено, що за контрольних умов препарати Метіур та Івін не впливають на активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера в досліджуваних мембранах. Таким чином, застосування препаратів Метіур та Івін не викликає стрес-реакцію у рослин. Виявлено протилежний вплив препаратів Метіуру та Івіну на активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера ВМ за умов сольової експозиції проростків кукурудзи, що може бути пов'язано з хімічним складом препаратів. Встановлено, що за умов сольової експозиції, на відміну від Івіну, Метіур підвищує активність $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера у вакуолярній мембрані кореня за тривалої сольової експозиції. Одержані результати вказують, що солепротекторна дія Метіуру може бути обумовлена, серед іншого, його впливом на функціонування $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера у вакуолярній мембрані.

Список використаних джерел:

- De Falco T.A. Breaking the code: Ca^{2+} sensors in plant signalling / T.A. de Falco, K.W. Bender, W.A. Snedden // *Biochem. J.*, 2010. – Vol. 425, N 1. – P. 27–40. doi: 10.1042/BJ20091147.
- Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses / B. Ranty, D. Aldon, V. Cotelle et al. // *Front. Plant Sci.*, 2016. – Vol. 7. – P. 327. doi: 10.3389/fpls.2016.00327.
- Understanding calcium transport and signaling, and its use efficiency in vascular plants / A. González-Fontes, M. T. Navarro-Gochicoa, C.J. Ceacero et al. // *Plant Macronutrient Use Efficiency: Molecular and Genomic Perspectives in Crop Plants*. Academic Press, 2018. – P. 418. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811308-0.00009-0.
- Bickerton P. D. Role of cation/proton exchangers in abiotic stress signaling and stress tolerance in plants / P. D. Bickerton, J. K. Pittman // *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*. Springer, 2015. – P. 95–117. doi: 10.1007/978-1-4939-2211-6_4.
- Functional analysis of rice $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter OsCAX3 in yeast and its subcellular localization in plant / B.S. Qi, C.G. Li, Y.M. Chen et al. // *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2005. – Vol. 32. – P. 876–882.

- Shen G.M. Involvement of plasma membrane $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter in Cd^{2+} tolerance / G.M. Shen, Q.Z. Du, J.X. Wang // *Rice Sci.*, 2012. – Vol. 19, N 2. – P. 161–165. https://doi.org/10.1016/S1672-6308(12)60035-3.
- Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters / T. Shigaki, I. Rees, L. Nakhleh et al. // *J. Mol. Evol.*, 2006. – Vol. 63. – P. 815–825. doi: 10.1007/s00239-006-0048-4.
- Martinoia E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism / E. Martinoia, M. Maeshima, H.E. Neuhaus // *J. Exp. Bot.*, 2007. – Vol. 58, N 1. – P. 83–102. doi: 10.1093/jxb/erl183.
- Jiang D. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter / D. Jiang, L. Zhao, D.E. Clapham // *Science*, 2009. – Vol. 326. – P. 144–147. doi: 10.1126/science.1175145.
- Morphogenesis of maize primary roots in relation to salinity and methiure effect / N.A. Belyavskaya, T.A. Palladina, O.I. Zhuk et al. // *Agriculture. Scientific articles*, 2004. – Vol. 86, N 2. – P. 67–75.
- Вплив сольового і осмотичного стресів та Метіуру на фотосинтетичний апарат листків кукурудзи / Н.О. Білявська, Н.Ю. Волошина, Н.М. Топчий та ін. // *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія*, 2009. – Т. 3, № 18. – С. 35–42.
- Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet: characterization of proton-transport and ATPase in tonoplast vesicles / R.J. Poole, D.P. Briskin, Z. Krátký et al. // *Plant Physiol.*, 1984. – Vol. 74, N 3. – P. 549–556. doi: 10.1104/pp.74.3.549.
- Briskin D.R. Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles / D.R. Briskin, R.T. Leonard, T.K. Hodges // *Meth. Enzymol.*, 1987. – Vol. 148. – P. 542–558.
- $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* leaves / J.L. Zhai, H.X. Xu, X.L. Cong et al. // *Acta Physiol. Plant.*, 2013. – Vol. 35. – P. 161–173. doi:10.1007/s11738-012-1059-y.
- Palmgren M.G. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: Mechanism and limitations / M.G. Palmgren // *Analytical biochemistry*. – 1991. – Vol. 192. – P. 316–321. doi: 10.1016/0003-2697(91)90542-2.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.*, 1976. – Vol. 72, N 1-2. – P. 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999.

References (Scopus):

- De Falco TA, Bender KW, Snedden WA. Breaking the code: Ca^{2+} sensors in plant signalling. *Biochem. J.* 2010;425(1):27–40. PubMed PMID:20001960.
- Ranty B, Aldon D, Cotelle V, Galaud JP, Thuleau P, Mazars C. Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Front Plant Sci.* 2016;7:327. PubMed PMID: 27014336.

3. González-Fontes A, Navarro-Gochicoa MT, Ceacero CJ, Herrera-Rodríguez MB, Camacho-Cristóbal JJ, Rexach J. Understanding calcium transport and signaling, and its use efficiency in vascular plants. In: Hossain MA, Kamiya T, Burritt DJ, Phan Tran L-S, Fujiwara T, editors. Plant Macro-nutrient Use Efficiency: Molecular and Genomic Perspectives in Crop Plants. San Diego: Academic Press; 2017. p. 165-180.
4. Bickerton PD, Pittman JK. Role of cation/proton exchangers in abiotic stress signaling and stress tolerance in plants. In: Girdhar K. Pandey, editor. Elucidation of abiotic stress signaling in plants. New York: Springer-Verlag; 2015. p. 95-117.
5. Qi BS, Li CG, Chen YM, Lu P-L, Hao FS, Shen GM, et al. Functional analysis of rice $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter OsCAX3 in yeast and its subcellular localization in plant. Progress in Biochemistry and Biophysics. 2005;32(9):876-882.
6. Shen GM, Du QZ, Wang JX. Involvement of plasma membrane $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter in Cd^{2+} tolerance. Rice Sci. 2012;19(2):161-165.
7. Shigaki T, Rees I, Nakhleh L, Hirschi KD. Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters. J Mol Evol. 2006;63(6):815-825. PubMed PMID: 17086450.
8. Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. J Exp Bot. 2007;58(1): 83-102. PubMed PMID: 17110589.
9. Jiang D, Zhao L, Clapham DE. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter. Science. 2009;326(5949):144-147. PubMed PMID: 19797662.
10. Bilyavska NO, Voloshina NY, Topchiy NM, Konturskaya OO, Palladina TO Influence of salt and osmotic stresses and Methyure on the photosynthetic apparatus of corn leaves. Bism. Kharkiv. national. agrarian. un-ty. Ser. Biology. 2009; 3 (18). 35-42. Ukrainian.
11. Belyavskaya NA, Palladina TA, Zhuk OI, Kurilenko IN. Morphogenesis of maize primary roots in relation to salinity and methyure effect. Agriculture. Scientific articles. 2004; 86(2):67-75.
12. Poole RJ, Briskin DP, Krátký Z, Johnstone RM. Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet: characterization of proton-transport and ATPase in tonoplast vesicles. Plant Physiol. 1984;74(3):549-556. PubMed PMID: 16663459.
13. Briskin DR, Leonard RT, Hodges TK. Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. Meth Enzymol. 1987;148:542-558.
14. Zhai JL, Xu HX, Cong XL, Deng YC, Xia ZH, Huang X, et al. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in the plasma membrane of Arabidopsis thaliana leaves. Acta Physiol. Plant. 2013;35(1):161-173.
15. Palmgren MG. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: Mechanism and limitations. Analytical biochemistry. 1991;192(2):316-321. PubMed PMID: 1827963.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-254. PubMed PMID: 942051.

Надійшла до редколегії 07.10.19

Отримано виправлений варіант 08.11.19

Підписано до друку 08.11.19

Received in the editorial 07.10.19

Received revised version on 08.11.19

Signed in the press on 08.11.19

M. Рудницька, асп., Т. Палладина, д-р биол. наук, проф.
 Інститут ботаніки імені Н. Г. Холодного НАН України, Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ МЕТИУРА И ИВИНА НА ВАКУОЛЯРНУЮ $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ АНТИПОРТЕР КЛЕТОК КОРЕНЯ ZEA MAYS L. В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

Поскольку кальций играет важную роль в регуляции процессов роста и развития растительного организма, а также формировании специфической физиологической реакции на действие различных стрессовых факторов, выполняя функцию вторичного мессенджера, целью работы было изучить влияние гетероциклических препаратов Метиур и Ивин на $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортер в вакуолях клеток корня Zea mays L. в условиях солевого стресса. Для этого корни проростков кукурузы гибрида Остреч СВ экспонировали в присутствии 0,1 М хлорида натрия в течение 1 и 10 суток. Вакуолярные мембраны получали из гомогената корней кукурузы путем центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы. Активность $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортера оценивали по выходу протонов с везикул при добавлении ионов кальция в инкубационную среду, выражая в $\Delta F\%$ на мг протеина в минуту. Установлено, что при контролируемых условиях гетероциклические препараты Метиур и Ивин не влияют на активность $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера в вакуолярных мембранах корня кукурузы и существенно не способствуют развитию стресс-реакции у растений. Вместе с тем, в условиях солевой экспозиции проростков кукурузы было обнаружено противоположно направленное влияние препаратов Метиур и Ивин на активность $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера в мембранах вакуолей корня. Так, в условиях длительной солевой экспозиции Метиур повышает активность $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера в вакуолярной мембране корня, а Ивин, наоборот, снижает ее, что может быть связано с химическим составом этих гетероциклических препаратов. Полученные результаты указывают на то, что солепротекторное действие гетероциклического препарата Метиур может быть обусловлено также и его влиянием на функциональную активность $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортера в вакуолярной мембране корня кукурузы.

Ключевые слова: $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортер, вакуолярная мембрана, корень, кукуруза, засоления, Метиур, Ивин.

M. Rudnytska, Ph. D., stud., T. Palladina, Dr. Sci., Prof.
 M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF METHYURE AND IVIN PREPARATIONS ON VACUOLAR $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ANTIPOENTER OF ZEA MAYS L. ROOT CELLS UNDER SALT STRESS

Because calcium plays an important role in the regulation of growth and development processes in plant organism as well as the formation of a specific physiological response to the action of various stressors, acting as a secondary messenger, the purpose of the study was to study the effect of heterocyclic drugs Methyure and Ivin of root cells Zea mays L. under salt stress. The roots of maize hybrids of Ostrich CB were exposed in the presence of 0.1 M sodium chloride for 1 and 10 days. Vacuolar membranes were obtained from corn root homogenate by centrifugation in a sucrose step gradient. The activity of the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -antiporter was evaluated by the proton release from vesicles by adding calcium ions to the incubation medium, expressing $\Delta F\%$ per mg of protein per minute. Under control conditions, heterocyclic drugs Methyure and Ivin do not affect the activity of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -antiporter in the vacuolar membranes of corn roots and do not significantly contribute to the development of stress response in plants. At the same time, under the conditions of salt exposure of maize seedlings the opposite directed effect of Methyure and Ivin on the activity of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -antiporter in the membranes of root vacuoles was revealed. Thus, under prolonged salt exposure, Methyure increases the activity of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -antiporter in the vacuolar membrane of the root and, on the contrary, Ivin reduces it, which may be due to the differences in chemical composition of these heterocyclic drugs. The results, that were obtained, indicate that the salt-protective effect of the heterocyclic drug Methyure may also be due to its effect on the functional activity of the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -antiporter in the vacuolar membrane of corn root.

Keywords: $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -antiporter, vacuolar membrane, root, corn, salinization, Methyure, Ivin.