



КАТИЧЕВА

Любовь Андреевна

**Механизм изменения электрического потенциала
и динамика концентраций ионов H^+ и Ca^{2+}
в клетках высших растений
при генерации переменного потенциала**

03.01.05 – физиология и биохимия растений
03.01.02 – биофизика

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2013

Работа выполнена на кафедре биофизики ГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Н. Новгород

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Воденев Владимир Анатольевич

Официальные оппоненты:

Булычев Александр Александрович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, профессор.

Андреев Игорь Михайлович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория мембран растительных клеток, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

Защита диссертации состоится «24» декабря 2013 года в «13» часов на заседании диссертационного совета Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35.
Факс: (499) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Автореферат диссертации размещен на сайтах ВАК РФ и www.ippras.ru

Автореферат разослан « 21 » ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Способность растительных организмов адаптироваться к изменениям условий окружающей среды в первую очередь базируется на комплексной работе разных систем регуляции, включая электрофизиологическую систему. Функциональными элементами данной системы являются распространяющиеся из зоны воздействия электрические сигналы – потенциалы возбуждения, представленные двумя типами реакций – потенциалом действия (ПД) и переменным потенциалом (ВП). В настоящее время показано, что как ПД, так и ВП, способны вызывать ряд функциональных ответов, включая, изменение активности фотосинтеза, изменения уровня газообмена, дыхания, индукцию экспрессии генов (*pinII*) и др. (Dziubinska et al., 2003; Fromm, Lautner, 2007; Krol et al., 2010). Стоит отметить, что в большинстве случаев ПД и ВП вызывают однонаправленные физиологические изменения в клетках, расположенных вне зоны раздражения (Fromm, Lautner, 2007). Однако, согласно существующим представлениям, имеются различия в механизмах распространения потенциалов возбуждения по растению, и в ионной природе развивающейся электрической реакции на уровне отдельной клетки.

В отличие от ПД, распространяющегося электротонически, ВП не является самораспространяющейся электрической реакцией, а представляет собой локальный электрический ответ клеток на распространение из области повреждения гидравлической волны или химического фактора (Rhodes et al., 1999; Stahlberg et al., 2006; Vodeneev et al., 2012).

На сегодняшний день сформированы представления об ионной природе ПД у высших растений – генерация электрической реакции связана с возникновением пассивных потоков ионов Ca^{2+} , Cl^- , K^+ и временной инактивацией протонного насоса (Lautner et al., 2005; Trebacz et al., 2006; Воденеев и др., 2006).

Ионная природа изменений мембранного потенциала при ВП остаётся не до конца изученной. Несмотря на тот факт, что в отдельных работах продемонстрирована возможность формирования пассивных потоков ионов, в частности Ca^{2+} и Cl^- во время развития ВП (Zimmermann, Felle, 2009; Воденеев и др., 2011), основной гипотезой о механизме генерации электрической реакции на сегодняшний день остаётся временная инактивация протонного насоса плазматических мембран (Julien et al.,

1991; Stahlberg et al., 2006; Zimmerman, Mithofer, 2013). Аргументами в пользу данной гипотезы служат зарегистрированные неизменность сопротивления и проницаемости мембраны при развитии ВП, что говорит об отсутствии активации ионных каналов и формирования пассивных потоков ионов через них. Кроме того, в работах (Stahlberg et al., 1996, Rousset et al., 2002) показано, что внесение в среду блокаторов кальциевых, хлорных и калиевых каналов не влияет на форму ВП. Об участии протонного насоса может также свидетельствовать подавление развития ВП при действии ингибиторов метаболизма, и зарегистрированные изменения рН апопласта (Julien et al., 1991; Stahlberg, Cosgrove, 1992; 1996; Воденеев и др., 2011).

Стоит отметить, что вопрос о механизме генерации потенциалов возбуждения, и ВП в частности, тесно связан с вопросом об их физиологическом смысле для высшего растения, поскольку развитие деполяризации мембраны и сдвиги ионных концентраций, лежащих в её основе, вероятно, обуславливают процесс преобразования распространяющегося сигнала в функциональный ответ клеток. При этом, в роли основных интермедиатов данного преобразования могут выступать ионы Ca^{2+} и H^+ , как ключевые регуляторы целого ряда физиологических процессов: фотосинтеза, дыхания, экспрессии генов, роста и др. (Dziubinska et al. 2003; Sukhov et al., 2012; Булычев и др., 2013). Стоит, однако, отметить, что в настоящее время прямые сведения о динамике внутриклеточных концентраций H^+ и Ca^{2+} при генерации ВП отсутствуют.

Таким образом, раскрытие природы переменного потенциала позволит не только расширить знания о механизме генерации электрической реакции данного типа, но и будет способствовать изучению процессов развития индуцируемого им функционального ответа клеток.

Цель и основные задачи исследования

Целью работы явилось изучение изменений электрического потенциала клеток высшего растения и оценка динамики внутриклеточного рН и рСа при генерации ВП.

В связи с поставленной целью выполнялись следующие задачи:

- ингибиторный анализ изменений электрического потенциала клеток при ВП;
- оценка изменений сопротивления мембраны при генерации ВП;
- определение динамики ионов H^+ внутри клетки и апопласте при генерации ВП;

- определение динамики внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в процессе генерации ВП.

Научная новизна

Показано, что генерация ВП сопровождается падением входного сопротивления клетки. Внесение в омывающий раствор блокаторов Cl^- - и K^+ - каналов подавляет развитие ВП и препятствует сопряженному с ним падению сопротивления клетки. Формирование пассивных потоков ионов, в частности хлора - на фазе деполяризации и калия – на фазе реполяризации, вносит вклад в развитие ВП.

Выявлено, что при генерации ВП происходит переходное закисление цитозоля. Впервые выполнена количественная оценка изменений внутриклеточного рН у проростка тыквы при генерации электрической реакции.

Генерация ВП сопровождается длительным возрастанием внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Продолжительное повышение концентрации ионов Ca^{2+} в клетке связано с нахождением кальциевых каналов в открытом состоянии.

Научно-практическое значение

На результатах работы базируется предложенная схема формирования и возможного пути действия на клетки переменного потенциала, которая может служить основой для понимания механизмов преобразования сигналов о воздействии в функциональные изменения.

Адаптированная для клеток стебля целого растения методика загрузки флуоресцентных АМ-содержащих зондов может быть использована для определения изменений внутриклеточной концентрации ионов, в частности Ca^{2+} и H^+ , у интактных растений.

Основные выводы и результаты будут использованы в учебном процессе, при разработке соответствующих спецкурсов для студентов биологических факультетов ВУЗов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) В развитие изменений электрического потенциала клеток при ВП вносят вклад пассивные потоки ионов, на что указывает подавление реакции в присутствии соответствующих блокаторов ионных каналов и падение сопротивления клетки

при ВП. При этом, развитие фазы деполяризации связано с активацией хлорных каналов, а реполяризации – с активацией калиевых каналов.

- 2) Во время генерации ВП у проростков тыквы происходит переходное закисление цитозоля на $0,3 \pm 0,1$ единицы рН и защелачивание апопласта на $0,3 \pm 0,1$ единицы рН. Динамика изменений рН как внутри, так и снаружи клеток соответствует динамике электрического потенциала.
- 3) Во время генерации ВП у проростков тыквы происходит длительное увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Амплитуда изменений концентрации внутриклеточного кальция составила 300 ± 50 нМ. Продолжительное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ связано с длительным нахождением кальциевых каналов в открытом состоянии.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на 13-th Annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» (Kazan, 2009), 14-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пущино, 2010), Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, 2010), International Autumn School: Biophysics and Bioelectrochemistry for Medicine (Vulcan, 2010), Международной молодежной конференции «Нелинейная динамика в когнитивных исследованиях» (Нижний Новгород, 2011), II-ем международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011), VII Съезде ОФР (Нижний Новгород, 2011), International Symposium Topical Problems of Biophotonics (Saint-Petersburg - Nizhny Novgorod, 2011), 16-ой международной пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пущино, 2012), IV-ом Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), Международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пущино, 2013), Международной научно-практической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работы из них 7 статей в рецензируемых изданиях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав (включая обзор литературы), заключения, выводов и списка литературы. Изложена на 104 страницах, содержит 32 рисунка и 2 таблицы. Список цитируемой литературы включает 152 работы, из них 132 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования

В качестве объекта исследований использовали 2-3-недельные проростки пшеницы (*Triticum aestivum L.*) и тыквы (*Cucurbita pepo L.*). Растения выращивали гидропонным способом (керамзит, 50 % среда Хоглэнда-Арнона) в климатической камере (KBW-240, «Binder») при освещении люминесцентными лампами (16-ти часовой световой период) и температуре 24°C.

Регистрацию электрической активности производили с помощью микроэлектродной и макроэлектродной техники. Установка для внутриклеточного измерения мембранного потенциала (E_m) и сопротивления клеток включала микроскоп Olympus BX51 с автоматическими микроманипуляторами Luigs and Neumann, усилитель Multiclamp 700B (Axon Inst.) и ПК. Растение располагали на предметном столике микроскопа, при этом участок листа проростка закрепляли в кювете со стандартным раствором, содержащим 0,1мМ NaCl, 0,1мМ KCl, 0,5мМ CaCl₂. Электрод сравнения помещали в кювету, измерительный электрод с диаметром кончика около 1 μ м, заполненный 0,1 М KCl, вводили в паренхимную клетку листа пшеницы 2-3 слоя. Для анализа изменения сопротивления клеток при генерации ВП через измерительный электрод подавался переменный ток частотой 2 Гц и амплитудой 40 пА. Регистрация соответствующих изменений мембранного потенциала, генерируемых при прохождении тока заданной амплитуды, позволили оценить величину сопротивления клеток проростка путём применения закона Ома для участка цепи. Внеклеточная регистрация электрической активности осуществлялась с помощью Ag/AgCl макроэлектродов. Усилителем служил иономер универсальный ИПЛ-112, соединенный с ПК.

Индущирующее ВП повреждающее раздражение в виде ожога открытым пламенем в течение 2 с наносили на кончик листа.

Ингибиторный анализ базировался на оценке изменения параметров ВП клетки при внесении в среду ингибиторов за час до нанесения раздражения. Были использованы: специфический ингибитор протонного насоса – ортованадат натрия (0,1 мМ) хелатор ионов Ca²⁺ - ЭГТА(1 мМ), блокатор анионных каналов - этакриновая кислота (0,5мМ) и блокатор калиевых каналов – тетраэтиламмоний (ТЭА) (0,5 мМ).

Для регистрации изменений концентрации ионов H⁺ и Ca²⁺ при ВП применяли флуоресцентные зонды FITC-dextran, BCECF,AM , Fluo-4,AM и Fura-2,AM. Загрузка в

растение FITC-dextran производилась путём 12-14 часовой инкубации участка проростка с удалённым эпидермисом в растворе зонда. Для загрузки АМ-содержащих зондов внутрь клеток проростка применялась методика низкотемпературной загрузки (Zhang et al., 1998). С целью предотвращения расщепления АМ-компонента эстеразами апопласта участок проростка, погруженный в раствор зонда инкубировали при температуре 4°C. Продолжительность низкотемпературного этапа экспериментально подбирали в ходе работы. Затем при комнатной температуре проросток отмывали от зонда путем четырёх-пяти кратной замены стандартного раствора в ячейке.

Регистрацию флуоресценции проводили на комплексе лазерной сканирующей микроскопии Carl Zeiss LSM 510 META (инвертированный микроскоп Axiovert 200M, лазерный сканирующий модуль, спектральный модуль Carl Zeiss 23 META). Проросток располагали на предметном столике микроскопа, участок стебля, ранее погруженный в раствор зонда, размещался в ячейке, содержащей стандартный раствор объемом 3 мл. Дном ячейки служило покровное стекло. Формирование изображений осуществлялось с использованием объектива Plan Achromat 40x/0,6 Korr. Для возбуждения флуоресценции использовался аргоновый лазер (488нм). Флуоресценция регистрировалась в двух спектральных диапазонах: 500-550 нм («зеленый канал») и 650-710 нм («красный канал»). Одновременно с регистрацией флуоресценции осуществлялась запись электрической активности.

Для количественного анализа сдвигов рН регистрацию флуоресценции осуществляли с помощью спектрофлуориметра SHIMADZU RF-5301 PC. Для изучения зависимости параметров флуоресценции FITC-dextran и BCECF, АМ от концентрации H^+ использовали буферные растворы (Tris-MES, 20 мМ) с различным значением рН (от 4,5 до 8 с шагом 0,5 единиц). Для изучения зависимости параметров флуоресценции Ca^{2+} -чувствительного зонда Fura-2 от концентрации Ca^{2+} использовали растворы с различным рСа (от 5 до 8 с шагом 0,5 единиц). Анализ осуществляли путём последовательного снятия спектров возбуждения во времени при регистрации флуоресценции от загруженных зондом проростка на длине волны 520 нм.

Эксперименты проводили в 5–10-кратной биологической повторности. В результатах представлены средние значения величин и стандартное отклонение, а также типичные записи отдельных измерений.

Результаты и их обсуждение

Механизм изменения электрического потенциала клеток при генерации ВП

Типичная запись электрической реакции клетки листа пшеницы на ожог представлена на рис.1. Исходный уровень мембранного потенциала составлял -98 ± 3 мВ. Параметры ВП, индуцированного ожогом, были следующими: амплитуда ВП ($A_{ВП}$): 75 ± 4 мВ; скорость деполяризации (v_D): $11,09 \pm 0,9$ мВ/с; скорость реполяризации (v_R): $0,54 \pm 0,09$ мВ/с.

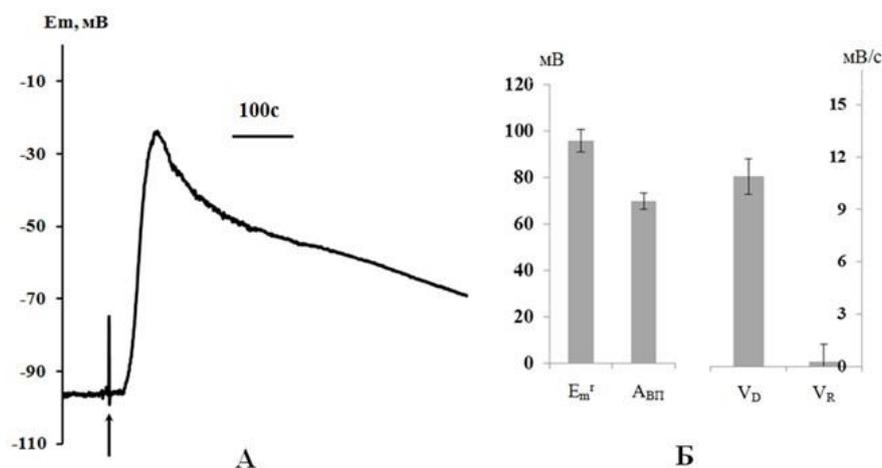


Рис. 1. Вариабельный потенциал клетки листа пшеницы. А – типичная запись изменения электрического потенциала мембраны во времени при нанесении ожога на лист проростка; Б – параметры ВП клеток листа пшеницы (усреднение по 20 измерениям)

E_m – мембранный потенциал, E_m^r – мембранный потенциал в покое, $A_{ВП}$ – амплитуда ВП, v_D – скорость деполяризации, v_R – скорость реполяризации.

Момент нанесения ожога обозначен стрелкой. Расстояние от зоны раздражения до зоны регистрации – 5 см.

Для определения природы ионных токов, участвующих в формировании ВП использовали ингибиторы тех транспортных систем, функционирование которых имеет определяющую роль в электрогенезе высших растений в покое и при возбуждении.

В соответствии с данными литературы генерация ВП связана с переходной инактивацией H^+ -АТФазы (Julien et al., 1991; Stahlberg and Cosgrove, 1997). В наших экспериментах для подавления активности был использован прямой ингибитор H^+ -АТФазы – ортованадат натрия. Внесение ортованадата вызывает значительную деполяризацию мембраны до величины 65 ± 3 мВ. Электрическая реакция на ожог при этом практически отсутствует (рис.2А). Данный результат соответствует имеющимся в литературе сведениям об ионной природе ВП и указывает на возможное участие H^+

АТФазы в процессе генерации электрической реакции на ожог. В то же время, деполяризация мембраны в присутствии ортованадата приводит к нарушению электрохимических градиентов других ионов, которые могут вносить вклад в генерацию ВП.

Удаление из омывающего раствора ионов Ca^{2+} путём внесения хелатора ЭГТА значительно подавляло развитие ВП (рис. 2Б), что указывает на необходимость входа кальция из внеклеточного пространства для генерации электрической реакции, что согласуется с данными литературы (Julien et al., 1991; Stahlberg et al., 1992).

Блокатор анионных каналов этакриновая кислота значительно подавляет амплитуду и скорость деполяризации при ВП. Данный результат может указывать на то, что формирование переднего фронта ВП определяется выходящим потоком анионов (рис.2В). Анализ существующих на мембране ионных градиентов (Опритов и др., 1991; Stahlberg et al., 2006) позволяет предположить, что такими анионами являются Cl^- . Возможная роль ионов Cl^- в деполяризации мембраны также подтверждается данными литературы об изменении pCl омывающего раствора при генерации ВП (Zimmerman, Felle, 2009; Воденев и др., 2011).

Для оценки участия ионов калия в процессе генерации ВП был использован блокатор калиевых каналов ТЕА. Стоит отметить, что внесение в среду ТЕА, как и этакриновой кислоты и ЭГТА, не оказывало значительного влияния на уровень мембранного потенциала в покое. При блокировании калиевых каналов амплитуда электрической реакции также меняется незначительно, однако заметно подавляется скорость реполяризации (рис.2Г).

Таким образом, результаты ингибиторного анализа указывают на вклад хлорных и калиевых ионных токов в генерацию ВП. При этом именно активация хлорных и калиевых каналов определяет падение сопротивления мембраны у высших растений при развитии электрической реакции другого типа – потенциала действия (ПД) (Samejima and Sibaoka, 1982). На следующем этапе нами была произведена оценка динамики сопротивления клетки при развитии электрической реакции на ожог в нормальных условиях и при внесении блокаторов ионных каналов.

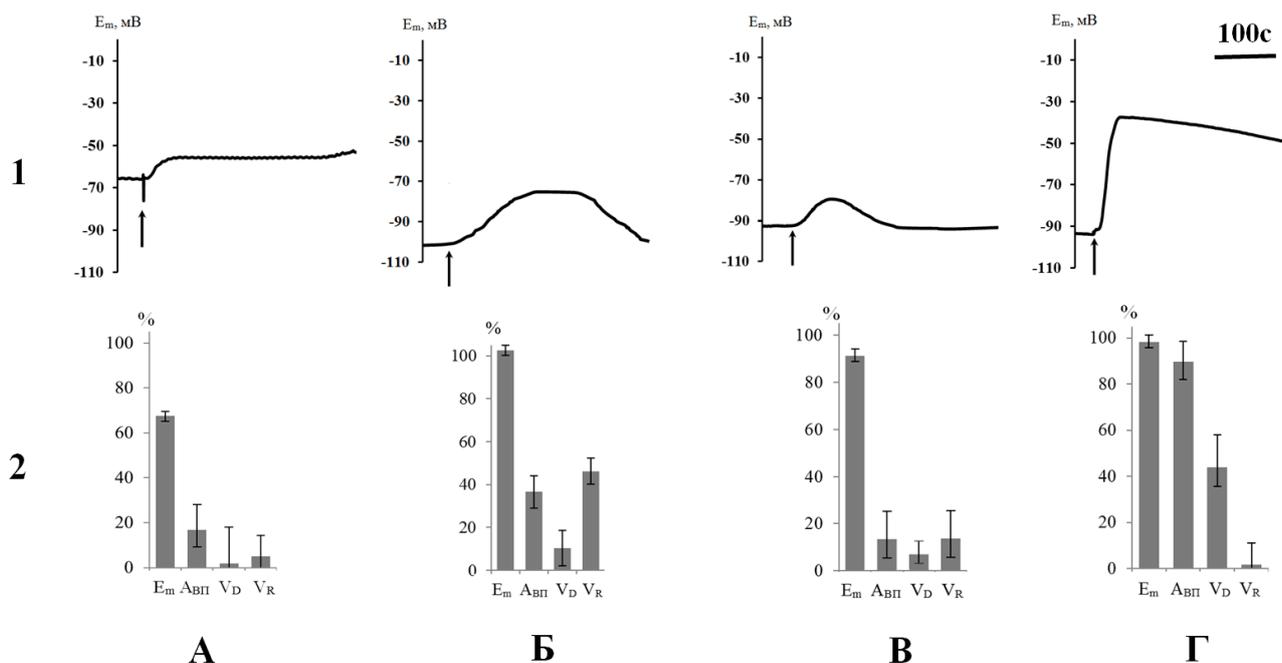


Рис. 2. Влияние ингибиторов на генерацию ВП, индуцированного ожогом кончика листа пшеницы. А –ингибитор H^+ -АТФазы ортованадат натрия (0.1мМ); Б – блокатор анионных каналов этакриновая кислота (0.5мМ); В – хелатор ЭГТА (0.5мМ); Г – блокатор калиевых каналов ТЕА (0.5мМ).

E_m – мембранный потенциал, E_m^r -мембранный потенциал в покое, $A_{ВП}$ – амплитуда ВП, V_D -скорость деполяризации, V_R -скорость реполяризации.

Момент нанесения ожога обозначен стрелкой. Расстояние от зоны раздражения до зоны регистрации – 5 см. Параметры электрической реакции на диаграммах представлены в процентах от контроля (усреднение по 5-7 измерениям).

Для оценки сопротивления через измерительный электрод подавался переменный ток заданной амплитуды. Перед измерением сопротивления во время генерации ВП, были подобраны параметры импульсов тока, пропускание которого не вызывало изменений электрического потенциала (рис. 3А). На рисунке 3Б показано изменение сопротивления при генерации ВП в листе пшеницы. Как видно из рисунка, генерация реакции сопровождается заметным падением величины входного сопротивления клетки. Это может указывать на активацию ионных каналов, во время генерации электрической реакции на ожог.

В присутствии ЭК электрическая реакция не сопровождается заметным падением сопротивления, при этом амплитуда электрического ответа значительно подавлена (рис.4А).

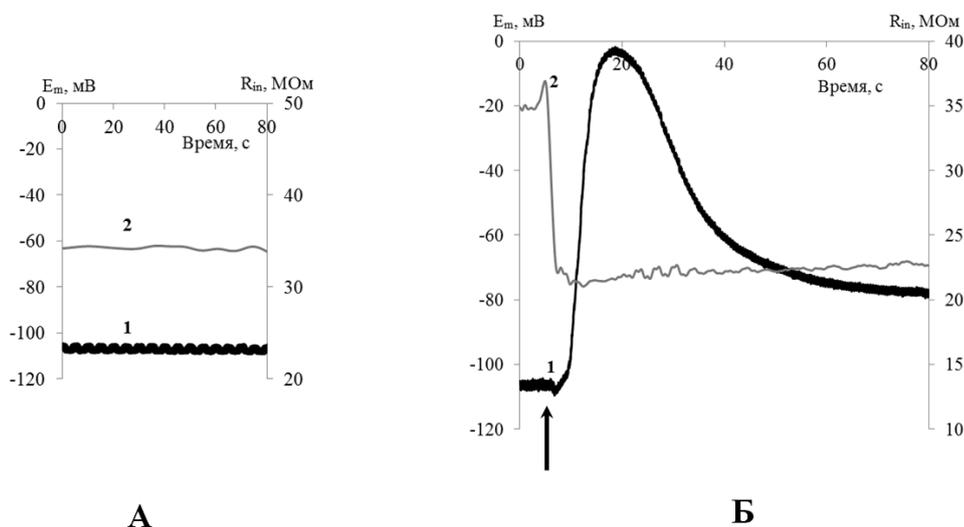


Рис. 3. Изменения мембранного потенциала (1) и входного сопротивления клеток (2). А – в покое, Б – при генерации ВП в листе пшеницы. E_m – мембранный потенциал, R_{in} -входное сопротивление клеток. Момент нанесения ожога обозначен стрелкой. Расстояние от зоны раздражения до зоны регистрации – 5 см

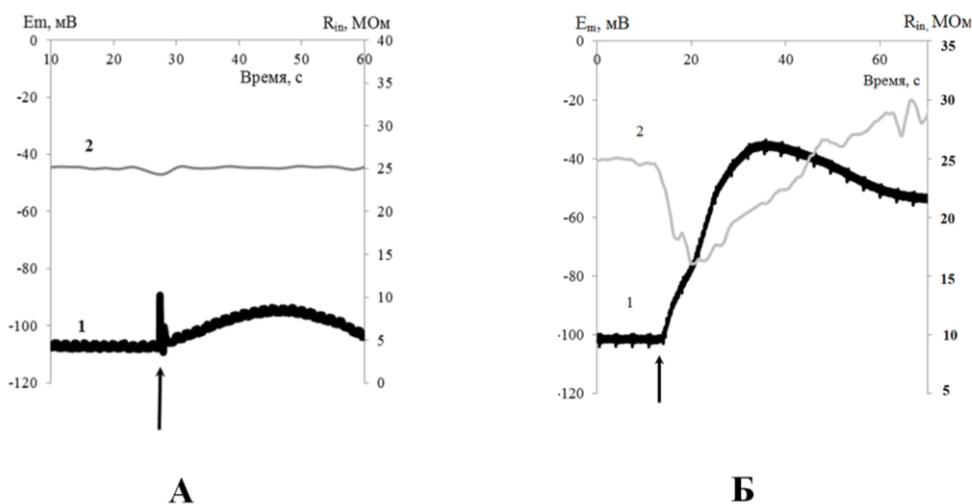


Рис. 4. Изменения мембранного потенциала (1) и входного сопротивления клеток (2) при ВП: А – при внесении блокатора анионных каналов (ЭК, 0.5мМ); Б –при внесении блокатора калиевых каналов (ТЭА, 0.5мМ). Момент нанесения ожога обозначен стрелкой. Расстояние от зоны раздражения до зоны регистрации – 5 см

Данный результат может указывать на то, что основной вклад в снижение сопротивления при деполяризации вносит активация анионных(Cl^-) каналов. В присутствии ТЭА, амплитуда ВП меняется незначительно по сравнению с контролем. Деполяризация мембраны сопровождается падением сопротивления, которое, однако, быстро возвращается к исходному уровню на фазе реполяризации (рис.4Б). Можно предположить, что активация калиевых каналов и нахождение их в открытом состоянии

определяет низкие значения сопротивления на фазе реполяризации в отсутствие ингибиторов (рис.2Б)

Таким образом, зарегистрированное падение сопротивления клеток при генерации ВП и результаты ингибиторного анализа указывают на активацию хлорных и калиевых каналов и вклад возникающих пассивных токов ионов Cl^- и K^+ в развитие быстрых изменений электрического потенциала.

Динамика рН цитоплазмы и апопласта при генерации ВП

Согласно выдвигаемым предположениям, одним из вероятных путей развития индуцированного переменным потенциалом функционального ответа является изменение величины рН (Пятыгин и др., 2008; Grams et al., 2009; Sukhov et al., 2012), вероятно, сопровождающее генерацию электрической реакции. Однако, несмотря на то, что возможность участия H^+ -АТФазы в процессе генерации ВП подтверждена путём ингибиторного анализа, проведённого как в нашей работе, так и работах других исследователей (Julien et al., 1991; Stahlberg et al., 1996), прямые сведения об изменениях внутриклеточного рН при ВП отсутствуют, а изменения рН апопласта зарегистрированы в единичных работах. Таким образом, оценка непосредственных сдвигов рН как апопласта, так и цитоплазмы является важным этапом исследования процесса преобразования электрического сигнала в функциональный ответ.

Использование метода флуоресцентного анализа для оценки изменений концентрации ионов в первую очередь требует избирательной доставки флуоресцентных зондов в объект. В ходе работы нами были адаптированы имеющиеся методы загрузки флуоресцентных зондов в апопласт и клетки стебля интактного проростка тыквы. В частности, подобраны продолжительности различных этапов загрузки, а также определены наиболее подходящие флуорофоры. Для верификации загрузки и локализации зондов, были получены 3-D изображения внутренней структуры загруженных и не загруженных зондами проростков, а также проведён спектральный анализ полученных изображений.

На рисунках 5 и 6 приведён пример подобных 3-D изображений и спектров флуоресценции проростков, загруженных рН-чувствительным зондом FITC-dextran. Из рисунков видно, что данный зонд избирательно накапливается в апопласте (рис.5, рис.6). На основании сходного подхода было определено, что содержащий АМ-

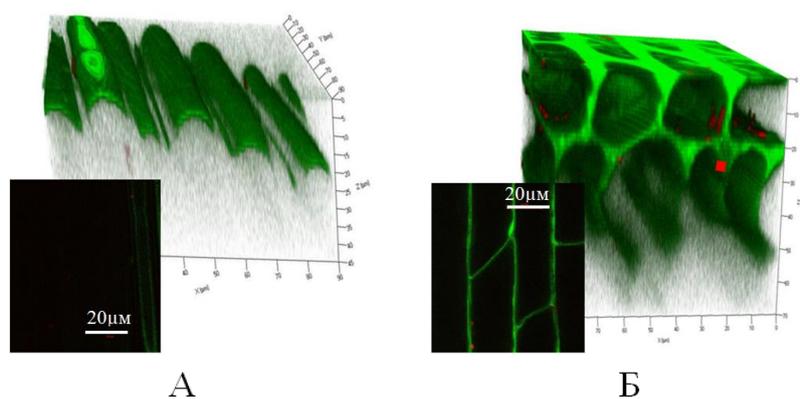


Рис. 5. 3-D изображения незагруженного (А) и загруженного зондом FITC-dextran (Б) проростка тыквы. На вставках представлен отдельный оптический срез на глубине 20 мкм. Зеленый канал (500-550нм) соответствует флуоресценции зонда, красный(650-710нм) –автофлуоресценции хлоропластов. $\lambda_{ex} = 488\text{нм}$

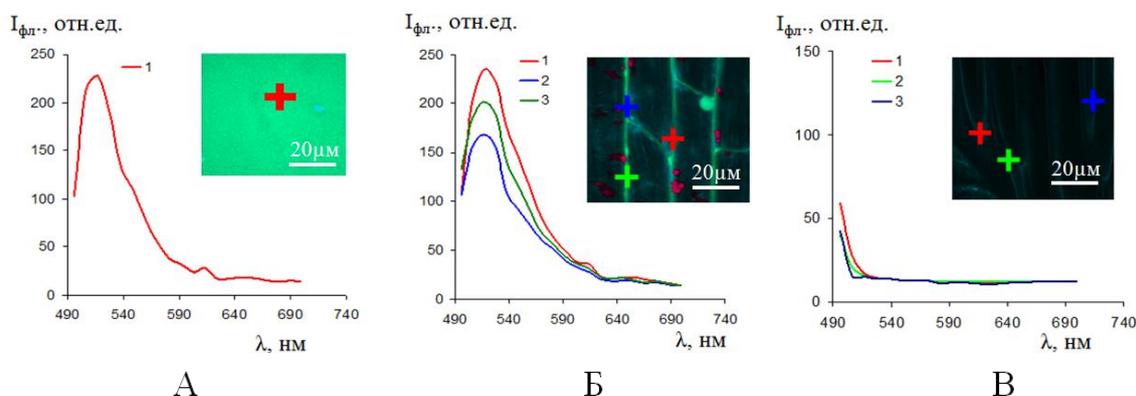


Рис. 6. Спектры флуоресценции раствора FITC-dextran (А), загруженного (Б) и незагруженного (В) зондом проростков тыквы. Маркерами отмечены точки снятия спектров. Зеленый канал (500-550нм) соответствует флуоресценции зонда, красный(650-710нм) –автофлуоресценции хлоропластов. $\lambda_{ex} = 488\text{нм}$

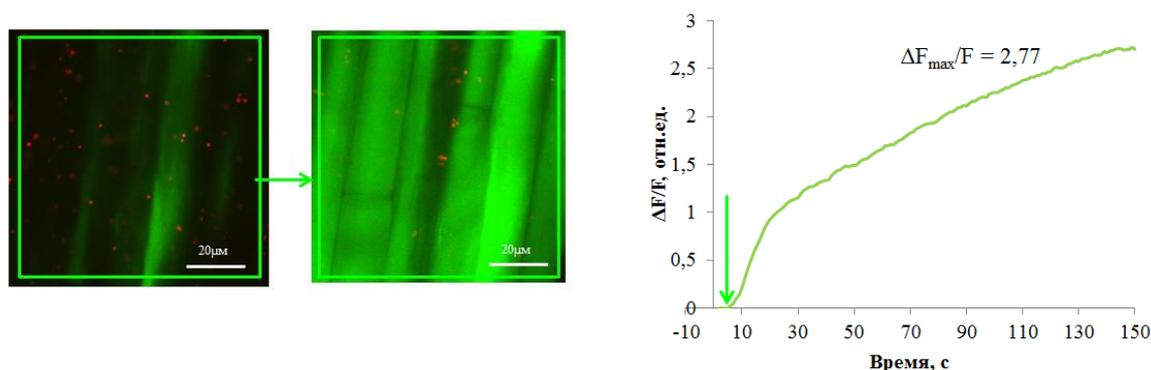


Рис. 7. Изменения интенсивности флуоресценции загруженного зондом ВСЕСФ проростка тыквы при внесении в среду протонофора КЦХФГ(0,01мМ). Приведены изображения участка стебля на глубине 30 мкм и зависимость относительного изменения интенсивности во времени. Стрелка указывает момент внесения протонофора. Маркером отмечена область регистрации флуоресценции. Зеленый канал (500-550нм) соответствует флуоресценции зонда, красный(650-710нм) –автофлуоресценции хлоропластов. $\lambda_{ex} = 488\text{нм}$

компонент рН-чувствительный зонд BCECF накапливается во внутриклеточном пространстве. Предварительно была проведена регистрация флуоресценции зонда при искусственном изменении рН цитоплазмы путём внесения протонофора КЦХФГ в сочетании с буферными растворами. На рис. 7 показано усиление интенсивности флуоресценции зонда при искусственном защелачивании клетки.

Генерация ВП сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции зонда FITC-dextran, что говорит о переходном защелачивании апопласта (рис. 8а). Снижение интенсивности флуоресценции внутриклеточно расположенного зонда BCECF свидетельствует о закислении цитозоля (рис.8б). При этом динамика изменений рН соответствует динамике изменения электрического потенциала при ВП.

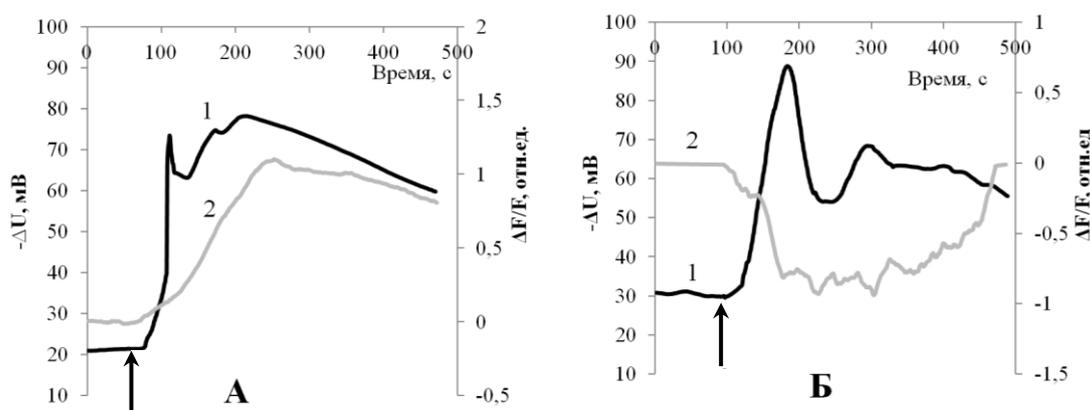


Рис. 8. Изменения интенсивности флуоресценции рН-чувствительного зонда FITC-dextran(А) и BCECF(Б) и развитие электрического ответа при генерации ВП у проростка тыквы.

1 – изменения разности потенциалов(ΔU) проростка тыквы; 2 – изменения интенсивности флуоресценции зонда ($\Delta F/F$).

Момент нанесения ожога обозначен стрелкой. Расстояние от зоны раздражения до зоны регистрации – 5 см

Необходимым этапом работы явилась количественная оценка сдвигов рН цитозоля и апопласта при ВП. Одним из способов определения абсолютных значений концентрации ионов является ратиометрический анализ, основанный на отношении интенсивностей флуоресценции зонда, при его возбуждении на двух длинах волн (Takahashi et al., 2001). Преимуществом данного метода является отсутствие зависимости от концентрации зонда, что особенно важно при работе с интактным объектом, абсолютное содержания загруженного зонда в котором определить невозможно.

Для флуоресцентного зонда FITC-dextran используется отношение интенсивности флуоресценции при возбуждении зонда на длине волны 490нм (I_{490}) к интенсив-

ности флуоресценции при возбуждении на длине волны 460нм (I_{460}) (Hedrich et al., 2001) при регистрации флуоресценции на длине волны 520нм. Предварительно была определена зависимость I_{490}/I_{460} от величины рН. Было показано, что во время формирования электрической реакции увеличивается рН апопласта (рис.9А). Средняя величина изменений рН составила $0,3\pm 0,1$ единицы рН (рис.9А).

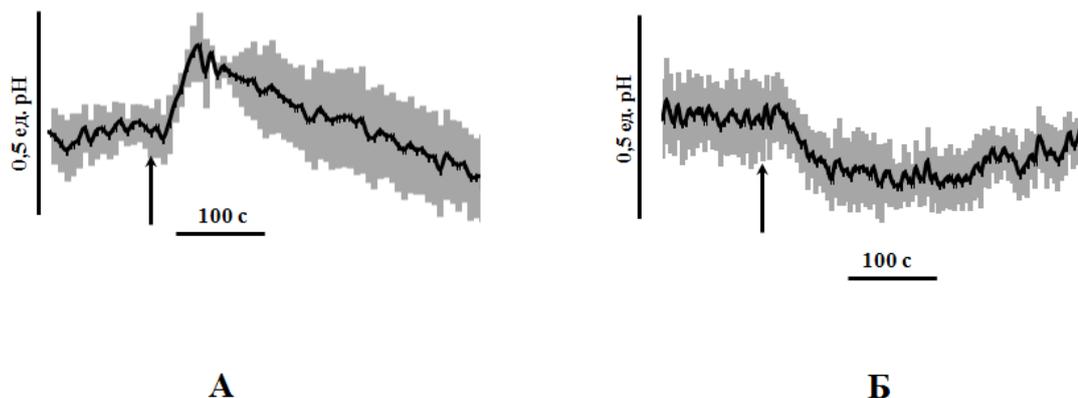


Рис. 9. Изменения величины рН при генерации ВП стебля тыквы.

А - Изменения рН апопласта при генерации ВП, рассчитанные с помощью отношения интенсивностей флуоресценции рН-чувствительного зонда FITC-dextran, при его возбуждении на длинах волн 490 и 460нм, соответственно.

Б – Изменения рН клетки при генерации ВП, рассчитанные с помощью отношения интенсивностей флуоресценции рН-чувствительного зонда BCECF, при его возбуждении на длинах волн 490 и 450нм, соответственно. Серым цветом отмечено стандартное отклонение.

Момент ожога обозначен стрелкой. Раздражение наносилось в 5 см от зоны регистрации флуоресценции.

Для определения внутриклеточного рН было использовано отношение I_{490}/I_{450} зонда BCECF от величины рН (Voens et al., 2006). Генерация ВП сопровождалась переходным снижением рН цитоплазмы на величину $0,3\pm 0,1$ ед. рН (рис.9Б).

Величины сдвигов рН цитозоля и апопласта при генерации ВП сопоставимы с таковыми при действии на растения ряда биотических и абиотических стресс-факторов, а также при действии гормонов. Так, в ряде работ показано закисление цитоплазмы при аноксии на 0,6 ед.рН (Fox et al., 1995; Felle, 1996), внесении ауксинов на 0,2 ед.рН (Felle, 2001), олигогалактуронидов и других элиситоров в среднем на 0,4 ед.рН (Mathieu et al., 1996). Защелачивание апопласта на 0,3-0,4 ед.рН наблюдалось при внесении солей (20mM KCl, 20mM NaCl) и АБК (Felle and Hanstein, 2002). Таким образом, сдвиги рН в клетке, и межклеточном пространстве, сопровождающие ВП, и вызываемые прямым действием стресс-факторов, сходны как по величине, так и по

направлению изменений. Данный результат может указывать на функциональную роль ВП как распространяющегося стрессового сигнала, вызывающего локальные изменения рН у клеток, не подвергшихся воздействию повреждающего фактора.

Определение динамики внутриклеточной концентрации ионов кальция при генерации ВП.

Ключевым моментом в запуске ответных реакций клеток при генерации ВП могут также являться сдвиги внутриклеточной концентрации ионов кальция. Первым этапом анализа изменений рСа при ВП являлось определение возможности применения флуоресцентных Ca^{2+} -чувствительных зондов для работы с клетками интактных растений. Как видно из рисунка 10, вызываемое внесением кальциевого ионофора значительное увеличение концентрации ионов Ca^{2+} внутри клетки сопровождается резким повышением уровня интенсивности флуоресценции зонда Fluo-4. Такой результат может свидетельствовать в пользу внутриклеточной локализации и возможности использования данного флуорофора для оценки изменений концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме.

В дальнейшем нами была проведена регистрация изменения интенсивности флуоресценции Fluo-4, загруженного в клетки стебля проростка тыквы, при генерации ВП, индуцированного ожогом семядольного листа.

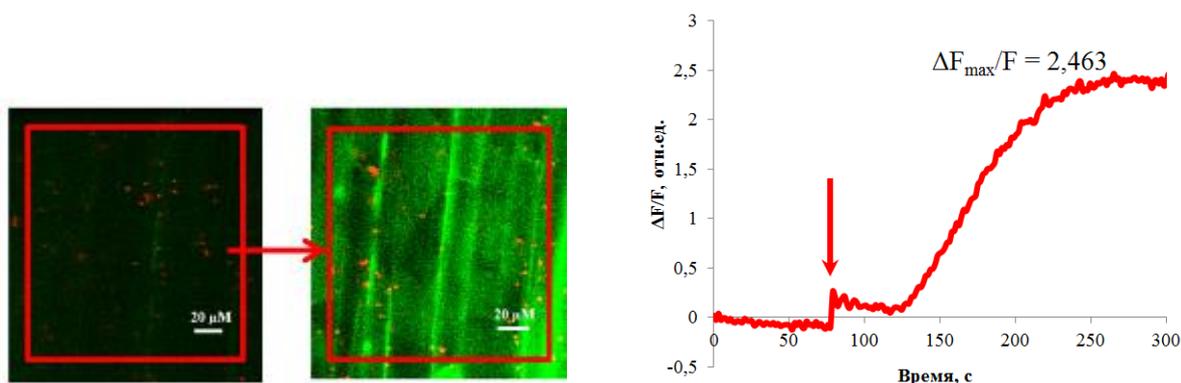


Рис. 10. Изменения интенсивности флуоресценции загруженного зондом Fluo-4 проростка тыквы при внесении в среду кальциевого ионофора A23187(0,025мМ). Приведены изображения участка стебля на глубине 30 мкм и зависимость относительного изменения интенсивности флуоресценции во времени. Зеленый канал (500-550нм) соответствует флуоресценции зонда, красный(650-710нм)—автофлуоресценции хлоропластов. Стрелка указывает момент внесения A23187. Маркером отмечена область регистрации флуоресценции. Концентрация ионов Ca^{2+} в омывающем растворе – 10^{-3} М.

При генерации ВП нами было зарегистрировано увеличение интенсивности флуоресценции зонда, которое свидетельствует об увеличении концентрации свободного кальция в цитоплазме (рис. 11). Как видно из рисунка, динамика увеличения концентрации хорошо соответствует изменениям электрического потенциала.

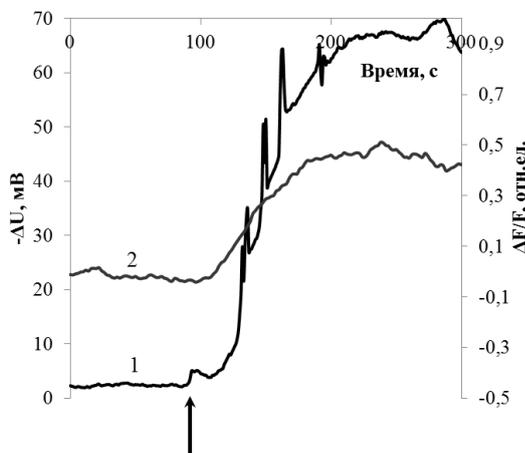


Рис. 11. Изменения интенсивности флуоресценции Ca^{2+} -чувствительного зонда и развитие электрического ответа при генерации ВП у проростка тыквы. 1 – изменения разности потенциалов (ΔU) проростка тыквы; 2 – изменения интенсивности флуоресценции зонда ($\Delta F/F$). Момент нанесения ожога обозначен стрелкой. Расстояние от зоны раздражения до зоны регистрации – 5 см

Для количественной оценки изменений pCa при генерации ВП нами был использован флуоресцентный зонд Fura-2, AM. Для ратиометрического определения pCa у данного флуорофора используется отношение I_{380}/I_{340} (Allen et al., 1999). Нами было показано, что генерации ВП у проростка тыквы соответствует увеличение концентрации внутриклеточного кальция в среднем на 300 нМ (рис. 12).

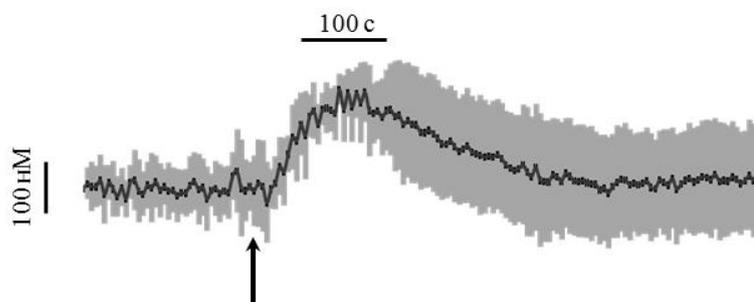


Рис. 12. Изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток стебля тыквы при генерации индуцированного ожогом листа ВП, рассчитанные с помощью отношения интенсивностей флуоресценции Ca^{2+} -чувствительного зонда Fura-2, при его возбуждении на длинах волн 380 и 340 нм, соответственно. Серым цветом отмечено стандартное отклонение. Стрелкой обозначен момент нанесения ожога. Расстояние от зоны раздражения до зоны регистрации – 5 см

Такой результат не встречает противоречий с данными литературы об амплитуде кальциевых сигналов при действии на растения гормонов, биотических и абиотических стресс-факторов. Так, внесение в среду ИУК приводило к осцилляциям внутриклеточного кальция у клеток coleoptилей кукурузы в среднем на 200 нМ (Felle, 1988), резкие изменения температур или освещения вызывали кальциевые сигналы с амплитудой 200-500нМ (Miller and Sanders, 1987; Knight et al., 1996) и др. Сходства в амплитуде сдвигов pCa , как и в случае со сдвигами pH , сопровождающими электрическую реакцию, могут указывать на функциональную роль переменного потенциала в развитии ответных реакций у клеток, не подвергшихся непосредственному воздействию стресс-фактора.

Необходимо отметить, что увеличение концентрации ионов кальция при генерации ВП носит более продолжительный характер, нежели при генерации потенциала действия (Fisahn et al., 2004). В связи с этим нами было выдвинуто предположение о том, что более длительные изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция при ВП могут быть связаны с более продолжительной работой кальциевых каналов.

Эксперимент по оценке времени нахождения кальциевых каналов в открытом состоянии был проведён следующим образом. Проросток инкубировался в присутствии хелатора ионов кальция ЭГТА, ВП был индуцирован ожогом листа, после чего в раствор на различных временных промежутках после нанесения раздражения был добавлен Ca^{2+} (рис.13). Как видно из рисунка, добавление ионов кальция оказывает влияние на амплитуду электрического ответа до 30 секунды включительно, при этом их внесение в среду на 40 секунде после нанесения ожога уже не приводит к регистрируемым изменениям электрической активности клеток.

Полученные результаты могут указывать на длительную активацию кальциевых каналов. Однако обнаруженный период (до 30 сек), в течение которого способна развиваться деполяризация не может быть однозначно интерпретирован как время жизни кальциевых каналов в открытом состоянии. Можно предположить, что лиганд-зависимые кальциевые каналы, инициирующие развитие ВП, активируются распространяющимся химическим сигналом. Продолжительность входа кальция в клетку в данном случае будет обусловлена динамикой концентрации химического агента у поверхности клетки. При этом, возможна как многократная активация кальциевых каналов присутствующим у поверхности клетки агентом, так и длительное нахождение в

открытом состоянии исходно активированного канала. По-видимому, именно длительное нахождение кальциевых каналов в открытом состоянии обеспечивает продолжительное увеличение концентрации кальция в клетке и как следствие более медленные по сравнению с ПД изменения электрического потенциала.

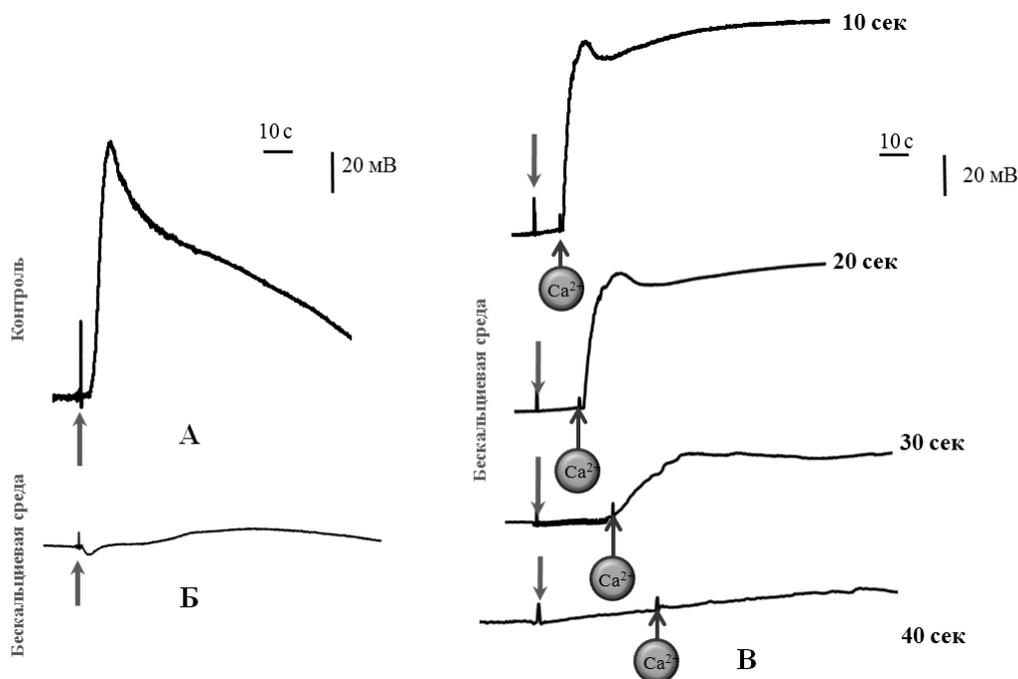


Рис. 13. Изменения электрического потенциала клеток, индуцированные ожогом листа.

А - в контроле; Б - в бескальциевой среде (ЭГТА, 1 мМ); В - в бескальциевой среде с последующим добавлением Ca^{2+} в омывающий раствор на различных временных промежутках.

Стрелка указывает момент нанесения раздражения. Окружности с надписью « Ca^{2+} » и стрелками отмечают момент внесения ионов Ca^{2+} в раствор. Расстояние от зоны раздражения до зоны регистрации – 5 см

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным в работе результатам и данным литературы, общую схему генерации ВП клетки можно представить следующим образом (рис.14). Локальное повреждение ведет к распространению сигнала (Malone et al., 1994; Rhodes et al., 1999; Stahlberg et al., 2006; Vodeneev et al., 2012), который по мере прохождения по растительному организму вызывает активацию кальциевых каналов, что ведет к повышению концентрации кальция внутри клеток.

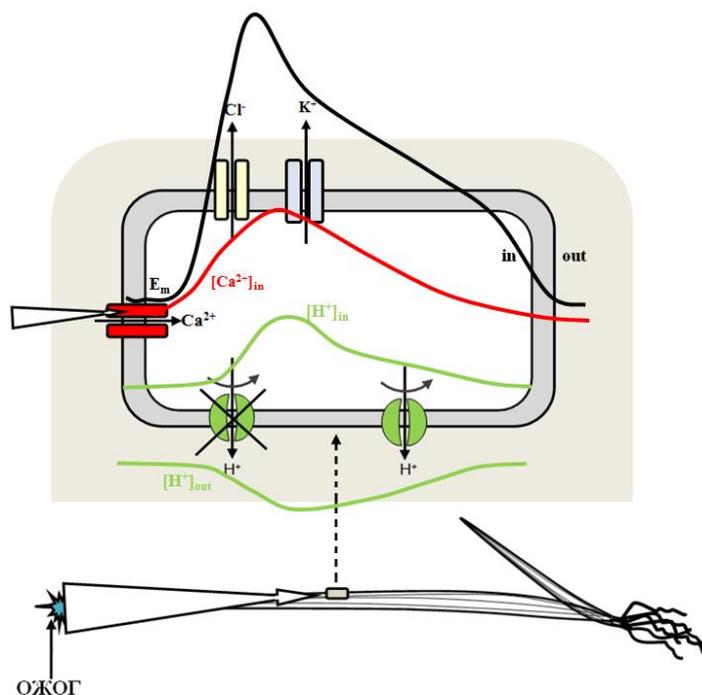


Рис. 14. Предполагаемая схема механизма генерации переменного потенциала в клетке высшего растения.

E_m – трансмембранная разность потенциалов, $[Ca^{2+}]_{in}$ – внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} , $[H^+]_{in}$ – внутриклеточная концентрация протонов, $[H^+]_{out}$ – концентрация протонов в апопласте.

Зарегистрированное падение мембранного сопротивления при развитии деполяризации, а также ингибиторный анализ указывают на вклад в изменения электрического потенциала мембраны пассивных потоков хлора и калия. Активацию анионных каналов, вероятно, вызывает вход ионов кальция в клетку (Lewis et al., 1997; Sukhov et al., 2013). Кроме того, увеличение концентрации внутриклеточного кальция может вызывать инактивацию H^+ -АТФазы (De Nisi et al., 1999; Воденев и др., 2006). Подавление активности протонного насоса влечет за собой изменения pH снаружи и внутри клеток, а также наряду с выходящим потоком ионов хлора приводит к развитию деполяризации. Деполяризация мембраны до определённого уровня вероятно в свою очередь ведёт к открытию калиевых каналов и соответствующему выходу ионов калия из клеток. Выходящий поток ионов калия и реактивация протонной АТФазы формируют фазу реполяризации ВП. Таким образом, природа ионных потоков, формирующих ВП клеток сходна с таковой для ПД.

Согласно полученным в ходе выполнения работы результатам, генерация вари-абельного потенциала сопровождается сдвигами внутриклеточных концентраций ионов H^+ и Ca^{2+} . При этом известно, что рН и рСа являются регуляторами целого ряда физиологических процессов в клетке (Reddy, 2001; Felle, 2001; Тарчевский, 2001; Медведев, 2005). По всей видимости, связанные с генерацией потенциалов возбуждения сдвиги концентраций H^+ и Ca^{2+} лежат в основе преобразования распространяющегося сигнала в функциональный ответ (Dziubinska et al. 2003; Krupenina, Bulychев, 2007; Sukhov et al., 2012). Выявленные сходства в ионной природе ПД и ВП, могут лежать в основе однонаправленных функциональных изменений, индуцированных потенциалами возбуждения.

ВЫВОДЫ:

1. В развитие изменений электрического потенциала клеток при ВП вносят вклад пассивные потоки ионов, на что указывает подавление реакции в присутствии соответствующих блокаторов ионных каналов и падение сопротивления клетки при ВП. При этом, развитие фазы деполяризации связано с активацией хлорных каналов, а реполяризации – с активацией калиевых каналов.
2. Во время генерации ВП у проростков тыквы происходит переходное закисление цитозоля на $0,3 \pm 0,1$ ед.рН и защелачивание апопласта на $0,3 \pm 0,1$ ед.рН. Динамика изменений рН как внутри, так и снаружи клеток соответствует развитию электрической реакции.
3. Во время генерации ВП у проростков тыквы происходит длительное увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Амплитуда изменений концентрации внутриклеточного кальция составила 300 ± 50 нМ. Продолжительное увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ связано с длительным нахождением кальциевых каналов в открытом состоянии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Воденеев В.А., Акинчиц Е.К., Орлова (Катичева) Л.А., Сухов В.С., Балалаева И.В. Регистрация изменений внеклеточного рН методом конфокальной микроскопии при генерации потенциалов возбуждения у высшего растения. Цитология. 2010. №7(52). С. 594-599.
2. Орлова (Катичева) Л.А., Акинчиц Е.К., Сергеева Е.А., Неруш В.Н., Воденеев В.А. Оценка возможности применения флуоресцентных зондов для анализа изменений концентрации внутриклеточного кальция при генерации потенциалов возбуждения у высших растений. Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. 2011. № 2(2). С. 208-214.
3. Воденеев В.А., Акинчиц Е.К., Орлова (Катичева) Л.А., Сухов В.С. Анализ роли ионов Ca^{2+} , H^+ , Cl^- в генерации переменного потенциала у высшего растения *Cucurbita pepo* L. Физиология растений. 2011. № 6 (58). С. 826-833
4. Vodeneev V., Orlova A., Morozova E., Orlova (Katicheva) L., Akinchits E., Orlova O., Sukhov V. The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves. Journal of Plant Physiology. 2012. V. 169(10). P. 949-54.
5. Sukhov V., Orlova (Katicheva) L., Mysyagin S., Sinitsina J., Vodeneev V. Analysis of photosynthetic response induced by variation potential in geranium. Planta. 2012. V.235. P.703-712.
6. Катичева Л.А., Сурова Л.М., Шерстнева О.Н., Бушуева А.В., Глинская Е.В., Воденеев В.А. Изменение электрического сопротивления плазмалеммы клеток высшего растения при генерации переменного потенциала. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2013. № 3(1). С. 151-154
7. Sukhov V., Akinchits E., Katicheva L., Vodeneev V. Simulation of Variation Potential in Higher Plant Cells. The Journal of Membrane Biology. 2013. V.246 (4). P. 287-296.

Тезисы:

8. Орлова (Катичева) Л.А., Акинчиц Е.К. Изменение внеклеточного рН при генерации потенциалов возбуждения у высших растений. Всероссийская конференция «Симбиоз Россия 2009»: тез. док. Пермь. 2009. С. 148-149.
9. Orlova (Katicheva) L., Akinchits E. Changes of extracellular pH by generation potential in higher plants. 13-th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders»: abstract. Kazan. 2009. P. 91.
10. Орлова (Катичева) Л.А., Акинчиц Е.К., Балалаева И.В., Воденеев В.А. Исследование механизма генерации потенциала действия у высших растений с помощью метода конфокальной микроскопии. 14-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века»: тез. док. Пущино. 2010. С. 214.
11. Orlova (Katicheva) L., Akinchic E., Balalaeava I., Nerush V., Vodeneev V. Research of ionic concentration changes at generation of excitation potentials in higher plants

- by confocal microscopy. International Autumn School: Biophysics and Bioelectrochemistry for Medicine: Basic Concepts, New Techniques and Application Perspective. Vulcan. 2010. P.11.
12. Орлова (Катичева) Л.А., Акинчиц Е.К., Воденеев В.А. Регистрация изменений рН апопласта высшего растения при генерации потенциалов возбуждения методом спектрофлуориметрии. III Всероссийская научно-практическая конференция «Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования»: сб. статей. Нижний Тагил. 2010. С. 16-18.
 13. Орлова (Катичева) Л.А., Акинчиц Е.К. Роль ионов Ca^{2+} и H^+ в формировании потенциалов возбуждения у высших растений. Нелинейная динамика в когнитивных исследованиях. Труды конференции. 2011. С. 143-144.
 14. Орлова (Катичева) Л.А., Акинчиц Е.К., Сергеева Е.А., Грибков А.Л., Воденеев В.А. Роль ионов Ca^{2+} в формировании электрического ответа высшего растения на повреждающее воздействие. Третий международный симпозиум «Клеточная сигнализация у растений»: тез.док. Казань. 2011. С. 138-139.
 15. Орлова (Катичева) Л.А., Акинчиц Е.К., Сергеева Е.А., Балалаева И.В., Воденеев В.А. Анализ механизмов генерации потенциалов возбуждения у высших растений с помощью флуоресцентных зондов. VII Съезд ОФР «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий»: материалы докладов в двух частях: часть 2. 2011. С.523-524.
 16. Orlova (Katicheva) L., Vodeneev V., Sergeeva E., Gribkov A. Role of calcium ions in generation of electrical signals in plants induced by damaging irritation. Proceedings of III International Symposium Topical Problems of Biophotonics, 16-22 July, St.-Petersburg-Nizhny Novgorod. 2011. P. 244-245.
 17. Катичева Л.А., Сергеева Е.А., Грибков А.Л., Воденеев В.А. Роль ионов кальция в процессе генерации электрических сигналов у высших растений. IV Съезд биофизиков России. Материалы докладов. Симпозиум I. «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток». 2012. Т.1. С.137.
 18. Катичева Л.А., Воденеев В.А. Вклад пассивных и активных потоков ионов в формирование переменного потенциала у высших растений. Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой. Материалы VI Всероссийской конференции молодых ученых. 2012. С. 73
 19. Катичева Л.А., Воденеев В.А., Сергеева Е.А. Роль ионов Ca^{2+} в процессе генерации переменного потенциала у высших растений. Международная конференция "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация". Материалы докладов. 2013.Т.2. С.762-65
 20. Катичева Л.А., Акинчиц Е.К., Хазова М.М., Воденеев В.А. Флуоресцентный анализ механизма генерации переменного потенциала у высших растений. Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы». 2013. С.44-47