

ВОДЕНЕЕВ

Владимир Анатольевич

**Механизмы генерации и функциональная роль
потенциалов возбуждения у высших растений**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

03.00.02 – биофизика

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва - 2009

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

Научные консультанты:

Заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
доктор биологических наук, профессор

Оприлов Владимир Александрович

Пятыгин Сергей Станиславович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
доктор биологических наук, профессор
доктор биологических наук

Булычев Александр Александрович
Паничкин Леонид Александрович
Трофимова Марина Сергеевна

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный университет

Защита состоится « » _____ 2009 года в ____ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан « » _____ 2009 года

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций
кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Свойство возбудимости присуще всем живым организмам и необходимо для существования в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды. Одним из наиболее важных проявлений возбудимости является способность генерировать распространяющиеся электрические сигналы в ответ на разнообразные внешние факторы. У высших растений выделяют два основных типа распространяющихся электрических сигналов – потенциал действия (ПД), который возникает в ответ на неповреждающее раздражение, и переменный потенциал (ВП) – электрическую реакцию, индуцированную повреждающими раздражителями (Оприотов и др., 1991; Медведев, 1998; Stahlberg, 2006; Davies, 2006; Fromm, Lautner, 2007).

Первые сведения о способности высших растений генерировать электрические импульсы появились в конце XIX века в работах английского исследователя Бэрден-Сандерсона, проводимых на венериной мухоловке (Burdon-Sanderson, 1873 по Stahlberg, 2006), а начало систематического исследования возбудимости у высших растений связано с именем Боса, который впервые экспериментально обосновал, что в проводящих тканях мимозы могут возникать и распространяться ПД (Бос, 1964).

В течение длительного времени предполагалось, что электрические импульсы, возникающие при действии внешних раздражителей, наблюдаются только у растений с быстрыми локомоторными функциями, а остальные («обычные») растения не обладают таким свойством. Работами преимущественно отечественных ученых в 60-70 гг. XX века было не только показано существование ПД у «обычных» высших растений (Гунар, Синюхин, 1962, 1963; Гунар, Паничкин, 1967, 1970; Карманов и др., 1972; Rickard, 1973; Оприотов, 1977, 1978), но и во многом определено направление дальнейших исследований – изучение механизмов генерации и распространения электрических сигналов, определение их функциональной роли.

Несмотря на значительный период исследований и накопление определенного экспериментального материала, сведения о ПД у высших растений и сегодня носят фрагментарный характер. К настоящему времени наибольшие успехи достигнуты при изучении механизмов генерации ПД в гигантских по размерам клетках ряда водорослей, прежде всего, харовых (Берестовский и др., 1973; Lunevsky et al., 1983; Берестовский и др., 1987; Kourie, 1994). Во многом, представления о механизме генерации ПД у высших растений сформированы на основе этих результатов. Как и у харовых водорослей, формирование ПД у высших растений связывают с возникновением пассивных потоков ионов хлора и калия (Оприотов, Ретивин, 1982; Hodick and Sievers, 1988; Sibaoka, 1991; Fromm and Spanswick, 1993; Davies, 2006; Trebacz et al., 2006). В тоже время, имеющихся данных недостаточно для формирования целостной картины механизма генерации ПД в клетках высших растений. В еще меньшей степени исследован другой тип потенциалов возбуждения – ВП, характерный только для высших растений (Davies, 2006; Fromm, 2006; Stahlberg et al., 2006). Практически не расшифрованы механизмы его генерации и распространения.

Между тем, изучение природы распространяющегося возбуждения у высших растений важно не только для выявления особенностей этого процесса у данных объектов, но и для понимания эволюции механизмов генерации ПД в живых организмах в целом. Исследование природы ПД значимо также для раскрытия механизмов преобразования электрических сигналов в функциональный ответ.

В настоящее время накапливается материал об индуцированных ПД и ВП функциональных изменениях у высших растений (Davies, 1987; Опритов, 1998; Fromm, 2006; Fromm, Lautner, 2007), однако четкие представления о механизмах в их основе, а также о выполняемой роли отсутствуют.

Цель и основные задачи исследования. Целью работы является комплексное изучение механизмов генерации и функциональной роли потенциалов возбуждения, представленных потенциалом действия и переменным потенциалом, у высших растений.

В связи с поставленной целью выполнялись следующие задачи:

- характеристика местных биоэлектрических реакций, вызванных локальными раздражителями различной модальности, и определение их роли в индукции распространяющихся ПД;
- анализ непосредственного участия электрогенного насоса – H^+ -АТФазы плазматических мембран – в генерации ПД у высшего растения;
- построение схемы, обобщающей последовательность процессов, лежащих в основе генерации ПД;
- разработка и анализ математической модели генерации ПД у высших растений;
- изучение механизмов генерации и распространения ВП;
- анализ роли электрических сигналов, представленных ПД и ВП, в качестве факторов, индуцирующих функциональные изменения у высших растений.

Научная новизна. Впервые показано, что в генерации ПД у высших растений принимает непосредственное участие электрогенный насос плазматической мембраны. При генерации ПД имеет место переходное изменение активности электрогенного насоса по типу инактивация-активация. Временное снижение активности электрогенного H^+ -насоса происходит вследствие увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в возбудимых клетках.

Установлено, что формирование фазы деполяризации ПД связано с возрастанием потока H^+ внутрь, наряду с увеличением потока Cl^- наружу. Синхронизация двух ионных потоков достигается наличием общего иницирующего фактора – повышением концентрации ионов Ca^{2+} в клетке в начальный момент возбуждения.

Обнаружено, что фаза реполяризации ПД у высшего растения развивается в два этапа. Первый этап фазы реполяризации формируется выходящим потоком ионов K^+ . Второй этап фазы реполяризации связан с работой электрогенного насоса плазматических мембран.

Впервые предложена обобщающая схема механизма генерации ПД в клетках высших растений, согласно которой процесс генерации является комплексным и включает как пассивные потоки ионов, так и изменение активности H^+ -АТФазы плазматических мембран. Впервые разработана математическая модель генерации ПД у высших растений, которая основывается на предложенной схеме и включает в себя описание систем пассивного, первичного и вторичного активного транспорта ионов, а также изменения ионных концентраций в клетке, внеклеточной среде, буферные свойства цитоплазмы и апопласта.

Установлено, что генерация ВП, индуцированного ожогом листа проростка тыквы, связана с входом в клетку ионов Ca^{2+} и выходом Cl^- , наряду со снижением активности электрогенного H^+ -насоса.

Скорость распространения ВП не соответствует скорости распространения сигнала, рассчитанной на основании кабельного уравнения, что отрицает электрическую гипотезу передачи ВП.

Показано, что индуцированные электрическими сигналами изменения функциональной активности играют существенную роль в повышении устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов.

Научно-практическое значение. Результаты работы важны для создания целостной картины развития событий при формировании электрофизиологического ответа у высших растений на действие различных раздражителей. Предложенная схема генерации ПД у высших растений, учитывающая участие в этом процессе наряду с пассивными ионными потоками переходное изменение активности электрогенного насоса, способствует развитию представлений об эволюции механизмов возбуждения в живых организмах.

Материалы диссертации могут найти практическое применение в вопросах, связанных с поисками новых методов повышения устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов. Основные выводы и результаты работы используются в учебном процессе на биологическом факультете Нижегородского госуниверситета при чтении спецкурсов «Биофизические механизмы транспортных процессов», «Биофизика и биохимия мембранных процессов».

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. В генерации ПД у высшего растения (тыквы) принимает непосредственное участие электрогенный насос – H^+ -АТФаза плазматической мембраны. При генерации ПД происходит временное снижение активности насоса на фазе деполяризации и последующее восстановление активности на фазе реполяризации импульса. Фактором, угнетающим активность электрогенного насоса, является увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в клетке в начальный момент возбуждения. Ионы Ca^{2+} оказывают влияние на активность H^+ -АТФазы при участии протеинкиназ.

2. Математическая модель ПД у высших растений, разработанная на основании предложенной в работе схемы механизма генерации ПД, позволяет описать

изменения мембранного потенциала и ионных концентраций, которые хорошо соответствуют экспериментально зарегистрированным.

3. Формирование ВП, индуцированного ожогом листа проростков тыквы, связано, наряду со снижением активности электрогенного насоса, с входящим потоком ионов Ca^{2+} и выходящим потоком ионов Cl^- .

4. Механизм распространения ВП у проростков тыквы не может быть объяснен в рамках электротонической гипотезы. Скорость распространения ВП не соответствует скорости распространения, определенной с применением кабельного уравнения.

5. Распространение ПД и ВП индуцирует временное повышение уровня замедленной флуоресценции и содержания АТФ в листе, которое значимо для повышения устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на II съезде биофизиков России (Москва, 1999), Международной конференции “Ксенобиотики и живые системы” (Минск, 2000), International Symposium “Signaling Systems of Plants Cells” (Moscow, 2001), Международной конференции молодых ученых и студентов “Актуальные проблемы современной науки” (Самара, 2001), Международной конференции “Регуляция роста, развития и продуктивности растений” (Минск, 2001), V съезде общества физиологов растений России (Пенза, 2003), Всероссийской научно-практической конференции «Физиология растений и экология на рубеже веков» (Ярославль, 2003), Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2003), 3 Международной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2003), III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), Международной научной конференции «Актуальные вопросы ботаники и физиологии растений» (Саранск, 2004), 6 International Congress on Mathematical Modeling (Nizhny Novgorod, 2004), Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2005), VI Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Москва, 2005), Международной конференции «Математика, компьютер, образование» (Пушино, 2005), X Междисциплинарной научной конференции «Нелинейный мир» (Нижний Новгород, 2005), Международной конференции «Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), V Съезде общества фотобиологов России (Пушино, 2008), Международной конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 2008), а также на региональных конференциях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 46 работ из них 18 статей в рецензируемых изданиях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 7 глав (включая обзор литературы), заключения, выводов и списка литературы. Изложена на 252 страницах, содержит 63 рисунка и 5 таблиц. Список цитируемой литературы включает 398 работ, из них 264 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основным объектом исследования служили 14÷21-дневные проростки тыквы *Cucurbita pepo* L. сорта Мозолеевская, выращенные гидропонным способом на 50%-ной среде Хоглэнда-Арнона. Растения выращивали 5÷7 дней в темноте при температуре 28⁰С, затем при температуре 25⁰С в климатической камере. Часть экспериментов была выполнена на проростках пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Московская-35 14÷21- дневного возраста.

Регистрацию биоэлектрической активности клеток стебля тыквы осуществляли на установке, собранной на базе комплекта микроманипуляторов КМ-2. Стебель проростка укрепляли в плексигласовой кювете, расположенной на поверхности термоохлаждающего столика ТОС-2. Кювету заполняли раствором, содержащим 1 мМ КСl, 0,5 мМ СаСl₂, 0,1 мМ NaСl рН 6,0. Корень укрепленного в кювете проростка погружали в чашку Петри с раствором того же состава. Регистрацию биоэлектрической активности проводили внутриклеточно микроэлектродами, изготовленными из стекла «пирекс», с диаметром кончика менее 1 мкм и внеклеточно макроэлектродами ЭВЛ-1МЗ. Величина изменений внеклеточно регистрируемой разности потенциалов (ΔU) при проведении измерений в низкоионных средах соответствует величине изменения мембранного потенциала (E_m) клеток (Зацепина, Цаплев, 1980; Опритов и др., 1991; Пятыгин, 2001).

В качестве раздражителей, индуцирующих генерацию электрических реакций, использовали: постепенное охлаждение участка стебля через кювету с охлаждаемой жидкостью – с помощью термостолика или протока воды заданной температуры через внешнюю кювету; импульсное охлаждение – путем нанесения капли холодной воды на стебель; механическое воздействие – удар стеклянной палочкой, падающей с различной высоты. В качестве повреждающего воздействия использовали ожог края листа открытым пламенем в течение 3 с.

Изменения рН и рСl раствора, омывающего участок стебля в кювете, при генерации электрических реакций регистрировали с помощью ионселективных электродов (ЭСК-10614 и ЭЛИС-131Сl соответственно), соединенных с иономером ИПЛ-113. Раствор в экспериментальной кювете перемешивали магнитной мешалкой в течение всего времени проведения эксперимента.

Изменения рН апопласта регистрировали с помощью зонда FITC-dextran (максимум возбуждения и флуоресценции – 493 и 520 нм соответственно). Увеличение интенсивности флуоресценции ($I_{фл}$) соответствует сдвигу рН в щелочную сторону. Для загрузки растения зондом, стебли проростков погружали в раствор, содержащий 5×10^{-8} М FITC на 12-18 часов. Регистрацию флуоресценции осуществляли на комплексе лазерной сканирующей микроскопии (микроскоп Axiovert 200M, лазерный сканирующий модуль Carl Zeiss LSM 510, спектральный модуль Carl Zeiss 23 META). Одновременно с регистрацией флуоресценции осуществляли запись электрической активности.

Оценка изменений размеров листа проводилась с помощью оптического когерентного микроскопа OCM1300SS (Thorlabs). Двухмерные ОКМ-изображения получали каждые 3 с перед и после нанесения раздражения.

Регистрацию индукционных кривых замедленной флуоресценции (ЗФ) осуществляли с помощью медленного однолучевого фосфороскопа (Веселовский, Веселова, 1990) (белый свет, 10000 люкс, время между возбуждением и регистрацией свечения – 16 мс).

Холодоустойчивость проростков тыквы определяли методом электрофизиологической диагностики (Ретивин, Опритов, 1992, 1993) (тестовое охлаждение -8°C , 15 мин). В качестве контроля использовали холодоустойчивость нераздраженных растений.

Концентрацию АТФ определяли люциферин-люциферазным методом (Опритов и др., 1976). Содержание АТФ в семядольных листьях оценивали по ее выходу через срез семядоли в фиксированные (0,8 мл) объемы омывающего раствора, в которые последовательно погружали лист (экспозиция в каждом – 15 мин). Контролем служил выход АТФ до раздражения.

Фракцию, обогащенную плазматическими мембранами (ПМ), выделяли из стеблей проростков тыквы методом дифференциального ультрацентрифугирования (Leonard, Hodges, 1973) с последующей очисткой в градиенте плотности сахарозы (34 и 45%). Концентрацию белка в выделенной фракции ПМ определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951) с учетом поправки на сахарозу (Gerhardt, Beevers, 1969). Чистоту мембранной фракции оценивали с помощью ингибиторного анализа. Степень инвертированности везикул определяли, измеряя гидролитическую активность в присутствии аламетицина (Тихая и др., 1984).

АТФазную активность определяли спектрофотометрически по накоплению P_i в ходе гидролиза АТФ (Болдырев, 1977). Транспортную активность H^+ -АТФазы оценивали по тушению флуоресценции 9-аминоакридина на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301PC. Определяли зависимость гидролитической и транспортной активности H^+ -АТФазы от концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубации. Концентрацию Ca^{2+} в среде рассчитывали с помощью программы CHELATOR (Schoenmakers et al., 1992).

Эксперименты проводили не менее чем в 6-кратной биологической повторности. Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики (Лакин, 1973; Тейлор, 1985). В результатах представлены средние значения и их стандартные квадратичные ошибки ($M \pm m$). Разработанную математическую модель решали численно методом Эйлера.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕРАЦИИ МЕСТНЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В ЗОНЕ ЛОКАЛЬНОГО РАЗДРАЖЕНИЯ

У высших растений, за исключением небольшой группы локомоторных растений, по-видимому, отсутствуют специализированные рецепторные образования, отвечающие за восприятие внешних стимулов определенной модальности. Несмотря на это «обычные» растения способны генерировать ПД под влиянием целого ряда раздражителей: механического раздражения, изменения температуры или освещенности, действия химических агентов и др. (Опритов и др., 1991; Опритов и др., 2005; Krol et al., 2006; Davies, 2006). На примере механического и холодового раздражений нами было проанализировано, каким образом происходит восприятие внешних стимулов у растений и можно ли говорить о наличии этапа рецепции при развитии ответной электрофизиологической реакции на действие внешних раздражителей.

На рис. 1 показана зависимость амплитуды МБЭР от интенсивности приложенного механического стимула. Как видно из рисунка, четко проявляется свойственная рецепторным потенциалам градуальность – чем сильнее воздействие, тем больше амплитуда ответа. По достижению раздражителем некоторой критической интенсивности, происходит резкое возрастание амплитуды ответа, на величине которой дальнейшее усиление раздражителя не сказывается: происходит генерация ПД в соответствии с законом «все или ничего».

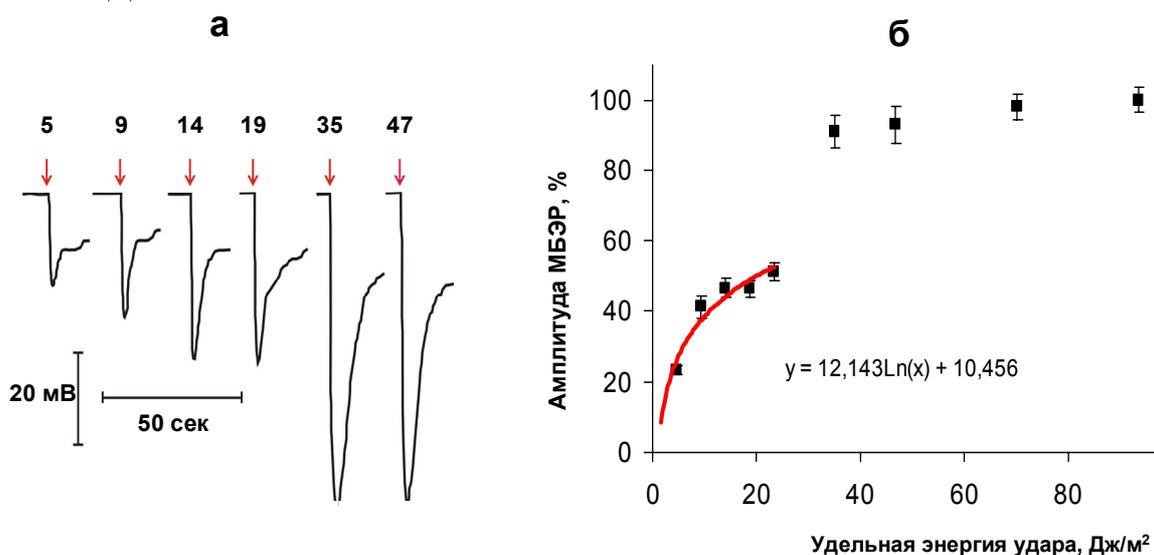


Рис. 1. Зависимость амплитуды местной биоэлектрической реакции (МБЭР) от удельной энергии удара.

а – данные отдельного опыта. Стрелками со значениями указаны моменты нанесения ударов соответствующей удельной энергии (Дж/м²);

б – усредненные результаты 7-и измерений. Амплитуда выражена в % по отношению к амплитуде реакции, индуцированной воздействием силой 102 Дж/м².

Наличие градуальности и способности вызывать генерацию ПД по достижении порогового уровня свойственно также и ответным электрическим реакциям, индуцированным локальным охлаждением. В отличие от механического раздражения зависимость амплитуды реакции от глубины охлаждения носит не логарифмический,

а экспоненциальный характер. Иной характер зависимости указывает на различие в механизмах восприятия механического и холодового стимулов клетками высших растений. Следовательно, преобразование энергии внешнего стимула в электрический ответ происходит при преимущественном участии различных структур, в зависимости от модальности стимула.

В настоящее время механизмы восприятия стимулов различной модальности клетками высших растений изучены недостаточно. В случае механической стимуляции можно полагать, что деполяризация формируется при решающем участии пассивных ионных потоков Ca^{2+} и Cl^- через механочувствительные кальциевые и хлорные каналы плазматической мембраны (Cosgrove, Hedrich, 1991; Ding, Pickard, 1993; Dutta, Robinson, 2004; Falke et al., 1988; Fasano et al., 2002).

Подпороговая деполяризация, вызванная понижением температуры, по-видимому, в решающей степени обусловлена холодным угнетением электрогенного H^+ -насоса в связи с увеличением вязкости мембранного матрикса и ограничением конформационной подвижности H^+ -АТФазы (Pyatygin et al., 1992; Треушников и др., 1994). Существует предположение об участии в развитии индуцированной охлаждением деполяризации активации кальциевых каналов и увеличения концентрации свободного кальция в клетке (Lewis et al., 1997).

В целом, рассмотрение особенностей генерации электрических реакций в зоне локального раздражения показывает, что МБЭР «обычных» высших растений обладают рядом свойств, характерных для рецепторных потенциалов, а именно: зависимость характера ответа от модальности раздражителя; градуальность (амплитуда ответа зависит от интенсивности раздражителя) и генерация ПД при достижении порогового значения. Это указывает на наличие самостоятельного этапа рецепции в развитии ответной электрофизиологической реакции на действие внешних неповреждающих раздражителей, заканчивающегося генерацией ПД.

МЕХАНИЗМ ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ В КЛЕТКАХ ВЫСШЕГО РАСТЕНИЯ

Непосредственное участие электрогенного насоса в формировании потенциала действия

Согласно существующим представлениям формирование ПД в клетках высших растений связано с возникновением пассивных потоков ионов: фаза деполяризации формируется входящим потоком ионов Ca^{2+} и выходящим потоком ионов Cl^- , фаза реполяризации – выходящим потоком ионов K^+ (Davies, 2006; Trebacz et al., 2006; Felle, Zimmermann, 2007). В то же время имеются сведения, что у высших растений одним из необходимых условий генерации ПД является наличие в составе E_m высокой метаболической (насосной) компоненты (Hodick, Sievers, 1988; Опритов, Пятыгин, 1989; Fromm, Spanswick, 1993; Mancuso, 1999). Это дает основание полагать, что

механизм генерации ПД может быть прямо или косвенно сопряжен с работой электрогенного насоса.

С целью выявления возможной связи между величиной метаболической компоненты E_m (E_p) и процессом генерации ПД проводили исследование зависимости амплитуды ПД ($A_{ПД}$) от величины E_p . Как видно из рисунка 2, зависимость $A_{ПД}$ от величины метаболической компоненты разности потенциалов (ΔU_p) (в условиях опыта ΔU_p соответствует E_p (Пятыгин, 2001)) носит линейный характер. Значительное снижение ΔU_p приводит к полному прекращению процесса генерации ПД.

Величина E_p пропорциональна уровню активности H^+ -АТФазы (Morse, Spanswick, 1985). Учитывая это, исследовали влияние на процесс генерации ПД ингибитора H^+ -АТФазы ДЦКД (Tu et al., 1992). Под влиянием ДЦКД амплитуда вызванных охлаждением ПД значительно подавлялась (рис. 3). Полученные результаты указывают на наличие зависимости способности генерировать ПД от величины E_p , возникающей за счет активности электрогенного насоса.

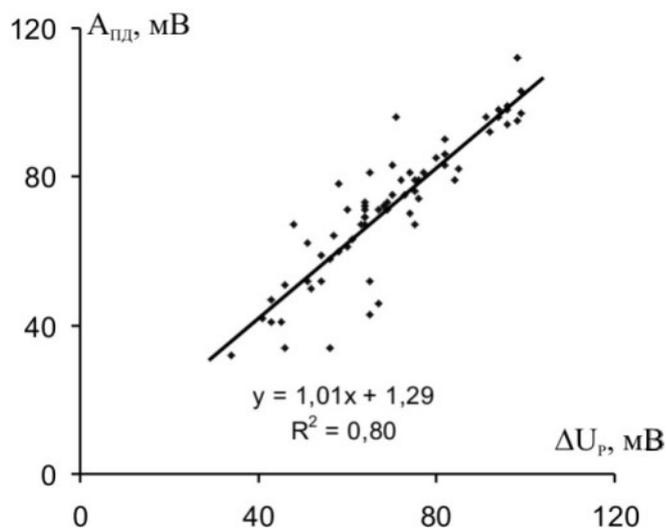


Рис. 2. Зависимость амплитуды потенциала действия ($A_{ПД}$) от величины метаболической компоненты ΔU (ΔU_p).

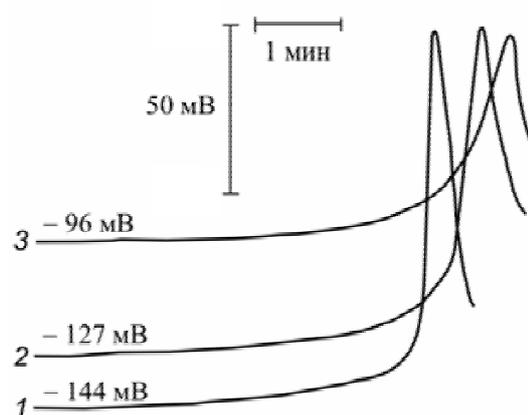


Рис. 3. Влияние ДЦКД на амплитуду индуцированных постепенным охлаждением ПД в возбудимых клетках стебля тыквы. 1 - контроль (без ДЦКД); 2 - 0,5 мМ ДЦКД; 3 - 1 мМ ДЦКД.

Обнаруженная зависимость принципиально отличает генерацию ПД в клетках высших растений от данного процесса у животных, у которых способность генерировать ПД сохраняется даже при угнетении электрогенного насоса (Иост, 1975). Наличие зависимости между величиной E_p и $A_{ПД}$ (рис. 2, 3) может быть связано как с участием H^+ -насоса в создании значительных градиентов ПД-образующих ионов (Cl^- и K^+) (Orpittov, Pyatygin, 1989), так и с его непосредственным участием в формировании ПД. Последнее предположение основывается на подобном участии электрогенного насоса в генерации ПД у некоторых низших растений (Рогатых и др., 1976; Gradmann, 1976; Slayman et al., 1976). Так у водоросли *Acetabularia* ПД является «метаболическим» по своей природе, формируясь за счёт «выключения»

электрогенного Cl⁻-насоса (фаза деполяризации) и последующей его активации (фаза реполяризации) (Рогатых и др., 1976; Gradmann, 1976).

Для оценки возможности генерации «метаболических» импульсов в клетках тыквы проводили исследование процесса возбуждения в условиях, исключающих возникновение пассивных потоков основных ПД-образующих ионов (K⁺ и Cl⁻). Было установлено, что индуцированные постепенным охлаждением ПД возникают даже при увеличении концентрации KCl снаружи клеток до 1M, в условиях, исключающих возможность возникновения пассивных потоков основных ПД-образующих ионов (K⁺ и Cl⁻). Невозможность участия пассивных ионных потоков в формировании ПД в этих условиях указывают на то, что в их основе лежат, вероятно, процессы активного транспорта ионов, осуществляемого электрогенным насосом.

Непосредственное участие H⁺-насоса в генерации ПД должно сопровождаться изменением внутри- и внеклеточного pH при генерации импульса. Изменения внеклеточного pH были зарегистрированы с помощью флуоресцентного зонда FITC-dextran на целых растениях методом конфокальной микроскопии. Анализ 3D изображений показал, что зонд избирательно накапливается в апопласте, что позволяет по изменению интенсивности его флуоресценции (I_{фл}) дифференциально оценивать изменения внеклеточного pH.

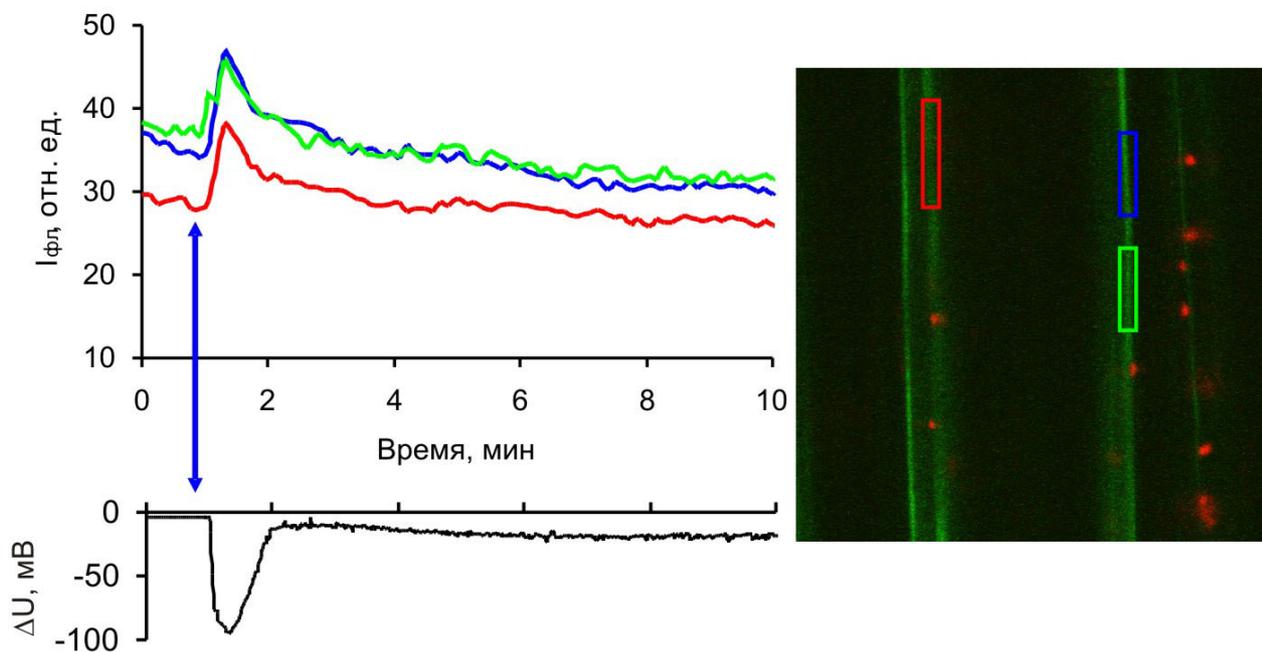


Рис. 4. Изменение интенсивности флуоресценции (I_{фл}) FITC-dextran при генерации потенциала действия, индуцированного холодным стимулом на расстоянии от зоны регистрации.

Стрелкой указан момент нанесения раздражения. Усиление I_{фл} соответствует защелачиванию. Справа приведено 2D изображение стебля проростка тыквы, размер изображения 90x90 мкм, зеленый канал соответствует флуоресценции зонда, красный – autofлуоресценции хлоропластов. Области регистрации I_{фл} показаны прямоугольниками соответствующего цвета.

Регистрацию изменений $I_{фл}$ во времени проводили на уровне второго или третьего от поверхности слоя клеток. Из рис. 4 видно, что генерация ПД, индуцированного нанесением капли ледяной воды на стебель на расстоянии от зоны регистрации, сопровождается временным увеличением $I_{фл}$, что свидетельствует о переходном защелачивании апопласта.

Изменения внеклеточного рН при генерации ПД были также зарегистрированы при использовании потенциометрического метода. На рис. 5а представлена одновременная запись изменения ΔU участка стебля проростка тыквы и рН омывающего раствора во время генерации ПД. Видно, что генерация ПД сопровождается смещением рН в щелочную область. Как и изменение ΔU , изменение рН имеет переходный характер, а по времени они хорошо соответствуют друг другу.

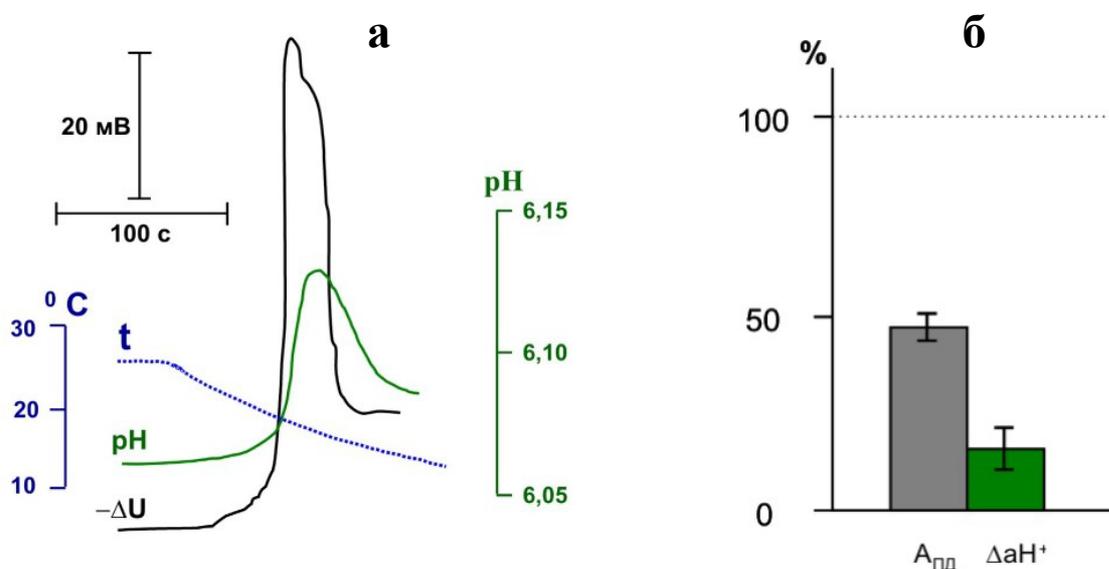


Рис. 5. а – изменение рН омывающего участок стебля раствора при генерации индуцированного постепенным охлаждением ПД. б - влияние ингибитора H^+ -АТФазы плазматических мембран ДЦКД (0,5 мМ) на амплитуду ПД ($A_{ПД}$) и изменение активности H^+ (ΔaH^+). Результаты выражены в % по отношению к контрольному ПД (n=8).

Полученные результаты указывают на следующую последовательность событий: вход протонов из апопласта в клетку на фазе деполяризации, и обратный перенос протонов в апопласт на фазе реполяризации. Такая последовательность событий может иметь место, если происходит временное угнетение активности протонной АТФазы – инактивация на фазе деполяризации и реактивация на фазе реполяризации импульса. Связь регистрируемых изменений рН с функционированием H^+ -АТФазы подтверждает снижение переходного защелачивания в присутствии ингибитора фермента ДЦКД (рис. 5б).

Если во время ПД происходит снижение активности H^+ -АТФазы, то встает вопрос о факторе, который его обеспечивает. Анализ данных литературы (Kinoshita et al., 1995; Lino et al., 1998; Qiu, Su, 1998; De Nisi et al., 1999) приводит к заключению, что таким фактором может быть увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме

возбудимых клеток. Исследование влияния ионов Ca^{2+} на активность H^+ -АТФазы проводили на модельной системе – изолированных везикулах ПМ. При увеличении концентрации Ca^{2+} с цитоплазматической стороны инвертированных мембранных везикул выше $2 \cdot 10^{-7}$ М, соответствующей содержанию этих ионов в цитоплазме растительных клеток в состоянии покоя (Sanders et al., 1999; Reddy, 2001), происходит снижение как гидролитической, так и транспортной активности H^+ -АТФазы (рис.6).

Ионы кальция оказывают влияние на активность целого ряда ферментов при участии протеинкиназ (Reddy, 2001; Plieth, 2005; Медведев, 2005). Из рис. 6а (кривая 2) видно, что ингибитор протеинкиназ Н-7 в значительной мере снижает угнетающее действие ионов Ca^{2+} на активность H^+ -АТФазы ПМ. Это указывает на то, что кальций-индуцированное снижение активности фермента (H^+ -АТФазы) вызвано, вероятнее всего, его фосфорилированием при участии протеинкиназ. Согласно (De Nisi et al., 1999) протеинкиназы, катализирующие фосфорилирование протонной АТФазы относятся к типу кальций зависимых протеинкиназ (CDPK).

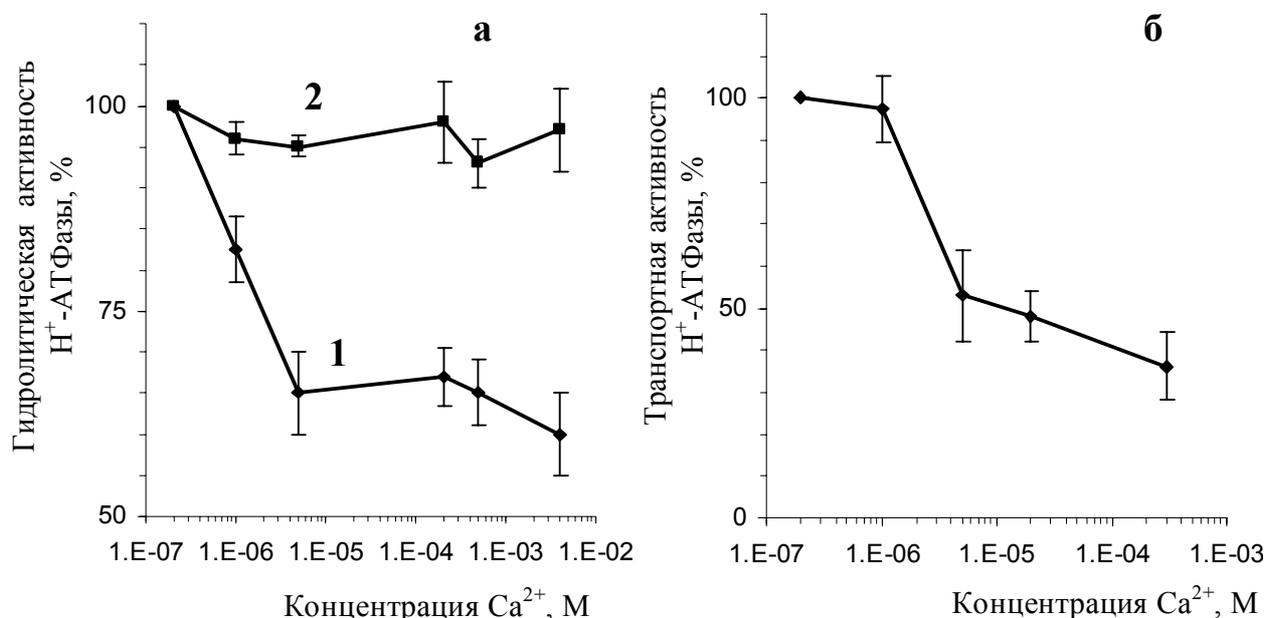


Рис. 6. Влияние ионов Ca^{2+} на гидролитическую (а) и транспортную (б) активность H^+ -АТФазы

За 100% принята активность H^+ -АТФазы при концентрации Ca^{2+} - $2 \cdot 10^{-7}$ М.

а – кривая 1 – в отсутствие ингибитора протеинкиназ Н-7; 2 – в присутствии ингибитора протеинкиназ Н-7 ($10 \mu\text{M}$).

Таким образом, показана зависимость процесса генерации ПД в клетках высших растений от величины метаболической компоненты E_m , возникающей за счет функционирования H^+ -АТФазы ПМ. Данная зависимость обусловлена, по-видимому, как участием электрогенного насоса в создании значительных градиентов ПД-формирующих ионов (Cl^- и K^+), так и непосредственным участием насоса в генерации ПД. Во время генерации ПД происходит переходное изменение активности H^+ -АТФазы – инактивация на фазе деполяризации импульса, и последующая активация

на фазе реполяризации. Фактором, вызывающим временное угнетение активности протонной АТФазы, по-видимому, является увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в начальный момент возбуждения.

Совокупность процессов, лежащих в основе механизма генерации потенциала действия

Рассмотрев такую особенность генерации ПД у высших растений, как непосредственное участие электрогенного насоса, необходимо определить всю последовательность процессов, определяющих развитие импульса. С этой целью было проведено исследование механизма формирования фаз де- и реполяризации ПД. Для изучения роли ионов Ca^{2+} в формировании фазы деполяризации были применены блокатор кальциевых каналов верапамил и хелатор двухвалентных катионов ЭГТА, угнетающие вход ионов кальция в клетку. Как видно из рис. 7, ограничение входа ионов Ca^{2+} приводит к полному подавлению процесса генерации ПД. При этом не происходит и типичных переходных изменений рН, что подтверждает роль ионов Ca^{2+} в угнетении электрогенного протонного насоса.

Полное подавление ПД в присутствии ЭГТА и верапамила может быть связано либо с определяющей ролью ионов Ca^{2+} в развитии фазы деполяризации ПД в качестве основного носителя заряда, что показано для некоторых высших растений (Iijima, Sioaka, 1985; Hodick, Sievers, 1988), либо с его ролью в качестве сигнального фактора, лишь инициирующего генерацию ПД. Если Ca^{2+} выступает как основной переносчик заряда, изменение его концентрации во внеклеточной среде должно отразиться на амплитуде ПД. Однако этого не наблюдалось в диапазоне содержания Ca^{2+} снаружи от возбудимых клеток от 0,1 до 10 мМ. Это указывает на то, что ионам Ca^{2+} принадлежит сигнальная роль – вход Ca^{2+} необходим для инициации процесса возбуждения, при этом Ca^{2+} не вносит существенного вклада в изменение потенциала при развитии фазы деполяризации.

Ведущая роль в изменении потенциала при формировании фазы деполяризации принадлежит, по-видимому, ионам Cl^- и H^+ . Возникновение потока протонов на фазе деполяризации ПД в клетках стебля проростков тыквы было показано выше. Аналогичный подход – регистрация динамики концентрации во внеклеточной среде – был использован для изучения роли Cl^- в развитии фазы деполяризации. При генерации ПД изменения содержания Cl^- во внеклеточной среде имели двухфазный характер – быстрое увеличение концентрации Cl^- , сменялось снижением – и по времени хорошо соответствовали развитию фазы деполяризации (рис. 8а). Полученные результаты согласуются с представлением об участии выходящего потока Cl^- в формировании фазы деполяризации ПД у высших растений (Опритов, Ретивин, 1982; Fromm, Spanswick, 1993).

На основании экспериментов, представленных на рис. 8а, и сведений о содержании Cl^- в клетках стебля тыквы (Опритов и др., 1991) было рассчитано изменение равновесного потенциала для ионов Cl^- (E_{Cl}) при генерации ПД. Изменение

концентрации Cl^- ведет к значительному смещению E_{Cl} в отрицательную область, приближая величину E_{Cl} к значениям E_m в пике ПД (рис. 8б). Это может являться одним из факторов, ограничивающих развитие фазы деполяризации ПД, т.е. значение потенциала в пике ПД может определяться величиной E_{Cl} .

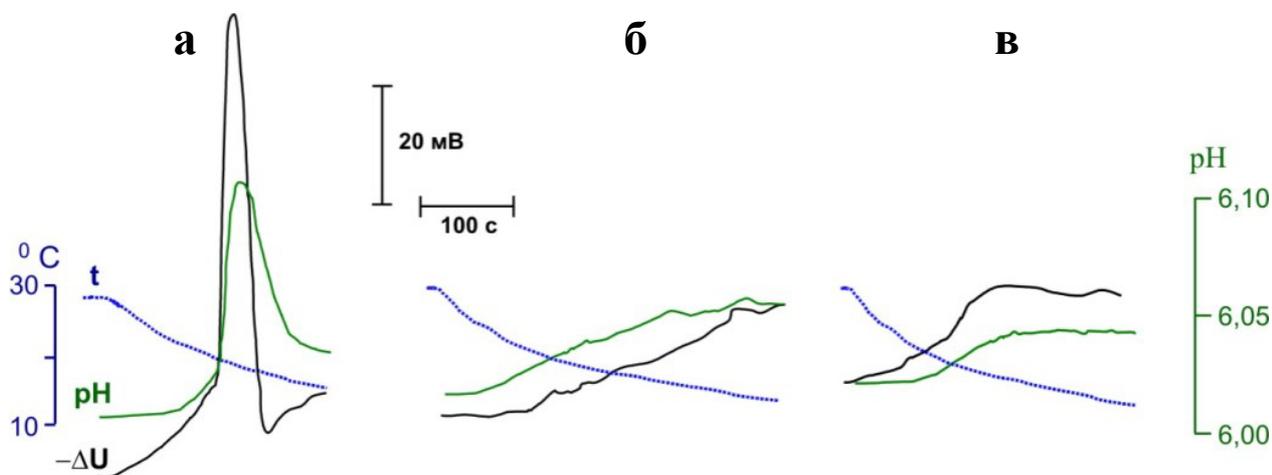


Рис. 7. Индуцированные постепенным охлаждением изменения разности потенциалов (ΔU) участка стебля проростка тыквы и pH омывающего раствора в стандартной среде (а), в присутствии 2 мМ ЭГТА (б) и 0,5 мМ верапамила (в).

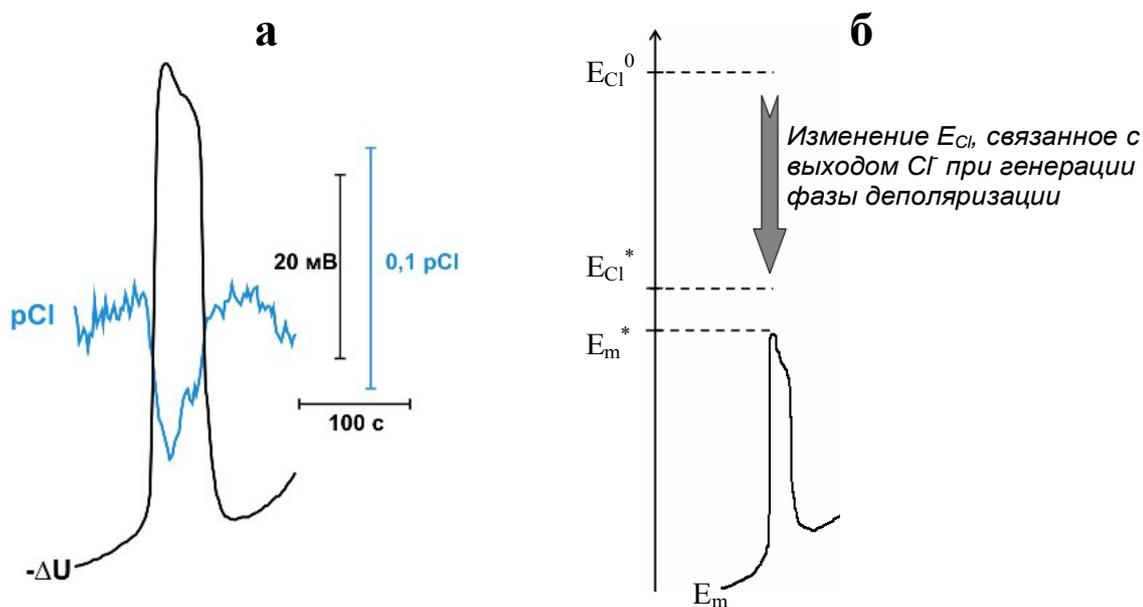


Рис. 8. Изменение концентрации ионов Cl^- во внеклеточной среде при генерации ПД, индуцированного постепенным охлаждением (а). б – схема, иллюстрирующая изменение равновесного потенциала для ионов Cl^- (E_{Cl}) при генерации ПД.

E_m^* – значение мембранного потенциала в пике ПД, E_{Cl}^0 – равновесный потенциал для ионов Cl^- в покое, E_{Cl}^* – в максимуме изменений концентрации Cl^- .

Применение блокатора анионных каналов – этакриновой кислоты (ЭК) – ведет к значительному снижению амплитуды и скорости формирования фазы деполяризации и подавляет переходное изменение концентрации Cl^- . Это указывает на то, что возникновение выходящего потока Cl^- при генерации ПД связано с активацией соответствующих ионных каналов.

Можно полагать, что при блокировании потока Cl^- развитие фазы деполяризации редуцированных импульсов обусловлено преимущественно входящим потоком H^+ . Действительно, под влиянием ЭК происходит усиление потока H^+ , о чем свидетельствует более сильное защелачивание внешнего раствора по сравнению с контролем (рис. 9). В еще большей степени происходит возрастание величины отношения изменения рН к амплитуде ПД, указывающее на увеличение вклада потока H^+ в генерацию фазы деполяризации ПД. Однако это не в полной мере компенсирует ослабление потока Cl^- , и амплитуда ПД значительно меньше чем в контроле. Полученные результаты свидетельствуют о том, что участвующие в формировании фазы деполяризации ПД потоки ионов Cl^- и H^+ являются сопряженными. Сопряжение двух потоков обеспечивается, по-видимому, наличием общей движущей силы – градиента электрического потенциала на ПМ.

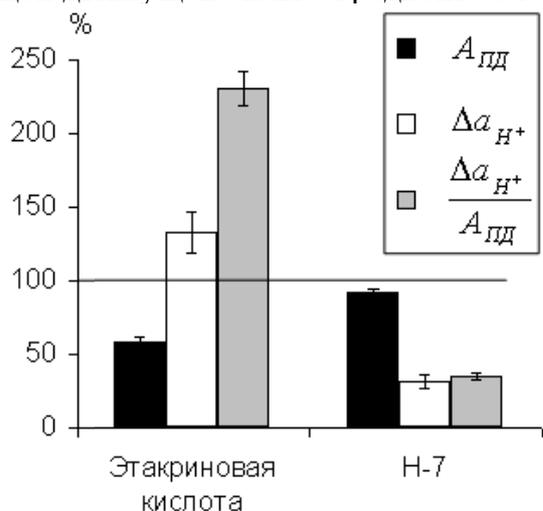


Рис. 9. Влияние блокатора анионных каналов этакриновой кислоты (0,5 мМ) и ингибитора протеинкиназ – Н-7 (10 μ М) на амплитуду ПД и величину переходного изменения внеклеточного рН

Возникает закономерный вопрос о соотношении «хлорного» (активация Cl^- -каналов) и «насосного» (инактивация H^+ -АТФазы) механизмов формирования фазы деполяризации ПД. Ограничение входа Ca^{2+} в клетки (рис. 7) ответ на этот вопрос не дает, поскольку блокирует оба механизма, для которых увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме является триггером. Угнетение активности H^+ -АТФазы с помощью ингибиторов также не позволяет однозначно определить ее роль в развитии фазы деполяризации, поскольку оно оказывает опосредованное влияние на Cl^- -поток путем уменьшения величины E_m . Избирательно вычленив «насосный» механизм позволяет, как показывают результаты опытов на везикулах (рис. 6), применение ингибитора протеинкиназ, устраняющего влияние Ca^{2+} на активность H^+ -АТФазы. Использование Н-7 в опытах на целых проростках вызывало значительное уменьшение изменений рН при генерации ПД (рис. 9). Амплитуда ПД при этом подавлялась не более, чем на

10%. Однако этот результат, по-видимому, не в полной мере отражает вклад протонного потока в генерацию фазы деполяризации, поскольку его уменьшение может частично компенсироваться усилением потока Cl^- . Все же, в совокупности с данными о значительно более сильном подавлении амплитуды ПД блокатором анионных каналов ЭК и больших изменениях концентрации Cl^- в сравнении с H^+ , это указывает на то, что ведущая роль в формировании фазы деполяризации ПД принадлежит выходящему потоку Cl^- .

Заканчивая рассмотрение фазы деполяризации ПД, необходимо подчеркнуть ее комплексную природу. В основе деполяризации лежат входящий поток протонов и выходящий поток ионов Cl^- . Синхронизация двух потоков обеспечивается наличием единого сигнального фактора – увеличения в цитозоле концентрации Ca^{2+} . При этом входящий поток ионов Ca^{2+} , необходимый для запуска генерации ПД в целом, не вносит существенного вклада в развитие деполяризации. Потоки Cl^- и H^+ не являются независимыми, а имеют общий сопрягающий фактор – E_m . Уменьшение потока одного из ионов может приводить к компенсаторному увеличению потока другого иона.

Формирование фазы реполяризации ПД в клетках высших растений, также как и в клетках харовых водорослей и возбудимых клетках животных связывают с возникновением выходящего потока ионов K^+ (Ходоров, 1975; Ohki, 1985; Берестовский и др., 1987; Опритов и др., 1991; Davies, 2006; Trebacz et al., 2006). Однако формирование фазы реполяризации у высших растений, по-видимому, носит более сложный характер. Обращает на себя внимание форма импульса – фазу реполяризации можно разбить на два последовательных этапа (рис. 10). Подобная форма характерна не только для ПД в клетках *Cucurbita pepo*, но и для целого ряда высших растений (Samejima, Sibaoka, 1982; Hodick, Sievers, 1988; Fromm, Spanswick, 1993).

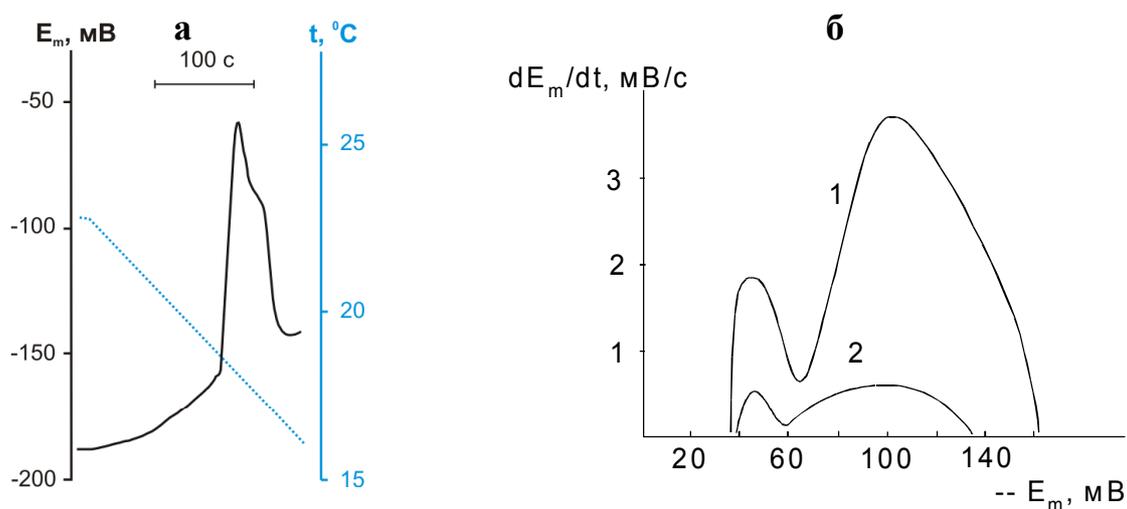


Рис. 10. Типичный импульс ПД, возникающий в возбудимой клетке стебля тыквы при постепенном охлаждении (а). б – кривые функции $dE_m/dt=f(E_m)$ для фазы реполяризации потенциалов действия, возникших при различной температуре. Кривая 1 получена при охлаждении до $17,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, кривая 2 – до $12,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

С целью выявления особенностей этапов формирования ПД скорость изменения потенциала при развитии фазы реполяризации (dE_m/dt) была представлена как функция величины E_m клетки (рис. 10б). В пределах каждого из этапов фазы реполяризации скорость изменения E_m сначала увеличивалась до некоторого максимума, а затем снижалась. Из рис. 10б видно, что температурная чувствительность второго этапа фазы реполяризации значительно больше, чем у первого. Отмеченные особенности фазы реполяризации ПД указывают на то, что при ее формировании участвуют, вероятнее всего, два различных ионтранспортных процесса, каждый из которых идет до насыщения в пределах определенного диапазона значений E_m .

С участием ионов K^+ формируется, вероятно, лишь первый этап фазы реполяризации, который обнаруживает относительно слабую зависимость от температуры, характерную для пассивного электрогенеза (Опритов и др., 1991). Следует также учитывать, что возможности выходящего потока K^+ ограничены, так как при снижении E_m до значений K^+ -равновесного потенциала движущая сила для выхода ионов K^+ исчезает. Расчеты, проведенные на основании сведений об изменении концентрации K^+ при генерации ПД в клетках стебля тыквы (Опритов и др., 1991), показали, что величина K^+ -равновесного потенциала соответствует границе первого этапа фазы реполяризации. Следовательно, второй этап фазы реполяризации имеет не «калиевую» природу. Высокая температурная чувствительность этого этапа (рис. 10б) указывает на то, что он возникает, вероятнее всего, при участии активного транспортного процесса, осуществляемого электрогенным насосом (Пятыгин, Опритов, 1987).

Подводя итог рассмотрения механизма генерации ПД у высших растений можно предложить следующую последовательность событий (рис. 11). Деполяризация до

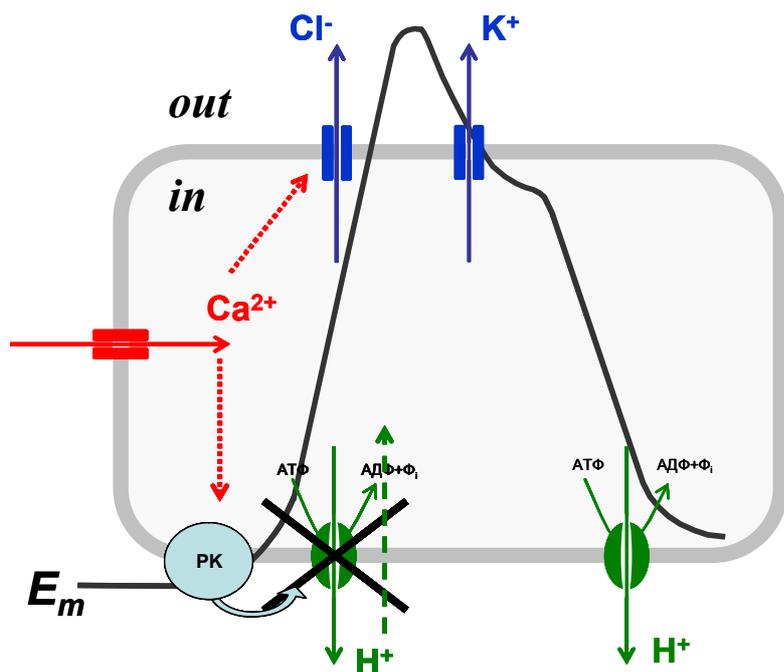


Рис. 11. Предполагаемая схема механизма генерации потенциала действия в клетках высших растений.

уровня порога возбуждения открывает потенциалзависимые кальциевые каналы. Кальций, входя внутрь клетки, активирует хлорные каналы и угнетает работу H^+ -АТФазы. Выходящий поток хлора и угнетение H^+ -АТФазы обеспечивают формирование фазы деполяризации до уровня потенциала в пике ПД. Калиевый поток, который начинается на фазе деполяризации импульса (Ретивин, 1988), формирует первый этап фазы реполяризации до уровня K^+ -равновесного потенциала. Затем происходит активация H^+ -АТФазы, вероятно, за счет удаления из цитоплазмы избытка ионов кальция. Активированный H^+ -насос формирует второй, более значительный по величине этап фазы реполяризации, завершая развитие импульса

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Сложный характер электрогенеза растительных клеток в покое и при возбуждении делает весьма актуальной проблему математического моделирования этих процессов. Имеются отдельные работы, посвященные решению этого вопроса, которые описывают поддержание мембранного потенциала в покое, и его колебания (Gradmann, Hoffstadt, 1998; Gradmann, 2001; Veilby, 2007), однако, в современной литературе отсутствует математическое описание ПД у высших растений. В то же время, детализированная математическая модель может быть использована в качестве самостоятельного инструмента теоретического анализа механизма генерации ПД в клетках высших растений, а также служить аргументом в пользу тех или иных гипотез о природе возбуждения. В качестве отправной точки нами была использована разработанная на основании данных литературы и полученных в работе результатов схема механизма генерации ПД, представленная на рис. 11.

Описание математической модели

Электрофизиологическая схема клетки высшего растения, примененная для математического описания генерации ПД, содержит элементы пассивного и активного транспорта ионов K^+ , Cl^- , Ca^{2+} и H^+ (Оприлов и др., 1991; Gradmann, Hoffstadt, 1998; Gradmann, 2001). Система пассивного транспорта была представлена калиевыми каналами двух типов – активируемые деполяризацией (D-каналы) и гиперполяризацией (G-каналы), хлорными и кальциевыми каналами. Система активного транспорта включала в себя транспортные АТФазы двух типов – H^+ -АТФазу (Оприлов и др. 1991; Spanswic, 2006) и Ca^{2+} -АТФазу (Bush, 1993) и системы вторичного активного транспорта – $2H^+/Cl^-$ -симпортер и H^+/K^+ -антипортер (Rodriguez-Navarro, 2000; Gradmann, 2001).

Изменения мембранного потенциала описывали уравнением Ходжкина-Хаксли (He, 2006) (1):

$$\frac{dE_m}{dt} = \frac{1}{C} \cdot Fj_r, \quad r \in (K^+, Cl^-, H^+, Ca^{2+}) \quad (1),$$

где E_m – мембранный потенциал; j_r – поток через мембрану иона сорта r ; C – удельная емкость мембраны; F – постоянная Фарадея.

Пассивный транспорт ионов описывали общепринятым уравнением Гольдмана-Ходжкина-Катца для потока ионов (Опритов и др. 1991; Spanswic, 2006) (2):

$$j = p^o P^{\max} \frac{zFE_m [r]_{in} - [r]_{out} \exp(-zFE_m/RT)}{RT (1 - \exp(-zFE_m/RT))} \quad (2),$$

где p^o - вероятность открытого состояния канала для данного иона, P^{\max} - максимальная удельная проницаемость для этого иона, $[r]_{in}$ и $[r]_{out}$ – концентрации несвязанного иона r в цитоплазме и апопласте соответственно, z – заряд иона, R и T – стандартные термодинамические величины.

Вероятность нахождения каналов в открытом состоянии находили исходя из количества их возможных состояний: открытое-закрытое для калиевых (Gradmann, 2001) и хлорных (Barbier-Brugoo et al., 2000) каналов; открытое-закрытое-инактивированное – для кальциевых (Опритов и др., 1991; White, 1998).

Динамику вероятности открытого состояния (p^o) ионных каналов описывали на основе работ (Gradmann, Hoffstadt, 1998; Gradmann, 2001) уравнениями (3) (для K^+ - и Cl^- -каналов) и (4) (для Ca^{2+} -каналов):

$$\frac{dp^o}{dt} = k_o \exp(E_m C^o / 2) (1 - p^o) - k_o \exp(C^o E^o - E_m C^o / 2) p^o \quad (3),$$

$$\begin{aligned} \frac{dp^o}{dt} = & k_o \exp(E_m C^o / 2) (1 - p^o - p^i) - k_o \exp(C^o E^o - E_m C^o / 2) p^o + \\ & + k_i \exp(E_m C^o / 2) p^i - k_i \exp(C^i E^i - E_m C^o / 2) p^o \end{aligned} \quad (4),$$

$$\frac{dp^i}{dt} = k_i \exp(E_m C^i / 2) p^o - k_i \exp(C^i E^i - E_m C^i / 2) p^i$$

где p^i - вероятность инактивированного состояния, C^o и C^i - константы, отражающие долю мембранного потенциала, который действует на воротные частицы при переходе в открытое (C^o) и инактивированное (C^i) состояния, и их заряд, E^o и E^i - потенциалы, отражающие разность потенциальных энергий между закрытым и открытым и открытым и инактивированным состояниями, соответственно, k_o и k_i - константы отражающие скорости перемещения воротных частиц в мембране.

Для хлорных каналов учитывали также зависимость их активности от содержания ионов кальция в клетке (Lewis et al., 1997) путем введения коэффициента A в уравнение (3):

$$A = \frac{[Ca^{2+}]_{in}^2}{K^2 + [Ca^{2+}]_{in}^2},$$

где A – доля активированных кальцием хлорных каналов, K – константа, равная концентрации ионов кальция, при которой доля активированных каналов равна 0.5, $[Ca^{2+}]_{in}$ – концентрация кальция в цитоплазме, степень «2» отражает необходимость

связывания двух ионов Ca^{2+} для активации одного хлорного канала (Берестовский и др., 1987). Полагали, что вероятность нахождения хлорных каналов в открытом состоянии близка к нулю при низких (ниже 10^{-7} М) внутриклеточных концентрациях Ca^{2+} (Barbier-Brygoo et al., 2000).

Первичный активный транспорт ионов описывали путем представления H^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы системами, которые способны принимать два состояния – свободное и связанное с ионами (Veilby, Shepherd, 2001):

$$j_p = E_o \frac{k_{+1}k_{+2} - k_{-1}k_{-2}}{k_{+1} + k_{-1} + k_{+2} + k_{-2}} \quad (5),$$

где E_o – общая концентрация фермента, k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} и k_{-2} – константы прямых (+) и обратных (–) переходов между состояниями: свободное \rightarrow связанное с ионом (1) и связанное с ионом \rightarrow свободное (2). k при этом зависели от величины E_m , концентрации переносимых ионов, энергии гидролиза АТФ. Для H^+ -АТФазы учитывали зависимость ее активности от $[\text{Ca}^{2+}]_{in}$ (De Nisi et al., 1999). При описании Ca^{2+} -АТФазы принимали, что она функционирует в режиме $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обмена (Bush, 1993) Вторичный активный транспорт ионов описывали без учета различных состояний переносчика. Скорость переноса была пропорциональна концентрациям переносимых ионов, а для электрогенного переноса ($2\text{H}^+/\text{Cl}^-$ -симпортер) – зависела также от E_m (уравнения (6) и (7)).

$$j_p^{Cl} = V^{Cl} \left([\text{Cl}^-]_{in} [\text{H}^+]_{in}^2 \frac{FE_m}{RT} \frac{1}{1 - \exp(-FE_m/RT)} - [\text{Cl}^-]_{out} [\text{H}^+]_{out}^2 \frac{FE_m}{RT} \frac{\exp(-FE_m/RT)}{1 - \exp(-FE_m/RT)} \right) \quad (6),$$

$$j_p^K = V^K ([K^+]_{in} [\text{H}^+]_{out} - [K^+]_{out} [\text{H}^+]_{in}) \quad (7),$$

где j_p^{Cl} и j_p^K – потоки Cl^- и K^+ , V^{Cl} и V^K – константы определяющие скорость переноса ионов $2\text{H}^+/\text{Cl}^-$ -симпортером и K^+/H^+ -антипортером, соответственно, которые являются произведением $V^r = k^r E^r$, где E^r – концентрация фермента, переносящего ион r , k^r – не зависящие от E_m и концентраций ионов константы переноса.

Модулирующее влияние температуры на системы активного транспорта (как первичного, так и вторичного) описывали коэффициентом Q_{10} , который полагали неизменным и равным 3, что характерно для ферментативных процессов (Варфоломеев, Гуревич, 1999).

Изменения концентрации ионов внутри и вне клетки описывали на основе уравнения (2), вводя коэффициенты $S_{кл}/V_{кл}$ (отношение площади поверхности клетки к ее объему) и $V_{кл}/V_{ан}$ (отношение объема клеток к объему апопласта). Для описания буферных свойств цитоплазмы и апопласта использовали модель, описанную в работе (Gradmann, 2001)

Параметры модели частично брали из данных литературы, частично подбирали. При подборе параметров использовали только такие значения, при которых результаты решения отдельных уравнений (токи и концентрации определенных ионов) находятся в пределах, характерных для растительных объектов. На

следующем этапе из полученного диапазона значений параметров выбирали те, при которых имеет место хорошее количественное соответствие итоговой модели экспериментальным данным (как в состоянии покоя, так и при возбуждении). Полученную на основе уравнений систему решали численно (Gradmann, Hoffstadt, 1998).

Верификация модели и анализ результатов математического моделирования

Численное решение уравнений модели показало, что в отсутствие раздражения значения E_m и концентраций ионов во внутри- и внеклеточном пространстве находятся на стационарном уровне и хорошо соответствуют величинам этих показателей у высших растений.

Результаты, полученные при имитации электрической стимуляции растительной клетки (временное повышение значений электрического потенциала плазматической мембраны на фиксированную величину) представлены на рис. 12. При подпороговых стимулах наблюдались лишь пассивные электротонические изменения E_m . При достижении порогового уровня происходила генерация ПД, амплитуда которого в дальнейшем не зависела от величины стимула.

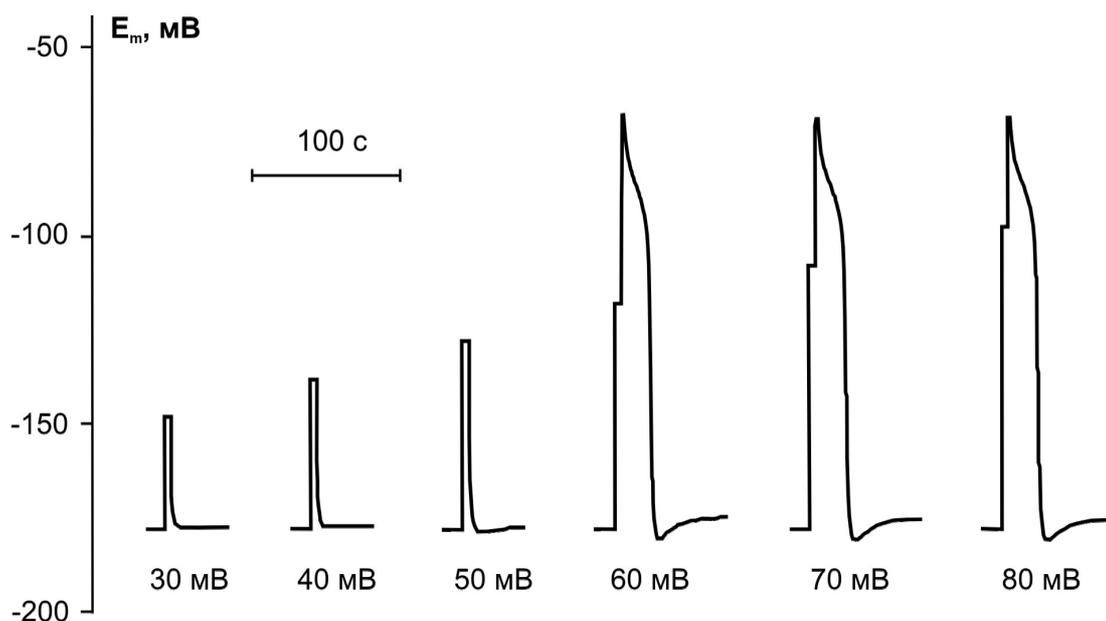


Рис. 12. Индукция ПД при имитации электрической стимуляции в модели. Электрическую стимуляцию описывали как фиксацию E_m на определенном значении в течение 4 сек. Сдвиг E_m направлен в сторону деполяризации, величина сдвига (от исходного уровня) показана под кривыми.

Имитация постепенного охлаждения вызывала характерные изменения E_m – плавная деполяризация мембраны, при достижении уровня порога возбуждения, сменялась генерацией ПД (рис. 13а). При этом описанные моделью изменения E_m (рис. 13а) имели высокое сходство с экспериментально зарегистрированными (рис.

10а). Полученный в результате моделирования ПД имеет сложную форму с развивающейся в два этапа фазой реполяризации.

Анализ ионных токов, рассчитанных на основании разработанной модели, показал, что основной вклад в развитие реполяризации на первом этапе вносит выходящий поток ионов K^+ , возникающий вследствие активации калиевых каналов, а на втором – выходящий поток H^+ , обеспеченный функционированием H^+ -АТФазы.

Непосредственное участие H^+ -АТФазы в формировании ПД экспериментально подтверждают данные о временном защелачивании внеклеточного пространства, которое сопровождает генерацию импульса. В модели, как и в эксперименте, величина внеклеточного рН увеличивалась во время фазы деполяризации и первого этапа фазы реполяризации ПД, а затем вновь снижалась (Рис. 13), причем этот эффект наблюдался лишь при описании зависимости активности H^+ -АТФазы от концентрации Ca^{2+} .

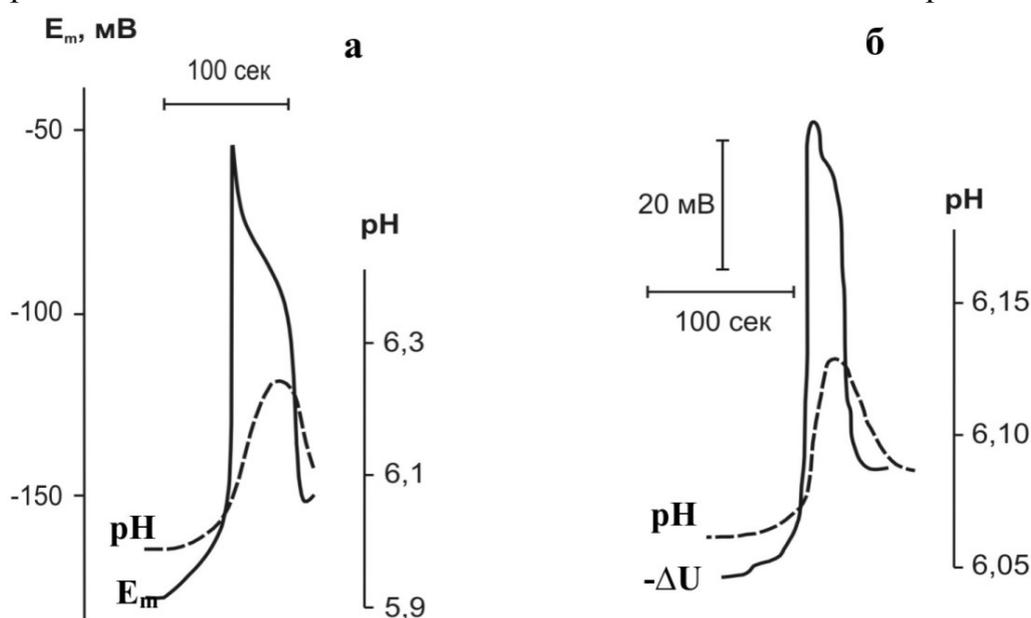


Рис. 13. Изменение внеклеточного рН при генерации индуцированного постепенным охлаждением ПД. а – рассчитано на основании модели, кривая показывает изменения рН апопласта; б – экспериментальные данные, рН регистрировали в растворе, омывающем участок стебля.

Кроме того, показано, что имитация действия ингибитора H^+ -АТФазы (в модели задавали доли активных молекул фермента) вызывала значительное уменьшение амплитуды импульса, вплоть до полного подавления генерации ПД. Такие результаты хорошо соответствуют экспериментам с использованием ингибиторов протонной АТФазы (рис. 3, 5б). Имитация действия блокаторов анионных каналов (в модели задавали уменьшением проницаемости для ионов Cl^-) ведет к уменьшению амплитуды ПД и возрастанию величины переходного изменения рН, что также хорошо согласуется с экспериментальными данными (рис. 9) и подтверждает предположение о сопряженности Cl^- и H^+ потоков при развитии фазы деполяризации.

Таким образом, проведенный анализ показывает хорошее соответствие теоретических и экспериментальных результатов, что может выступать в качестве подтверждения верности предложенной нами схемы механизма генерации ПД, положенной в основу модели. Это позволяет использовать разработанную модель для получения сведений, труднодоступных в прямом эксперименте, в частности для оценки динамики и интенсивности ионных потоков основных ПД-формирующих ионов (рис. 14). Как видно из рис. 14, при генерации ПД происходит значительное перекрытие деполяризующих и реполяризующих ионных потоков. Это ведет к значительному снижению скорости изменения потенциала и увеличению длительности ПД в сравнении с нервным импульсом, и как следствие, к значительному сдвигу ионных концентраций в клетке и внеклеточной среде.

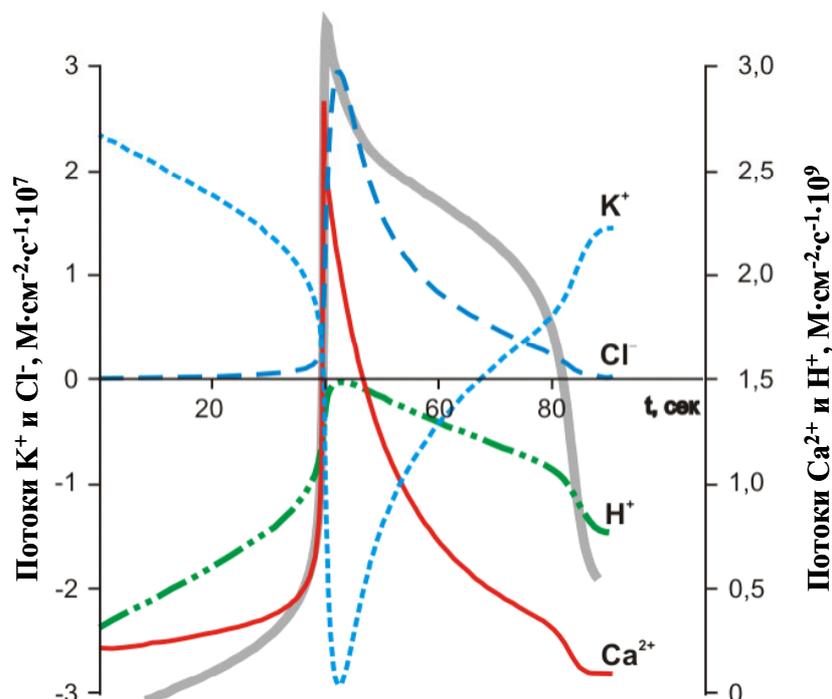


Рис. 14. Описанная моделью динамика ионных потоков при генерации ПД. Серая линия показывает изменения E_m (без оси ординат).

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМА ГЕНЕРАЦИИ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Электрофизиологическая характеристика ответных реакций, индуцированных повреждающим раздражением

Вариабельный потенциал (ВП), возникающий в ответ на повреждающее воздействие, представляет собой переходную деполяризацию (волну деполяризации), которая может быть осложнена возникновением импульсов (Оприлов и др., 1991; Медведев, 1998; Stankovic et al., 1998; Stahlberg et al., 2006; Davies, 2006). Параметры индуцированных однотипным раздражителем ВП — амплитуда, длительность, скорость развития фаз де- и реполяризации, а также количеством возникающих импульсов могут значительно различаться как у отдельных растений, так и при

повторном раздражении одного и того же растения. Отличительной особенностью ВП является также трансформация реакции по мере ее распространении. Пример подобного изменения биоэлектрической реакции представлен на рис. 15.

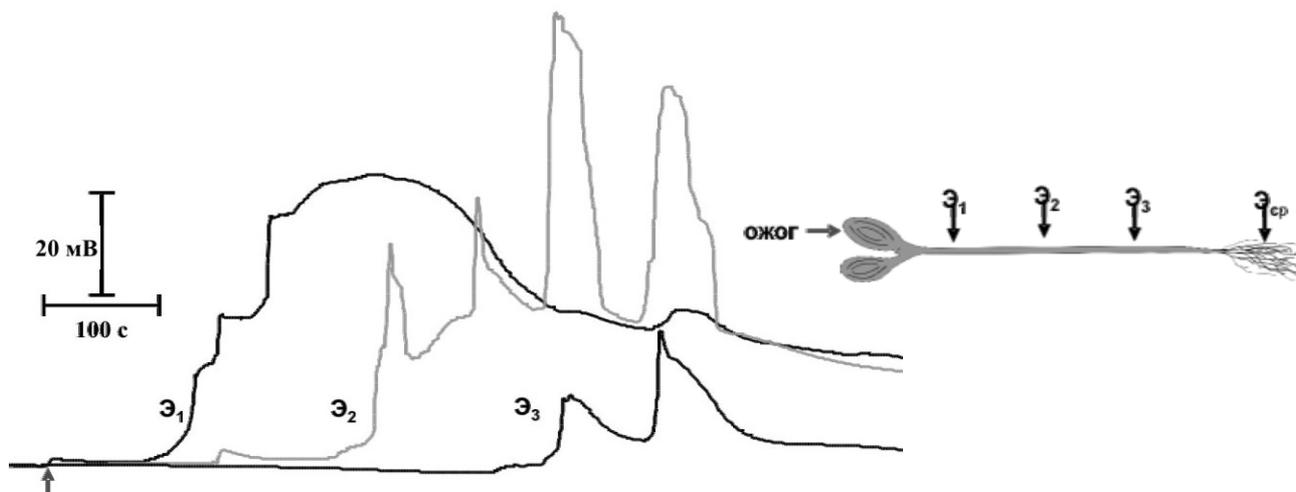


Рис. 15. Электрические ответы, индуцированные повреждающим раздражением, на различном расстоянии от места раздражения.

Стрелкой указан момент нанесения раздражения. Справа приведена схема измерений.

Зависимость амплитуды медленной волны деполяризации, скорости распространения ВП, а также количества импульсов в составе ВП от расстояния от зоны раздражения представлена на рис. 16. С увеличением расстояния происходит снижение амплитуды и скорости распространения ВП. Зависимость количества импульсов в составе ВП от расстояния имеет двухфазный характер – вначале наблюдается тенденция к возрастанию, в дальнейшем – происходит снижение.

Трансформация реакции по мере ее распространения принципиально отличает ВП от ПД, который характеризуется постоянной амплитудой и скоростью (Stanković et al., 1998; Dziubinska et al., 2001; Stahlberg et al., 2005). Отмеченные черты ВП (нерегулярность, изменение характеристик при удалении от зоны раздражения) связаны, по-видимому, с особенностями механизмов генерации и распространения этой электрической реакции.

Механизм генерации переменного потенциала

Принимая во внимание рассмотренные выше особенности ВП, можно полагать, что механизм его генерации, сведения о котором на сегодняшний день весьма фрагментарны (Stahlberg et al., 2006), носит сложный комплексный характер. Поскольку ВП представляет собой переходную деполяризацию, необходимо рассмотрение в первую очередь тех ионных потоков, возникновение которых может обеспечить развитие деполяризации клеток высших растений. Наиболее вероятен вклад в развитие деполяризации следующих ионных потоков: 1) входящий поток ионов Ca^{2+} в цитозоль из внеклеточной среды; 2) выходящий из клеток поток ионов Cl^- и, возможно, других анионов; 3) диссипация протонного градиента, связанная с остановкой электрогенного протонного насоса ПМ (Пятыгин и др., 2006; Stahlberg et

al., 2006). Было исследовано возможное участие указанных ионных потоков в формировании индуцированного ожогом ВП у проростков тыквы. С этой целью проводили ингибиторный анализ возникающих электрических реакций и регистрировали изменения ионных концентраций, сопровождающих генерацию ВП.

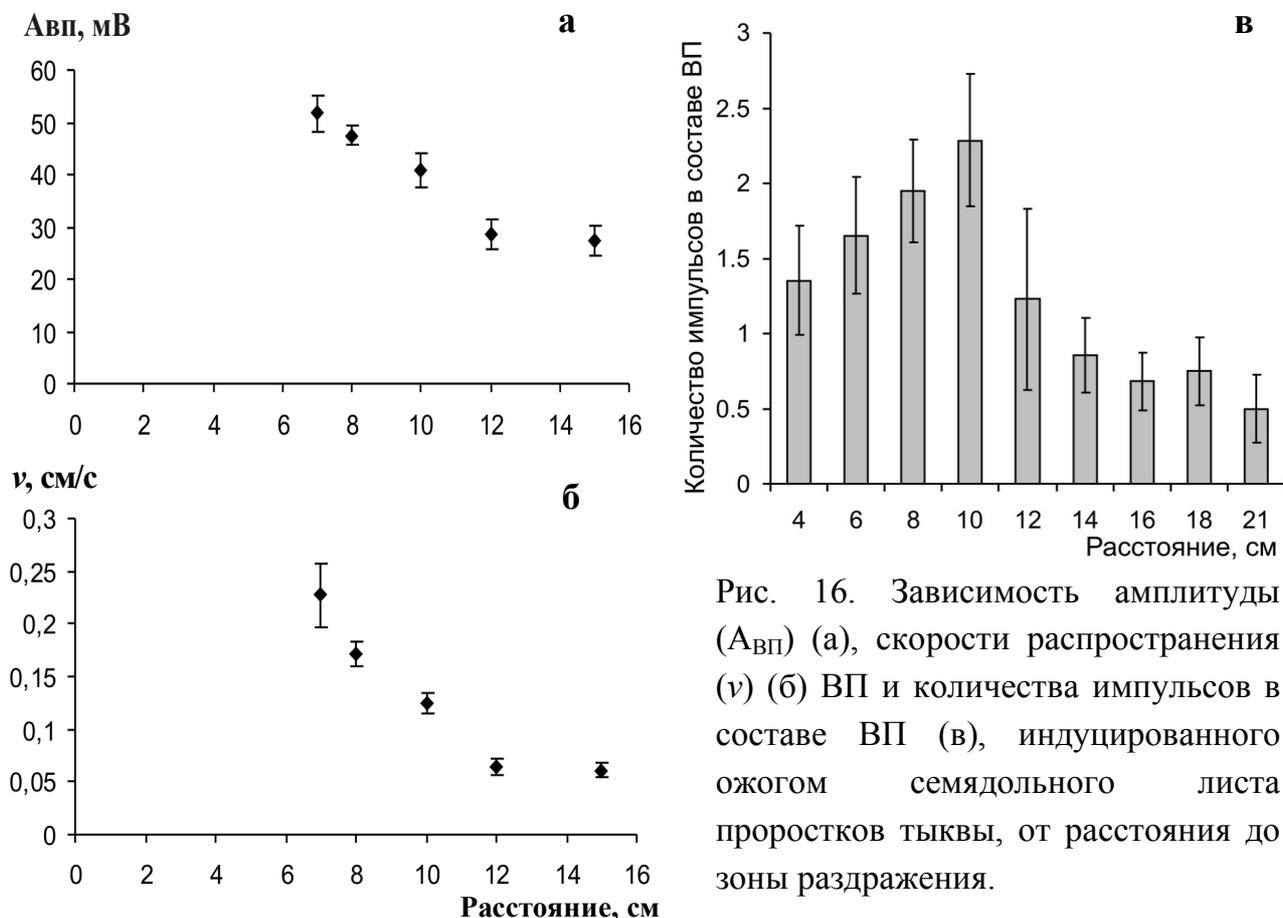


Рис. 16. Зависимость амплитуды (AВП) (а), скорости распространения (v) (б) ВП и количества импульсов в составе ВП (в), индуцированного ожогом семядольного листа проростков тыквы, от расстояния до зоны раздражения.

Применение NaN_3 , вызывающего угнетение метаболической компоненты E_m , приводило к деполяризации в зоне действия агента и снижению амплитуды ВП. По-видимому, угнетение генерации ВП в присутствии NaN_3 связано со снижением уровня АТФ в клетках и угнетением электрогенного насоса, что, в свою очередь, может указывать на его участие в формировании ВП. Подобное предположение, основанное на угнетении генерации ВП при использовании локального охлаждения, ингибитора метаболизма (CN^-) и разобщителя КЦХФГ, а также на увеличении амплитуды ВП в присутствии активатора H^+ -АТФазы фузикокина было высказано ранее в работах (Roblin, Bonnemain, 1985; Julien et al., 1991; Julien, Franchisse, 1992; Stahlberg, Cosgrove, 1992; Rousset et al., 2002). Однако угнетение генерации ВП при подавлении активности электрогенного насоса может быть связано также и с участием H^+ -АТФазы в создании электрохимических градиентов ионов (Maathuis, Sanders, 1999; Sze et al., 1999; Morsomme, Boutry, 2000), разрядка которых может вносить вклад в формирование электрической реакции.

Более прямые данные о возможном участии электрогенного H^+ -насоса в генерации ВП могут быть получены при регистрации изменений рН, сопровождающих развитие реакции. Из рис. 17а видно, что генерация ВП сопровождается временным по-вышением рН внеклеточной среды. Как показали результаты исследования механизма генерации ПД, подобные изменения рН могут быть обусловлены временной инактивацией протонной H^+ -АТФазы. При генерации ВП наблюдается более длительное защелачивание внеклеточного рН в сравнении с таковым при ПД. Это может указывать на то, что при генерации ВП происходит более длительная в сравнении с ПД инактивация H^+ -АТФазы. Вероятно, продолжительная инактивация электрогенного насоса обуславливает медленное развитие фазы реполяризации ВП. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что в формирование ВП вносит вклад временное снижение активности электрогенного насоса.

Однако сложный характер развития реакции, в частности, быстрое изменение потенциала переднего фронта ВП и наличие импульсов в составе ВП, могут указывать на то, что наряду с электрогенным насосом в генерацию ВП вносят вклад и пассивные потоки других ионов, связанные с активацией ионных каналов. Было обнаружено уменьшение амплитуды ВП при внесении в омывающий раствор 2 мМ ЭГТА, что указывает на участие входящего из внеклеточной среды потока Ca^{2+} в генерации ВП в стебле проростков тыквы. Значительное уменьшение амплитуды ВП при блокировании входящего кальциевого потока с помощью ЭГТА и La^{3+} было продемонстрировано также в работе (Julien et al., 1991), в которой в качестве объекта исследования использовали *Bidens pilosa*. Опираясь на сведения о механизме генерации ПД у высших растений (Опритов и др., 1991; Sibaoka, 1991; Davies, 2006) можно предположить, что ионы кальция выступают главным образом как триггер процесса деполяризации, что согласуется с представлениями об участии этого иона в генерации ВП в качестве сигнального фактора, а не непосредственного носителя заряда (Julien et al., 1991; Rousset et al., 2002).

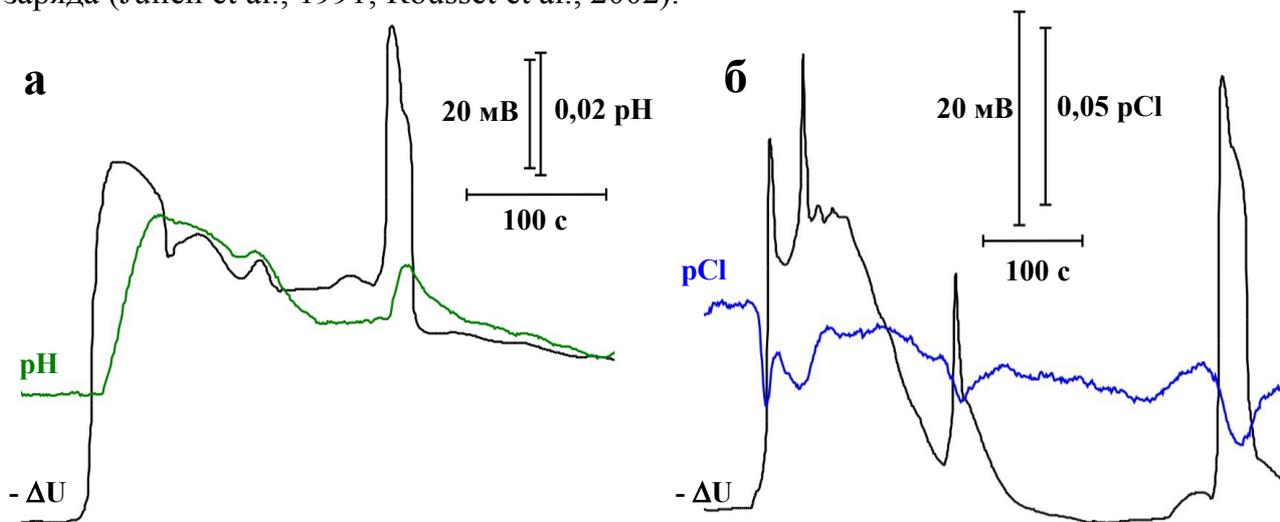


Рис. 17. Изменение рН (а) и рСl (б) во внеклеточной среде при генерации ВП, индуцированных ожогом семядольного листа проростков тыквы.

На рис. 17б показано изменение концентрации ионов Cl^- во внеклеточной среде при генерации ВП. Генерация переднего фронта ВП, а также электрических импульсов, входящих в состав ВП, сопровождается переходным увеличением концентрации ионов Cl^- . При этом, если обратить внимание на динамику изменения концентрации Cl^- и H^+ (рис.17а, б), то следует отметить, что изменения pCl^- по времени в большей степени соответствуют развитию переднего фронта ВП, чем изменения pH . Это может указывать на то, что выходящий поток ионов Cl^- вносит больший вклад в формирование переднего фронта в сравнении с входящим потоком протонов. Применение блокатора анионных каналов (0,5 мМ ЭК) вызывает снижение амплитуды ВП. Это свидетельствует о том, что выходящий поток ионов Cl^- связан с активацией анионных каналов.

Завершая рассмотрение механизма генерации ВП в стебле проростков тыквы, необходимо подчеркнуть комплексную природу этой электрической реакции. Вклад в ее формирование вносят как возникновение пассивных потоков ионов (Ca^{2+} , Cl^-), идущих по электрохимическому градиенту, так и изменение активности электрогенного насоса. Участие трех указанных ионных потоков продемонстрировано нами как при генерации ПД, так и ВП, что может указывать на универсальность механизмов, обеспечивающих деполяризацию клеток высших растений (Пятыгин и др., 2006). На настоящий момент не представляется возможной точная оценка вклада определенного ионного потока в формирование ВП, однако необходимо подчеркнуть важное обстоятельство – распространение по растению из зоны локального раздражения как ПД, так ВП вызывает *качественно сходное* изменение внутри- и внеклеточных ионных концентраций.

Механизм распространения переменного потенциала

В настоящее время существует три гипотезы, описывающие механизм распространения ВП. 1) Согласно первой гипотезе ВП имеет электрический (электротонический) механизм распространения, т.е. распространяется подобно ПД (Цаплев, Зацепина, 1980; Wildon et al., 1992). 2) Гидравлическая гипотеза распространения ВП предполагает распространение области повышенного давления в сосудах ксилемы, что вызывает деполяризацию клеток за счет изменения тургора (Malone, 1992; Stahlberg, Cosgrove, 1997; Stankovic et al., 1997; Mancuso, 1999). 3) Химическая гипотеза распространения ВП основывается на предположении о диффузии некоего соединения («раневого вещества», «фактора Рикка») из зоны повреждения по сосудам (Umrath, 1959; Cheeseman, Pickard, 1977; Roblin, Bonnemain, 1985) с целью проверки электрической гипотезы сравнивали экспериментально зарегистрированную скорость распространения ВП со скоростью распространения сигнала, рассчитанную на основании кабельного уравнения. Теоретически рассчитанная скорость распространения ВП составила $22,6 \pm 2,6$ мм/с, что на порядок превышает экспериментально зарегистрированную скорость распространения ВП ($2,3 \pm 0,8$ мм/с) (рис. 18). В то же время, для ПД экспериментально зарегистрированная

скорость распространения ($24 \pm 2,2$ мм/с) хорошо согласуется со скоростью, рассчитанной теоретически ($21,3 \pm 3,2$ мм/с) (рис. 18).

Полученные результаты противоречат электрической гипотезе распространения ВП. Следовательно, в стебле проростков тыквы может происходить передача имеющего электрический механизм распространения ПД, подчиняющаяся кабельному уравнению, и не подчиняющаяся ему передача ВП, имеющего отличный от электрического механизм распространения. Иными словами, ВП нельзя рассматривать как *распространяющуюся электрическую реакцию*, по сути, ВП является *местной электрической реакцией*, генерируемой клетками в ответ на действие некоего *распространяющегося фактора*.

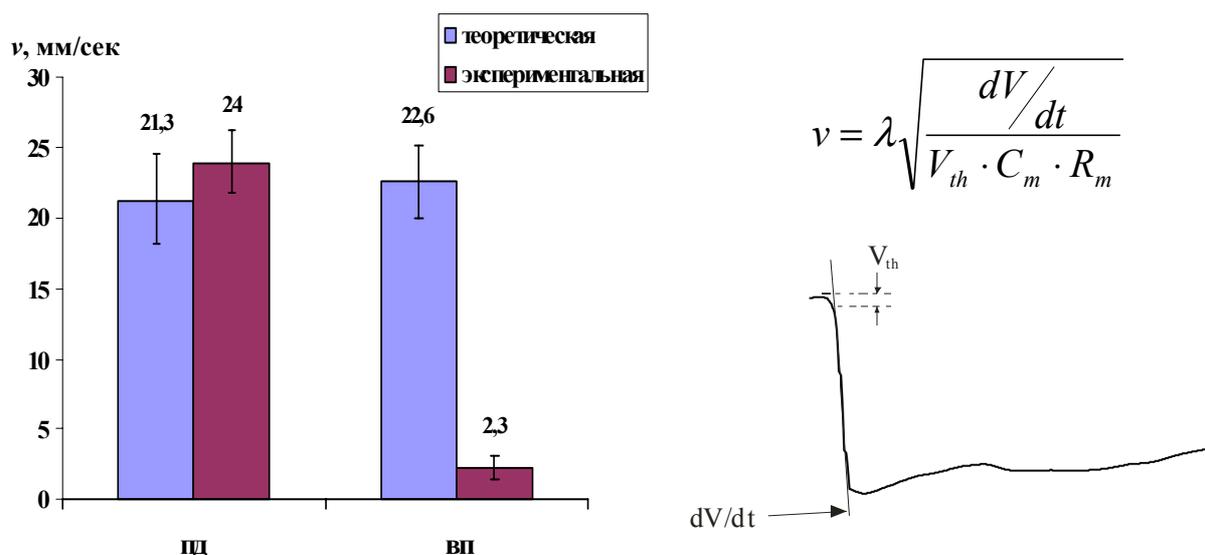


Рис. 18. Скорости распространения ВП и ПД, рассчитанные на основании кабельного уравнения и зарегистрированные экспериментально.

Справа приведено выражение, использованное для теоретического расчета скорости распространения и схема определения входящих в него параметров.

С целью проверки гидравлической гипотезы распространения ВП нами была изучена динамика индуцированной повреждением деформации листа пшеницы на расстоянии от зоны раздражения, которая свидетельствует о распространении по тканям растения гидравлического сигнала (Stankovic et al., 1998; Mancuso, 1999). Для оценки указанных изменений был использован метод оптической когерентной микроскопии. Была зарегистрирована вызванная ожогом быстрая деформация листа, которая представляла собой складывание листовой пластины вдоль центральной жилки. Движение листа, индуцированное распространением гидравлической волны, опережает электрический ответ. Это согласуется с предположением о том, что гидравлический сигнал индуцирует генерацию ВП, высказанном в работах (Malone, 1992; Stahlberg, Cosgrove, 1997; Stankovic et al., 1997; Mancuso, 1999).

Тем не менее, было обнаружено несоответствие в скоростях распространения электрического и гидравлического сигналов. Кривая 1 на рис. 19 показывает зависи-

мость от расстояния до зоны повреждения временного интервала между раздражением и началом движения листа. Кривая 2 демонстрирует такую зависимость для электрической реакции. Как видно из рисунка, разница во времени между началом деформации листа и началом электрической реакции значительно растет с увеличением расстояния. Следовательно, можно сделать предположение, что ожог вызывает две реакции – гидравлический сигнал и ВП – которые являются независимыми. Это противоречит гидравлической гипотезе распространения ВП.

Несоответствие в скоростях распространения может быть объяснено с привлечением химической гипотезы распространения ВП. Зависимость временной задержки между раздражением и началом электрической реакции хорошо описывается теоретически с помощью диффузионного уравнения в случае одномерной диффузии (Рубин, 1987; Codling et al., 2008). Кривая 3, рис. 19 демонстрирует теоретическую зависимость, связывающую время после раздражения и расстояние, на которое диффундирует гипотетическое «раневое вещество» из зоны повреждения. Экспериментально обнаруженная зависимость (кривая 2) хорошо соответствует теоретической кривой при D около 10^{-2} см²/с, что на 2-3 порядка превышает молекулярные коэффициенты диффузии небольших молекул в растворах (Levich, 1962). Известно, что значительное увеличение скорости диффузии происходит при конвекции, которая может быть обусловлена процессами дистального и радиального водного транспорта и сложной геометрией сосуда (Roth, 1996), а также распространением волны повышенного давления.

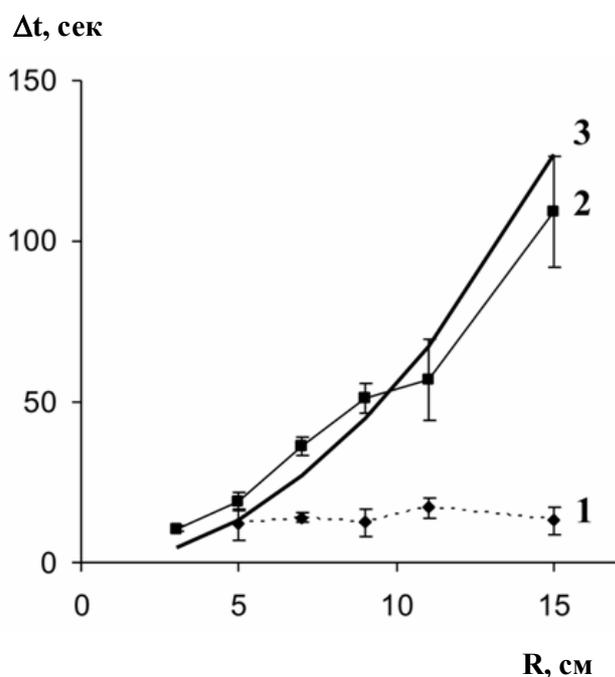


Рис. 19. Зависимость временного интервала (Δt) между раздражением и началом движения листовой пластины (кривая 1) или началом развития электрической реакции (кривая 2) от расстояния (R) между зонами раздражения и регистрации. Кривая 3 отражает теоретическую зависимость для одномерной диффузии (пояснения в тексте).

Таким образом, проведенный теоретический анализ позволяет предположить, что генерацию ВП индуцирует распространение «раневого вещества». При этом распространение «раневого вещества» может зависеть от изменения потоков жидкости в ксилеме, связанного с прохождением гидравлической волны.

В целом, полученные результаты и имеющиеся данные литературы позволяют предположить следующую гипотетическую последовательность событий при развитии электрической реакции, вызванной повреждающим раздражителем. Локальное повреждение вызывает повышение ксилемного давления и/или появление «раневого вещества» в зоне раздражения. Маловероятно, что в условиях повреждения происходит синтез «раневого вещества» *de novo*. Возможно, таким веществом являются либо соединение, отсутствующее в норме в апопласте, но присутствующее в клетках и высвобождающееся в результате их разрушения, либо части разрушенных молекул.

Диффузия «раневого вещества» в сосудах, ускоренная распространением волны повышенного давления, либо гидравлический сигнал в чистом виде, является тем фактором, который индуцирует генерацию ВП на расстоянии от зоны повреждения. Можно полагать, что триггером электрических изменений является вход в клетки ионов Ca^{2+} (Julien et al., 1991; Rousset et al., 2002). Следовательно, фактор, инициирующий генерацию ВП должен вызывать, в первую очередь, активацию Ca^{2+} -каналов, лиганд-управляемых, либо механо-чувствительных. (Приведенное ниже описание последующей трансформации реакции при распространении может быть проиллюстрировано примером, изображенным на рис. 15). На небольшом расстоянии от зоны повреждения, где сила действующего фактора (концентрация «раневого вещества» или величина давления) велика, происходит массивный вход ионов кальция в клетки, вызывающий длительное угнетение активности значительной доли молекул H^+ -АТФазы наряду с активацией анионных каналов, что ведет к развитию длительной деполяризации, имеющей большую амплитуду. Вероятно, значительный вклад в развитие переднего фронта ВП вносит выходящий поток Cl^- . Длительная инактивация протонной АТФазы обуславливает медленное развитие фазы реполяризации ВП. Понижение с расстоянием силы действия фактора (снижение концентрации «раневого вещества» или давления) вызывает уменьшение входа Ca^{2+} в клетки, и, как следствие, снижение доли инактивированных молекул H^+ -АТФазы. В то же время возможна активация значительного числа анионных каналов. Это выражается в снижении амплитуды медленной волны деполяризации, на фоне которой возникают отдельные импульсы. Дальнейшее снижение с расстоянием силы действия фактора ведет к значительному уменьшению входа Ca^{2+} в клетки, и, как следствие, к снижению доли инактивированных молекул H^+ -АТФазы и активированных анионных каналов, что проявляется в практически полном затухании как медленной волны деполяризации, так и сопровождающих ее импульсов.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПОТЕНЦИАЛОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Главная функция ПД у животных состоит в быстрой передаче информации (Эккерт и др., 1992). Функциональная роль ПД в организме высших растений менее ясна и является предметом пристального внимания исследователей (Оприлов и др., 1991; Sibaoka, 1991; Thain, Wildon, 1996; Оприлов, 1998; Пятыгин, 2003). Наиболее изучена она у сравнительно небольшой группы так называемых «двигательных» растений, где ПД принимают участие в механизме осуществления быстрых локомоторных реакций (Sibaoka, 1991; Вайнар, 1987). Вполне определенной представляется также роль ПД в подготовке генеративных органов растений к оплодотворению (Sinyukhin, Britikov, 1967; Духовный, 1973). Менее ясна функция ПД, возникающих в вегетативных органах высших растений под влиянием различных неблагоприятных факторов и распространяющихся по стеблю на весьма значительные расстояния.

Сигнальная роль потенциалов действия

Генерация ПД в возбудимых клетках высшего растения хронологически связана, как правило, с начальным этапом влияния раздражителя, и это обстоятельство отчетливо свидетельствует об опережающем, сигнальном характере данной импульсной биоэлектрической реакции. Можно предположить, что задача этой реакции состоит в передаче определенной информации покоящимся тканям и органам. Между тем, анализ показывает, что распространяющийся за пределы зоны раздражения ПД, по-видимому, не может передавать информацию о характере раздражающего внешнего фактора, а лишь сигнализирует о начале его действия. Основными причинами являются:

1. Для передачи информации, закодированной, как у животных объектов, в частотном режиме, необходима многократно повторяющаяся ритмическая импульсация (Иост, 1975), которая для растений нехарактерна. К тому же у растений отсутствует орган декодирования этой информации, соответствующий центральному отделу нервной системы животных (Смит, 2005).

2. Передача определенной информации о раздражителе с помощью одиночного ПД возможна лишь при условии зависимости его параметров от модальности раздражителя. Однако принцип «все или ничего», в соответствии с которым возникает ПД, не способствует появлению зависимости импульсов от специфики раздражителя. В то же время известно, что восприятие клетками стимулов различной модальности и последующая трансдукция сигнала о них внутрь клетки происходит при участии различных транспортных механизмов (Pyatygin et al., 1992; Plieth et al., 1999; Fasano et al., 2002), что определенным образом, по-видимому, может отразиться на параметрах ПД (например, их длительности и/или амплитуде) непосредственно в зоне раздражения. Однако при распространении ПД по стеблю, которое осуществляется по одним и тем же проводящим путям и на основе одного и того же механизма, возможность зависимости импульсов от природы раздражителя фактически исключается.

Таким образом, больше оснований считать, что распространяющийся по стеблю высшего растения ПД – это неспецифический биоэлектрический сигнал, который не зависит от природы раздражителя и, соответственно, не несет информацию о нем. Являясь неспецифическим биоэлектрическим сигналом, распространяющийся ПД должен вызывать, в свою очередь, неспецифические функциональные изменения в тканях и органах, которых достигает. В дальнейшем нами была предпринята попытка выяснения того, на что могут быть направлены индуцированные неспецифическими электрическими сигналами функциональные изменения. С этой целью исследовали влияние ПД и ВП на изменение замедленной флуоресценции (ЗФ) и содержание АТФ, а также определяли роль индуцированных потенциалами возбуждения ответов в развитии повышения устойчивости проростков тыквы к охлаждению.

Влияние электрических сигналов на интенсивность замедленной флуоресценции, содержание АТФ в листе и холодоустойчивость проростков тыквы

Было показано, что распространяющиеся электрические реакции вызывают временное усиление интенсивности ЗФ (рис. 20), которое свидетельствует об активации световой стадии процесса фотосинтеза (Авакян, 1991, 1993). В совокупности с данными об индуцированном ПД усилении поглощения CO_2 (критерий активности темновой стадии фотосинтеза) (Гунар, Синюхин, 1963; Fromm, Eshrich, 1993; From, Fei, 1998) можно, вероятно, говорить о вызванной БЭР активации процесса фотосинтеза в целом.

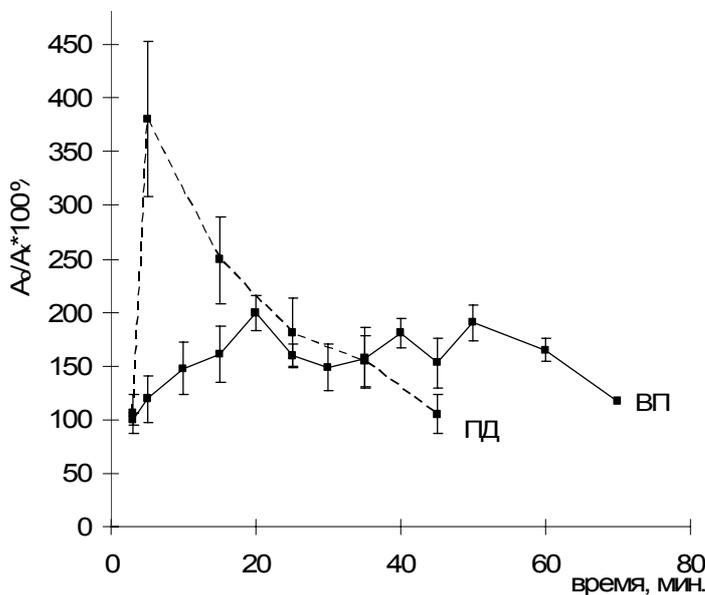


Рис. 20. Зависимость относительного изменения амплитуды ЗФ (A_o/A_k) от времени после генерации ПД и ВП.

Так как одним из конечных продуктов световой стадии фотосинтеза является АТФ, то активация этого процесса должна приводить к повышению содержания АТФ в клетках высшего растения. Динамика изменения содержания АТФ под влиянием распространяющихся БЭР хорошо соответствовала усилению интенсивности ЗФ. Это

позволяет предположить, что увеличение содержания АТФ обусловлено активацией процесса фотосинтеза. Данное предположение было подтверждено снижением эффекта электрических сигналов на содержание АТФ в условиях подавления активности фотосистемы II с помощью диурона.

Помимо исследованных нами изменений активности фотосинтеза и временного повышения содержания АТФ на сегодняшний день известен целый ряд индуцированных ПД и ВП функциональных изменений: усиление газообмена (Sinyukhin, Britikov, 1967; Dziubinska et al., 1989; Fromm et al., 1995), замедление флоэмного транспорта (Fromm, Bauer, 1994), индукция экспрессии гена *pin2* (Stankovic, Davies, 1996; Fisahn et al., 2004), индукция биосинтеза жасмоновой кислоты (Fisahn et al., 2004), ингибирование синтеза белка (Davies, Stankovic, 2006) и др. Широкий круг вызванных потенциалами возбуждения функциональных ответов ставит вопрос о том, на что могут быть направлены подобные изменения.

В работах Ретивина В.Г. и соавторов (Ретивин и др., 1997, 1999) было выдвинуто предположение, что конечной целью индуцированных электрическими сигналами изменений функционального состояния растения является повышение его неспецифической устойчивости. В то же время, вопрос о возможной связи индуцированных потенциалами возбуждения функциональных эффектах и повышением устойчивости остается в настоящее время не изученным. Было проведено исследование роли ПД и ВП в повышении устойчивости проростков тыквы к охлаждению и определение возможной роли в повышении холодоустойчивости индуцированных электрическими сигналами изменений активности фотосинтеза и содержания АТФ.

Изучение действия ВП на холодоустойчивость через 20 и 50 мин после стимуляции показало, что в обоих случаях наблюдается достоверное повышение холодоустойчивости (на 87 ± 22 и 101 ± 37 %, соответственно). Распространение ПД вызывало повышение холодоустойчивости объекта через 20 мин после нанесения раздражения (на 67 ± 21 %), однако не вызывало достоверных изменений через 50 мин. В ходе дальнейшего исследования было показано, что обработка диуроном приблизительно в 2 раза снижала исходную холодоустойчивость растения (до 46 ± 10 % от холодоустойчивости необработанного растения) и полностью устраняла ее увеличение при использовании локальных раздражителей. Полученные результаты дают основание полагать, что увеличение содержания АТФ, связанное с активацией фотосинтеза, может являться одним из механизмов, лежащих в основе индуцированного электрическими сигналами повышения устойчивости.

Таким образом, в ходе проведенного теоретического и экспериментального анализа было показано, что потенциалы возбуждения у высших растений являются, по-видимому, неспецифическими биоэлектрическими сигналами, не передающими информацию о характере вызвавшего их локального раздражителя. Следовательно, не передавая информацию о характере раздражителя электрические сигналы, вызывают неспецифические функциональные изменения. Поскольку круг индуцированных ПД

и ВП функциональных эффектов довольно широк, то маловероятно, учитывая отсутствие информации о характере раздражителя, чтобы каждый из них имел определенную конечную цель. Более вероятно, что возникающие функциональные эффекты лежат в основе развития единой более общей реакции растительного организма. Предположено, что такой конечной целью индуцированных электрическими сигналами изменений, может являться повышение устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет с определенностью заключить, что у высших растений в ответ на действие различных внешних раздражителей могут возникать ПД. Важную роль в инициации ПД играют местные биоэлектрические реакции, возникающие в зоне локального раздражения и обладающие рядом свойств, характерных для рецепторных потенциалов животных.

Механизм генерации ПД у высших растений имеет комплексную природу, наряду с пассивными потоками ионов Ca^{2+} , Cl^- и K^+ непосредственное участие в формировании импульса принимает H^+ -АТФаза ПМ. При генерации ПД H^+ -насос претерпевает переходное изменение активности: инактивация, вызванная увеличением в цитозоле концентрации ионов Ca^{2+} в начальный момент возбуждения, сменяется активацией на фазе реполяризации импульса.

У разных групп растений (например, локомоторных и «обычных») соотношение между метаболическим и пассивным механизмами генерации ПД, может быть различным. Весьма вероятно, что у локомоторных растений ПД (обладающий меньшей длительностью, более высокой скоростью изменения потенциала) является более пассивным по природе, чем ПД у «обычных» растений. Это обстоятельство существенно для понимания пути, по которому шла эволюция процесса возбуждения как у растений, так и у живых организмов в целом. Становится очевидным, что совершенствование функции возбуждения сопровождалось, судя по всему, уменьшением степени непосредственного сопряжения ПД с работой электрогенного насоса возбудимой мембраны, что делало механизм генерации импульсов, по-видимому, менее энергетически затратным, менее зависящим от условий среды и, как следствие, более эффективным. Так нервный импульс животных, который в эволюционном плане несомненно выше ПД у растений, фактически полностью опосредован пассивными трансмембранными потоками ионов.

Однако необходимо подчеркнуть, что такие особенности ПД у высших растений (которые могут быть рассмотрены как черты несовершенства), как большая длительность, значительные нарушения ионных концентраций и наличие широкого круга ионов, принимающих непосредственное участие в формировании импульса, являются, по-видимому, основой эффективного преобразования электрического

сигнала в функциональный ответ. Вероятно, именно изменения ионных концентраций, вызванные ионными потоками, лежащими в основе ПД и ВП, являются пусковым механизмом возникающих функциональных изменений (таких как изменение дыхания, синтез стрессовых гормонов и др.).

Потенциалы возбуждения в процессе распространения в определенной степени ведут себя подобно раздражителю, вызывая изменения, сходные по содержанию с неспецифической составляющей функционального ответа в зоне непосредственного раздражения (рис. 21).

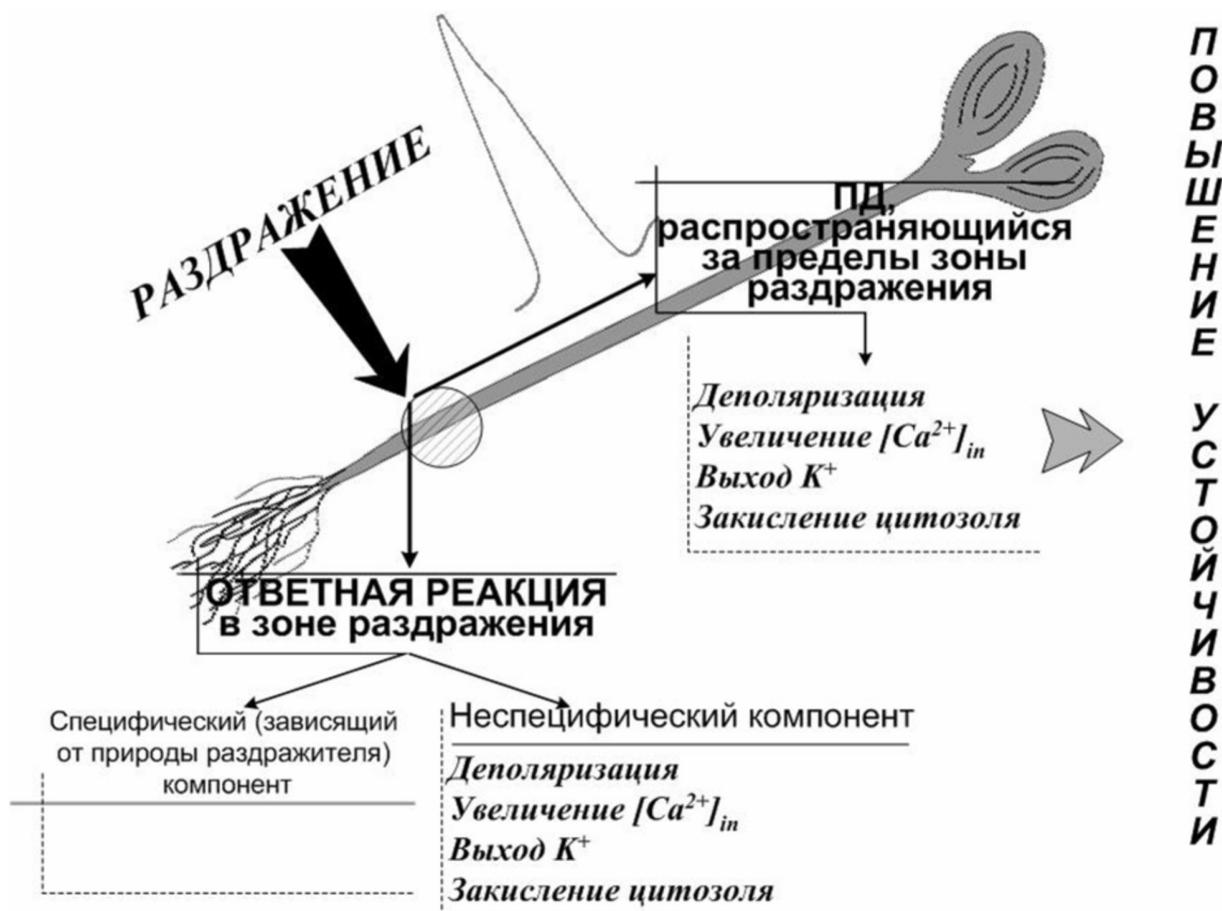


Рис. 21. Схема, иллюстрирующая сходство реакций, вызываемых действием раздражителя непосредственно в зоне локального раздражения и индуцированных распространяющимся ПД за пределами зоны раздражения.

ВЫВОДЫ

1. Местные биоэлектрические реакции, возникающие непосредственно в зоне локального раздражения высших растений, не обладающих локомоторной активностью, проявляют градуальность - зависимость амплитуды от интенсивности раздражителя и способность генерировать ПД по достижению порогового уровня.

2. Процесс генерации ПД у высших растений зависит от величины метаболической компоненты мембранного потенциала, возникающей при участии электрогенного насоса ПМ. Применение ингибиторов H^+ -АТФазы, анализ скорости изменения потенциала при формировании импульса и регистрация изменений внеклеточного рН показало, что электрогенный насос принимает непосредственное участие в генерации ПД. Во время генерации ПД происходит переходное изменение активности H^+ -АТФазы – инактивация на фазе деполяризации и реактивация на фазе реполяризации импульса. Фактором, угнетающим активность насоса, выступает увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в начальный момент возбуждения.

3. Вход ионов Ca^{2+} в клетку необходим для развития ПД у высших растений, при этом Ca^{2+} выступает как иницирующий фактор и не вносит существенного вклада в изменение потенциала. Это подтверждают полное подавление процесса генерации ПД при удалении ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды и применении блокатора Ca^{2+} каналов верапамила, а также неизменность амплитуды ПД при увеличении содержания Ca^{2+} во внеклеточной среде от 0,1 до 10 мМ.

4. Фаза деполяризации ПД формируется выходящим потоком Cl^- , возникающим вследствие активации анионных каналов, и входящим потоком H^+ , возникающим вследствие инактивации H^+ -АТФазы. Оба потока возникают вследствие увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в клетке в начальный момент возбуждения. Определяющий вклад в формирование фазы деполяризации вносит выход ионов Cl^- , о чем свидетельствует более сильное подавление амплитуды ПД при использовании блокаторов анионных каналов в сравнении с угнетением входящего потока H^+ и более значительные изменения концентрации ионов Cl^- в сравнении с H^+ . Анализ скорости изменения E_m при развитии импульса показал, что фаза реполяризации ПД формируется в два последовательных этапа. Первый этап фазы реполяризации формируется выходящим по электрохимическому градиенту потоком ионов K^+ . Второй этап фазы реполяризации формируется электрогенным насосом ПМ.

5. Предложена новая схема механизма генерации ПД у высших растений, включающая пассивные потоки ионов Ca^{2+} , Cl^- и K^+ , а также изменение активности электрогенного насоса. Математическая модель, построенная на основании предложенной схемы, позволяет получать стационарные значения потенциала в покое и генерацию ПД при имитации раздражения. Симулированные моделью изменения потенциала и ионных концентраций имеют хорошее соответствие с экспериментально зарегистрированными результатами, что служит подтверждением выдвигаемых гипотез.

6. Амплитуда и скорость распространения ВП снижаются по мере удаления от зоны локального повреждения. Скорость распространения ВП не соответствует скорости, рассчитанной с применением кабельного уравнения, что отрицает электротонический механизм его распространения. Не обнаружено соответствия между скоростью распространения ВП и скоростью распространения гидравлического сигнала, индуцированного повреждением листа пшеницы. Генерация ВП связана с возникновением потоков Ca^{2+} , Cl^- , H^+ . Наибольший выход Cl^- имеет место при развитии импульсной деполяризации в составе ВП, что может указывать на значительный вклад данного иона в ее формирование.

7. Потенциал действия и переменный потенциал, распространяясь по растению, вызывают комплекс неспецифических изменений, в частности, временное повышение интенсивности замедленной люминесценции и содержания АТФ в семядольных листьях проростков тыквы, которые играют важную роль во временном повышении устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях

1. Пятыгин С.С., Опритов В.А., Половинкин А.В., Воденеев В.А. О природе генерации потенциала действия у высших растений // Доклады РАН. 1999. Т.36, №3. С. 404-407.
2. Пятыгин С.С., Опритов В.А., Крауз В.О., Абрамова Н.Н., Воденеев В.А. Биоэлектрическая активность клеток высшего растения при химическом стресс-воздействии // Вестник ННГУ. Серия Биология. 1999. Вып.1. С. 119-123.
3. Пятыгин С.С., Опритов В.А., Абрамова Н.Н., Воденеев В.А. Первичная биоэлектрическая реакция клеток высшего растения на комбинированное действие стресс-факторов различной природы // Физиология растений. 1999. Т.46, №4. С.610-617.
4. Воденеев В.А. Первичная биоэлектрическая реакция клеток стебля тыквы при воздействии высоких концентраций ионов кальция // Биосистемы: Структура и регуляция. Под. ред. Г.А. Ануфриева. Н. Новгород: ННГУ, 2000. С.132-141.
5. Пятыгин С.С., Опритов В.А., Воденеев В.А. Доказательство стабилизации величины мембранного потенциала клеток высшего растения при участии электрогенного насоса плазмалеммы // Вестник ННГУ. Серия Биол. 2001. Вып.2. С. 187-189.
6. Воденеев В.А., Орлова О.В. Анализ модулирующего влияния ионов Ca^{2+} на гидролитическую активность H^+ -АТФазы плазматических мембран клеток тыквы // Вестник ННГУ. Серия Биология. 2001 Вып. 3. С.39-41.
7. Опритов В.А., Пятыгин С.С., Воденеев В.А. Непосредственное сопряжение генерации потенциала действия в клетках высшего растения *Cucurbita pepo* L. с работой электрогенного насоса // Физиология растений. 2002. Т.49, №1. С.160-165.
8. Пятыгин С.С., Воденеев В.А., Опритов В.А. Сопряжение генерации потенциала действия в клетках растений с метаболизмом: современное понимание проблемы // Успехи современной биологии. 2005. Т. 125, № 5. С. 534-542.
9. Сухов В. С., Воденеев В. А., Орлова О.В. Влияние распространяющихся биоэлектрических реакций на световую стадию фотосинтеза и содержание АТФ в

семядольных листьях *Cucurbita pepo* L. // Вестник ННГУ. Серия Биология. 2005. Вып. 10. С. 218-224.

10. Сухов В.С., Воденеев В.А. Математическая модель потенциала действия у высших растений // Математика. Компьютер. Образование: Сб. научн. трудов. Под ред. Г.Ю. Ризниченко. 2005. Т.3. С. 967-978.

11. Воденеев В.А., Опритов В.А., Пятыгин С.С. Обратимое изменение внеклеточного pH при генерации потенциала действия у высшего растения *Cucurbita pepo* // Физиология растений. 2006. Т.53, № 4. С.538-545.

12. Пятыгин С.С., Воденеев В.А., Опритов В.А. Деполяризация плазматической мембраны как универсальная первичная биоэлектрическая реакция растительных клеток на действие различных факторов // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126, №5. С. 493-502.

13. Воденеев В.А., Мысягин С.А., Пятыгин С.С., Опритов В.А., Неруш В.Н. Сравнительный анализ механизмов генерации электрических реакций при холодовом и механическом раздражении высших растений // Вестник ННГУ. Серия Биология. 2006. Вып. 11. С. 118-127.

14. Опритов В.А., Воденеев В.А., Пятыгин С.С., Мысягин С.А. Потенциалы действия у животных и растений: сравнительный аспект // Доклады ТСХА. 2007. Вып. 279. С. 189-193.

15. Воденеев В.А., Мамонов Р.В., Пятыгин С.С., Опритов В.А. Распространение переменного потенциала, индуцированного ожогом семядольного листа проростка тыквы // Вестник ННГУ. 2007. №2. С. 122-126.

16. Vodeneev V.A., Pyatygin S.S., Opritov V.A. Reversible change of extracellular pH at the generation of mechano-induced electrical reaction in a stem of *Cucurbita pepo* // Plant Sign. Behavior. 2007. V.2. P. 267-268.

17. Воденеев В.А., Пятыгин С.С. Метаболическая зависимость генерации потенциала действия в возбудимых клетках стебля тыквы при охлаждении // Цитология. 2007. Т.49, №11. С. 973-976.

18. Пятыгин С.С., Опритов В.А., Воденеев В.А. Сигнальная роль потенциала действия у высших растений // Физиология растений. 2008. Т. 55, №2. С. 312-319.

Материалы конференций и тезисы докладов

19. Пятыгин С.С., Опритов В.А., Половинкин А.В., Воденеев В.А. Метаболическая компонента потенциала действия у высших растений // II-ой съезд биофизиков России: Тез. докл. М., 1999. Т.2. С.551-552.

20. Пятыгин С.С., Опритов В.А., Крауз В.О., Абрамова Н.Н., Воденеев В.А. Адаптивные изменения биоэлектrogenеза при химическом стресс-воздействии на клетки высшего растения // IV-ый съезд Общ-ва физиол. растений России: Тез. докл. М., 1999. Т.1. С.450.

21. Воденеев В.А., Опритов В.А., Пятыгин С.С., Абрамова Н.Н. Влияние AgNO₃ на биоэлектrogenез клеток высшего растения в покое и при возбуждении // Ксенобиотики и живые системы: Тез. докл. межд. конф. Минск, 2000. С.15-16.

22. Воденеев В.А., Мокрова А.Н. Обоснование возможности участия H⁺-АТФазы плазматических мембран в формировании фазы деполяризации потенциала действия в клетках высшего растения // VI нижегород. сессия мол. ученых: Тез. докл. Н.Новгород, 2001. С.152.

23. Опритов В.А., Пятыгин С.С., Ретивин В.Г., Воденеев В.А., Мысягин С.А. Избирательная генерация потенциалов действия клетками высшего растения в ответ на различные стресс-факторы // Регуляция роста и развития: Мат. 2-й науч. конф. Минск, 2001. С. 154.

24. Opritov V.A., Pyatygin S.S., Vodeneev V.A. Electrical component of general adaptation syndrome of higher plants // Plants under environmental stress: Abstr. Int. Symp. Moscow, 2001. P.215.
25. Воденеев В.А., Оприлов В.А., Орлова О.В. Участие H^+ -АТФазы плазматических мембран в формировании фазы деполяризации потенциала действия // Актуальные проблемы современной науки: Тез. докл. межд. конф. мол. ученых и студ. Самара: СамГУ, 2001. С.44.
26. Opritov V.A., Pyatygin S.S., Vodeneev V.A., Mysyagin S.A. The role of bioelectric potentials in reception of cooling in higher plants // Signaling Systems of Plants Cells: Abstr. In-tern. Symp. Pushino: ONTI, 2001. P.95-96.
27. Оприлов В.А., Пятыгин С.С., Лобов С.А., Воденеев В.А., Мысягин С.А., Шибарова А.Н. Электрофизиологическое звено в рецепции охлаждения клетками высшего растения // V-ый съезд Общ-ва физиологов растений России: Тез. докл. Пенза, 2003. С. 313.
28. Пятыгин С.С., Оприлов В.А., Воденеев В.А. Об участии электрогенного H^+ -насоса в формировании переднего фронта потенциала действия у высших растений // V-ый съезд Общ-ва физиологов растений России: Тез. докл. Пенза, 2003. С. 157.
29. Сухов В.С., Оприлов В.А., Воденеев В.А., Орлова О.В., Абрамова Н.Н., Пятыгин С.С. Влияние распространяющихся биоэлектрических реакций на замедленную флуоресценцию и поглощение ионов кальция в семядольных листьях и черенках проростков *Cucurbita pepo* L. // Рецепция и внутриклеточная сигнализация: Мат. межд. конф. Пушкино: ИБК РАН, 2003. С. 302-305.
30. Оприлов В.А., Пятыгин С.С., Мысягин С.А., Крауз В.О., Воденеев В.А. Роль биоэлектрогенеза в адаптации клеток высшего растения к низкотемпературным воздействиям // Физиология растений и экология на рубеже веков: Мат. всеросс. научн.-практ. конф. Ярославль: ЯрГУ, 2003. С. 114.
31. Сухов В.С., Оприлов В.А., Орлова О.В., Абрамова Н.Н., Воденеев В.А., Пятыгин С.С. Влияние потенциалов действия на замедленную флуоресценцию и содержание АТФ в листьях проростков тыквы // Регуляция роста, развит. и продукт. растений: Мат 3-й Межд. науч. конф. Минск, 2003. С. 237-238.
32. Мысягин С.А., Лобов С.А., Воденеев В.А., Оприлов В.А., Пятыгин С.С. Особенности биоэлектрической реакции клеток стебля высшего растения *Cucurbita pepo* L. при механической стимуляции // III Съезд биофиз. России: Тез. докл. Т.2. Воронеж: ВГУ, 2004. С. 264-265.
33. Сухов В.С., Воденеев В.А., Орлова О.В., Абрамова Н.Н., Оприлов В.А., Пятыгин С.С. Влияние распространяющихся биоэлектрических реакций на содержание АТФ в семядольных листьях проростков тыквы // III Съезд биофиз. России: Тез. докл. Т. 2. Воронеж: ВГУ, 2004. С.464-465.
34. Шибарова А.Н., Орлова О.В., Воденеев В.А., Оприлов В.А., Пятыгин С.С. Влияние ионов Ca^{2+} на гидролитическую активность H^+ -АТФазы плазматических мембран клеток высшего растения (*Cucurbita pepo* L.) при воздействии малых доз ионизирующего излучения // III Съезд биофиз. России: Тез. докл. Т. 2. Воронеж: ВГУ, 2004. С.737-738.
35. Мысягин С.А., Воденеев В.А., Лобов С.А., Сухов В.С., Ретивин В.Г., Пятыгин С.С., Оприлов В.А. Холодоиндуцированные потенциалы действия и их функциональная роль у высших растений // Проблемы физиол. растений Севера: Тез. докл. межд. науч. конф. Петрозаводск, 2004. С. 132.

36. Оприлов В.А., Лобов С.А., Мысягин С.А., Воденеев В.А., Пятыхин С.С. Электрическое звено в ответных реакциях растений на действие внешних факторов // Акт. вопросы ботаники и физиол. раст.: Мат. межд науч. конф. Саранск: МордГУ, 2004. С. 176-177.
37. Sukhov V.S., Vodeneev V.A., Pyatygin S.S., Kurina L.E. Mathematical model of action potential in higher plant cells // The 6th International Congress on Mathematical Modeling. Book of abstracts. Nizhny Novgorod: University of Nizhny Novgorod, 2004 P. 512.
38. Оприлов В.А., Лобов С.А., Мысягин С.А., Пятыхин С.С., Воденеев В.А. Роль биоэлектрических реакций в осуществлении рецепторно-акцепторной связи у высших растений при охлаждении (на примере *Cucurbita pepo* L.) // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: Мат. VI Межд. симп. М.: Изд-во РУДН, 2005. Т. 2. С. 147-149.
39. Сухов В.С., Воденеев В.А. Модель потенциала действия у высших растений // Математика. Компьютер. Образование: Тез. докл. XII Межд. Конф. Пущино, 2005. С. 223.
40. Воденеев В.А., Оприлов В.А., Мысягин С.А., Пятыхин С.С. Электрические ответы клеток высших растений на внешние воздействия различной природы // Рецепция и внутриклеточн. сигнализация: Мат. межд. конф. Пущино: ИБК РАН, 2005. С. 345-348.
41. Сухов В.С., Пятыхин С.С., Воденеев В.А. Математическая модель кривых затухания замедленной флуоресценции у растений // Нелинейный мир: Тез. докл. X междисциплинарн. научн. конф. Н. Новгород: ННГУ, 2005. С. 132.
42. Оприлов В.А., Воденеев В.А., Мысягин С.А., Пятыхин С.С. Взаимодействие сигнальных систем клеток высших растений при возбуждении // Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунитете: Тез. докл. Казань: «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. 2006. С. 101-102.
43. Воденеев В., Акинчиц Е., Балалаева И., Мамонов Р., Орлова А. Конфокальная и оптическая когерентная микроскопия для изучения потенциалов возбуждения у растений // V Съезд Российского фотобиологического общества: Тез. докл. Пущино. 2008. С. 231.
44. Sukhov V., Vodeneev V., Opritov V. Elaboration and analysis of mathematical model of photosystem II in the higher plants // Light Energy Conversion in Photosynthesis. Progr. Abstr. Pushino. 2008. P. 64.
45. Воденеев В.А., Оприлов В.А., Сухов В.С., Мысягин С.А., Орлова О.В. Генерация потенциалов действия у высших растений при стрессе // Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений: Тез. докл. Межд. научн. конф. Екатеринбург: Изд-во Ур. Ун-та. 2008. С. 113-114.

Учебное пособие

46. Воденеев В.А., Оприлов В.А., Мысягин С.А., Пятыхин С.С. Дистанционные электрические сигналы у растений. Учебно-методические материалы по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах». Н. Новгород: ННГУ. 2007. 97 с. (электронный вариант).