

УДК 577.37

**ДИНАМИКА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ ХЛОРА
ПРИ ГЕНЕРАЦИИ ХОЛОДОИНДУЦИРОВАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ
У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**© 2009 г. В.А. Воденев, В.С. Сухов, В.А. Опритов, Ю.В. Царева, Е.В. Яковлева,
В.Н. Неруш, Е.К. Акинчиц

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

kbf@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 19.01.2009

Зарегистрировано обратимое повышение внеклеточной концентрации Cl^- , сопровождающее генерацию потенциала действия (ПД). Максимум выхода соответствует окончанию фазы деполяризации ПД. Показано, что величина равновесного потенциала для Cl^- в максимуме выхода ионов хлора понижается до значений, близких к величине мембранного потенциала в пике ПД.

Ключевые слова: высшие растения, потенциалы действия, динамика концентрации Cl^- .

Введение

Потенциалы действия (ПД) являются у высших растений важными стрессовыми сигналами, обеспечивающими их адаптацию к действию неблагоприятных факторов [1, 2]. При этом влияние ПД на устойчивость, по-видимому, тесно связано с ионными механизмами, лежащими в основе их генерации, что делает исследование таких механизмов весьма актуальной задачей.

Согласно существующим представлениям, фаза деполяризации ПД у высших растений формируется выходящим потоком ионов хлора и входящим потоком протонов, возникновение которых обусловлено поступлением в клетку ионов кальция, вызывающего активацию потенциал-зависимых Ca^{2+} -активируемых Cl^- -каналов и инактивацию H^+ -АТФазы [3–5]. Фаза реполяризации ПД формируется выходящими потоками ионов калия и активным потоком протонов, связанного с активацией H^+ -АТФазы [3–5].

В то же время следует отметить, что число работ, в которых исследовались ионные механизмы генерации ПД у высших растений, остается достаточно ограниченным [3, 6, 7], а использованные в них методы (ингибиторный анализ [3] или определение концентрации потенциалобразующих ионов после генерации ПД [3, 6]) не позволяют изучить динамику изменений концентраций ионов. В частности, неисследованной остается динамика изменений концентрации Cl^- при генерации ПД.

На основании изложенного, в настоящей работе предпринята попытка исследования динамики содержания внеклеточного Cl^- в ходе генерации

холодоиндуцированного ПД и расчета максимальной величины этих изменений для апопласта и внутреннего объема возбудимых клеток.

Экспериментальная часть

Исследования проводили на двухнедельных проростках тыквы *Cucurbita pepo* L. (сорт Мозолеевская). Проростки выращивали в климатической камере (KBW-240, Binder) при освещении люминесцентными лампами (6900 люкс, 16-часовой световой период) и температуре +27°C. В качестве субстрата использовали керамзит, питательным раствором служила 50% среда Хогланда – Арнона.

Проросток располагали в термостатируемой экранированной камере, закрепляя участок стебля в кювете (рис. 1). С участка стебля, закрепленного в кювете, удаляли эпидермис. К эксперименту приступали не ранее чем через 1.5 часа после удаления эпидермиса. Раствор в кювете содержал 1 мМ KCl, 0.1 мМ NaCl, 0.5 мМ $CaCl_2$. Корни проростка погружали в чашку Петри с раствором того же состава.

Генерацию ПД вызывали постепенным охлаждением со скоростью около 1.5°C/мин в диапазоне от +26 – +28°C до +15 – +16°C. Охлаждение осуществляли путем протока воды заданной температуры через внешнюю кювету. Контроль за изменением температуры раствора в экспериментальной кювете осуществляли миниатюрным термистором (рис. 1). Интервал между воздействиями составлял 60 мин, что превышает рефрактерный период для генерации ПД в стебле объекта [8].

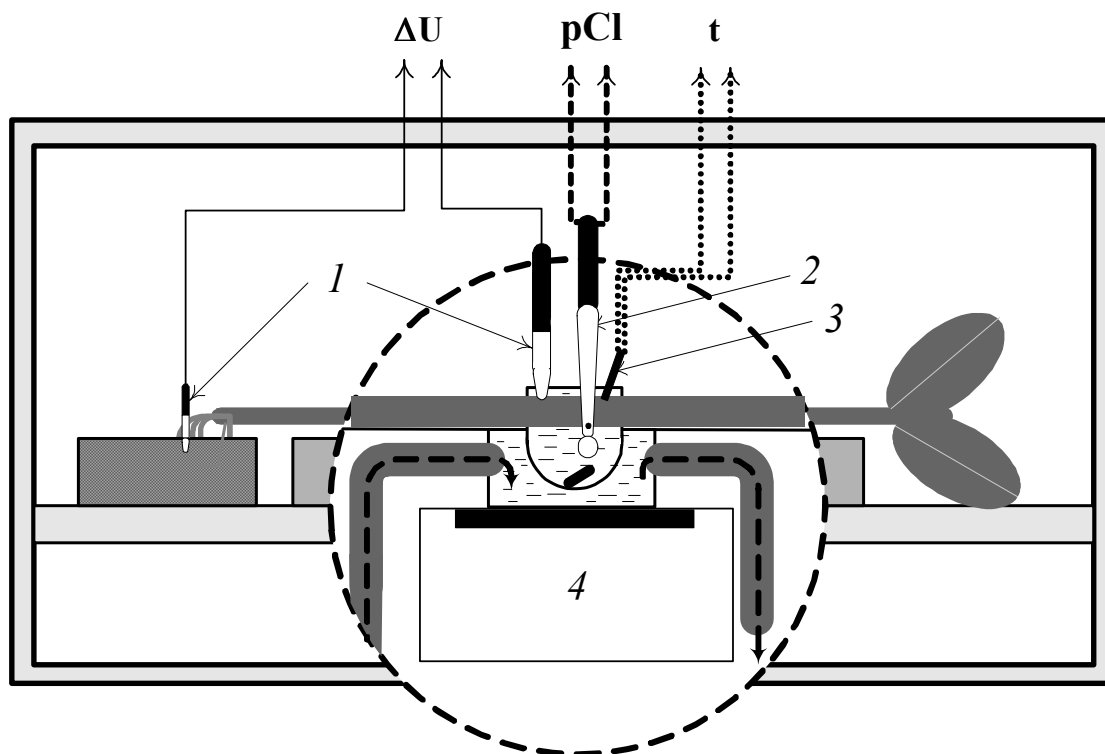


Рис. 1. Схема регистрации электрической активности и внеклеточного рСl при генерации ПД, индуцированных постепенным охлаждением: 1 – хлорсеребряные макроэлектроды, 2 – рСl-чувствительный электрод, 3 – термистор, 4 – магнитная мешалка

Изменения рСl раствора, омывающего участок стебля в кювете, регистрировали с помощью рСl-чувствительного электрода ЭЛИС-131 Сl, соединенного с иономером универсальным «Мультитест». Раствор в экспериментальной кювете перемешивали магнитной мешалкой в течение всего времени проведения эксперимента (рис. 1).

Регистрацию изменений рСl раствора проводили с одновременной внеклеточной регистрацией электрической активности. Для внеклеточной регистрации электрической активности использовали Ag/AgCl-макроэлектроды ЭВЛ-1М3. Усилителем также служил иономер универсальный «Мультитест». Измерительный электрод контактировал с участком стебля через раствор в ячейке, электрод сравнения – с раствором, омывающим корни (рис. 1). Измеряемая внеклеточно разность потенциалов (ΔU) представляет интегральные изменения мембранного потенциала клеток в зоне раздражения [9].

Отношение между объемом апопласта и объемом возбудимых клеток, необходимое для оценки изменений концентрации ионов хлора в клетках и в межклеточном пространстве, определяли на основе гистологических препаратов гипокотыля.

Биологическая повторность составляла 9 опытов, результаты обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение

На рис. 2 показаны изменения содержания СГ во внеклеточном растворе, сопровождающие генерацию индуцированного постепенным охлаждением ПД. Такие изменения имели двухфазный характер – быстрое увеличение концентрации СГ (уменьшение рСl) сменялось снижением (возрастанием рСl) – и приблизительно

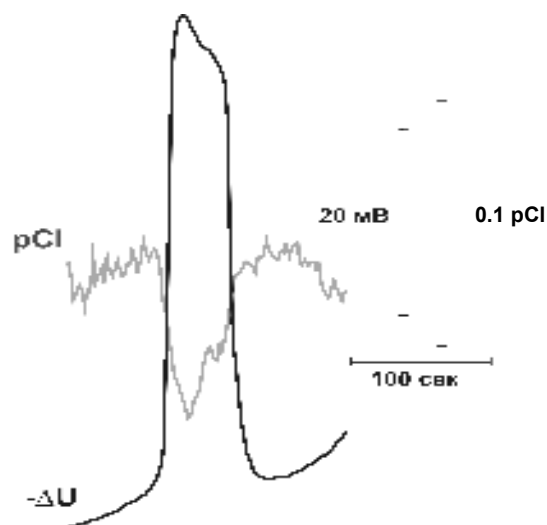


Рис. 2. Типичная запись изменения концентрации ионов хлора в омывающем растворе при генерации индуцированного постепенным охлаждением ПД

соответствовали динамике мембранного потенциала – содержание Cl^- повышалось до тех пор, пока ПД не достигает максимума, после чего (на фазе реполяризации) концентрация ионов хлора в среде падала.

Обнаруженная динамика отражает, по-видимому, выход ионов хлора из клетки в апопласт, а затем – в измерительную ячейку при развитии фазы деполяризации ПД и обратный их вход в клетку на фазе реполяризации, подтверждая тем самым существующие представления об участии выходящего тока Cl^- в формировании первой фазы потенциала действия у высших растений [3, 5].

Отдельно следует отметить тот факт, что снижение концентрации Cl^- в среде происходило очень быстро и в некоторых случаях начинало развиваться еще до завершения фазы деполяризации. Из литературы [10, 11] известно, что основной системой, обеспечивающей вход Cl^- в клетку, является $2\text{H}^+/\text{Cl}^-$ -симпортер, локализованный на плазматической мембране. Можно полагать, что быстрое снижение концентрации Cl^- во внеклеточной среде связано с активацией данной транспортной системы.

При изучении механизма генерации фазы деполяризации ПД открытым остается вопрос – чем определяется величина потенциала в пике ПД, т.е. за счет чего происходит прекращение выхода Cl^- ? Известно, что в нервных клетках значение потенциала в пике ПД приближается к значению равновесного потенциала для иона (Na^+), формирующего фазу деполяризации нервного импульса [12]. Можно предположить, что значение мембранного потенциала в пике ПД у высших растений приближается к значению равновесного потенциала для ионов Cl^- . Проверка этой гипотезы требует сравнения значения равновесного потенциала для ионов хлора со значением потенциала в пике ПД. Для определения величины равновесного потенциала Cl^- необходимо оценить максимальные изменения концентрации ионов хлора в апопласте и возбудимых клетках.

При расчете максимальных изменений концентрации Cl^- в апопласте было принято, что выходящие в него из возбудимых клеток ионы хлора затем равномерно распределяются по всей измерительной ячейке (т.е. предполагалось «мгновенное» разведение выходящего из клеток Cl^- во всем доступном объеме).

Для перехода от изменений содержания Cl^- в измерительной ячейке ($\Delta[\text{Cl}^-]_{\text{яч}}$) к изменениям концентрации ионов хлора в апопласте ($\Delta[\text{Cl}^-]_{\text{ап}}$) была использована формула:

$$\Delta[\text{Cl}^-]_{\text{ап}} = \Delta[\text{Cl}^-]_{\text{яч}} \frac{V_{\text{яч}} + \pi l(r^2 - (r-h)^2)n_{\text{ап}}}{\pi l(r^2 - (r-h)^2)n_{\text{ап}}}, \quad (1)$$

где $V_{\text{яч}}$ – объем стандартного раствора в заполненной измерительной ячейке, l – длина участка гипокотыля в ячейке, r – радиус гипокотыля, h – толщина стенки гипокотыля, $n_{\text{ап}}$ – доля апопласта в общем объеме гипокотыля.

Переход к изменениям внутри клеток ($\Delta[\text{Cl}^-]_{\text{ин}}$) осуществляли с помощью формулы:

$$\Delta[\text{Cl}^-]_{\text{ин}} = \Delta[\text{Cl}^-]_{\text{ап}} \frac{n_{\text{ап}}}{n_{\text{ин}}}, \quad (2)$$

где $n_{\text{ин}}$ – доля внутреннего объема клеток в общем объеме гипокотыля.

Параметры $V_{\text{яч}}$, l и r определяли при заполнении измерительной ячейки – 5.4 мл, 2.15 см и 0.6 см, соответственно. Параметры h , $n_{\text{ап}}$ и $n_{\text{ин}}$, оцененные по гистологическим препаратам поперечного среза гипокотыля, составляли 0.08 см, 0.2 и 0.8, соответственно.

Для перехода к абсолютным значениям концентрации в максимуме ПД использовали формулы

$$[\text{Cl}^-]_{\text{ап}} = [\text{Cl}^-]_{\text{яч}}^0 + \Delta[\text{Cl}^-]_{\text{яч}}, \quad (3)$$

$$[\text{Cl}^-]_{\text{ин}} = [\text{Cl}^-]_{\text{ин}}^0 + \Delta[\text{Cl}^-]_{\text{ин}}, \quad (4)$$

где $[\text{Cl}^-]_{\text{ап}}$ и $[\text{Cl}^-]_{\text{ин}}$ – концентрация ионов хлора в апопласте и возбудимых клетках, соответственно, в максимуме изменений, $[\text{Cl}^-]_{\text{ап}}^0$ и $[\text{Cl}^-]_{\text{ин}}^0$ – начальная концентрация ионов хлора в апопласте и возбудимых клетках, соответственно. При этом $[\text{Cl}^-]_{\text{ап}}^0$ рассчитывали на основании формулы (1), подставив вместо $\Delta[\text{Cl}^-]_{\text{яч}}$ значение концентрации ионов хлора в измерительной ячейке на момент начала охлаждения. $[\text{Cl}^-]_{\text{ин}}^0$ принимали равной 20.7 мМ, на основании данных работы [3].

Равновесный потенциал рассчитывали на основе уравнения Нернста [3].

Как видно из результатов анализа в области максимальных изменений концентрации, содержание хлора в ячейке возрастает на 0.30 ± 0.05 мМ, что соответствует его снижению в возбудимых клетках на 7.6 ± 1.2 мМ (до 13.1 ± 1.2 мМ) и увеличению в апопласте на 30.5 ± 5.0 мМ (до 36.9 ± 5.4 мМ) (табл.). Такие значительные изменения концентраций могут существенно влиять на величину равновесного потенциала для ионов хлора, и, действительно, его значение в максимуме изменений Cl^- равняется -26 мВ (табл.). Более того, так как выход ионов из гипокотыля во внешнюю среду требует некоторого времени (предположение о «мгновенном» разведении является существенным упрощением), то реальные изменения концентрации Cl^- должны быть, по-видимому, выше

Таблица

Концентрации и равновесный потенциал ионов хлора в покое и при возбуждении

	$[Cl^-]_{ап}$ (мМ)	$[Cl^-]_{ин}$ (мМ)	E^{Cl} (мВ)
В состоянии покоя	6.4±1.9	20.7*	30
В максимуме изменений концентрации Cl^-	30.5±5.0	13.1±1.2	-26

* Значение взято на основе [3].

рассчитанных, а значит, величина E^{Cl} будет еще ближе к значениям мембранного потенциала в пике ПД (-40 мВ [13]).

Таким образом, выполненные расчеты показывают, что сдвиг E^{Cl} в отрицательную область, может являться одним из механизмов замедления выходящего потока ионов хлора в пике ПД и прекращения дальнейшего развития фазы деполяризации.

Заключение

Полученные результаты показывают, что развитие холодоиндуцированных ПД у проростков тыквы сопровождается обратимыми изменениями концентрации ионов хлора во внеклеточном пространстве (увеличение, затем снижение), которые, по-видимому, отражают выход Cl^- на фазе деполяризации ПД и последующий его вход на фазе реполяризации. При этом величина равновесного потенциала для ионов хлора в условиях максимального повышения концентрации Cl^- в апопласте приближается к величине мембранного потенциала на пике ПД, что, по-видимому, обуславливает уменьшение выходящего потока ионов хлора (рис. 3).

В целом, на основании полученных результатов можно предположить, что ведущая роль в формировании фазы деполяризации ПД, имеющей у высших растений комплексную природу (потоки Ca^{2+} , H^+ и Cl^-), принадлежит ионам хлора.

Список литературы

1. Опритов В.А. Функциональные аспекты биоэлектрогенеза у высших растений // 59-е Тимирязевские чтения. Н. Новгород: Издательство ННГУ, 1998. 46 с.

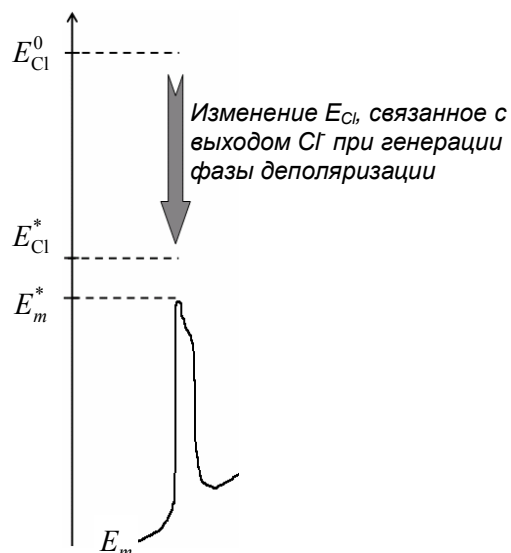


Рис. 3. Схематические изменения равновесного потенциала для ионов хлора и мембранного потенциала при развитии ПД. E_{Cl}^0 – равновесный потенциал для ионов хлора в покое, E_{Cl}^* – равновесный потенциал для ионов хлора в пике ПД, E_m^* – мембранный потенциал в пике ПД

2. Ретивин В.Г., Опритов В.А., Лобов С.А. и др. // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 790–798.
3. Опритов В.А., Пятыхин С.С., Ретивин В.Г. Биоэлектрогенез у высших растений. М.: Наука, 1991. 213 с.
4. Опритов В.А., Пятыхин С.С., Воденев В.А. // Физиология растений. 2002. Т.49. С. 160–165.
5. Trebacz K., Dziubinska H., Krol E. Electrical signals in long-distance communication in plants // Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life / Eds. F. Baluska, S. Mancuso, D. Volkmann. Berlin–Heidelberg: Springer, 2006.
6. Fromm J., Spanswick R. // J. Exp. Bot. 1993. V. 44. P. 1119–1125.
7. Воденев В.А., Опритов В.А., Пятыхин С.С. // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 538–545.
8. Ретивин В.Г., Пятыхин С.С., Опритов В.А. // Физиология растений. 1988. Т. 35. С. 486–494.
9. Зацепина Г.Н., Цаплев Ю.Б. // Биофизика. 1980. Т. 25. С. 144–147.
10. Gradmann D., Hoffstadt J. // J. Membrane Biol. 1998. V. 166. P. 51–59.
11. Gradmann D. // J. Plant. Physiol. 2001. V. 28. P. 577–590.
12. Рубин А.Б. Биофизика. М.: Высшая школа, 1987. Т. 2. 313 с.
13. Пятыхин С.С., Опритов В.А., Половинкин А.В., Воденев В.А. // Доклады Академии наук. 1999. Т. 366. С. 404–407.

**THE CHANGES OF EXTRACELLULAR Cl^- CONCENTRATION
DURING GENERATION OF COOLING-INDUCED ACTION POTENTIAL IN HIGHER PLANTS**

*V.A. Vodeneev, V.S. Sukhov, **V.A. Opritov**, Yu.V. Tsareva, E.V. Yakovleva, V.N. Nerush, E.K. Akinchits*

The changes of extracellular Cl^- concentration during generation of action potential (AP) induced by gradual cooling have been investigated by the potentiometric method. The AP generation has been shown to be accompanied by a reverse increase of Cl^- concentration whose maximum corresponds to the end of AP depolarization phase. Maximum changes of Cl^- concentration in apoplast and inside excitable cells developing during AP generation have been calculated on the basis of the results obtained. It has been shown that the Cl^- equilibrium potential (at the maximum of Cl^- output) decreases approximately to the value of a membrane potential at the AP peak.

Keywords: higher plants, action potential, Cl^- concentration dynamics.