

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ГЕНЕРАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ В ВОЗБУДИМЫХ КЛЕТКАХ СТЕБЛЯ ТЫКВЫ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ

© В. А. Воденев, С. С. Пятыгин

Кафедра биофизики Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского;
электронный адрес: kbf@bio.unn.ru

С помощью NaN_3 , ДЦКД и ИУК показано наличие отчетливо выраженной метаболической зависимости генерации потенциала действия (ПД), индуцированного холодом, в возбудимых клетках стебля тыквы, которая может быть связана с участием АТФ-зависимого насоса плазмалеммы в процессе возбуждения. Уменьшение концентрации внеклеточного Ca^{2+} оказывало на генерацию ПД не менее сильное угнетающее влияние, чем ингибирование метаболизма. Предполагается, что кальциевый сигнал является важным сопрягающим звеном между генерацией ПД и метаболизмом возбудимой клетки.

Ключевые слова: кальций, метаболизм, плазмалемма, потенциал действия, протонный насос.

Принятые сокращения: ДЦКД — N, N'-дициклогексилкарбодимид, E_m — мембранный потенциал, ИУК — индолилуксусная кислота, ПД — потенциал действия.

Генерация потенциалов действия (ПД) в возбудимых клетках высших растений под влиянием различных биотических и абиотических факторов является хорошо известным и неоднократно описанным в литературе феноменом (Pickard, 1973; Опритов, 1977; Davies, 1987; Sibaoka, 1991; Volkov, Mwesigwa, 2000; Пятыгин, 2003). Как и нервный импульс животных, ПД у высших растений возникает по достижении критического (порогового) уровня деполяризации (Pyatygin et al., 1992; Trebacz, Sievers, 1998), сопровождается состоянием рефрактерности возбудимых тканей (Shiina, Tazawa, 1986; Ретивин и др., 1988) и распространяется на значительные расстояния в пределах организма (Fromm, Spanswick, 1993; Dziubinska et al., 2001). В то же время весьма существенным отличием от нервного импульса животных можно считать, по-видимому, тесную связь механизма генерации ПД у высших растений с метаболизмом (Пятыгин и др., 2005). В частности, если нервные волокна способны генерировать и проводить ПД даже в присутствии метаболических ингибиторов (Юст, 1975), то, судя по результатам опытов на ряде высших растений — *Dionaea muscipula* (Hodick, Sievers, 1988; Trebacz, Sievers, 1998) и *Salix viminalis* (Fromm, Spanswick, 1993), — генерация ПД в присутствии ингибиторов угнетается. Связь генерации «растительных» ПД с метаболизмом может осуществляться, по-видимому, различными путями (Пятыгин и др., 2005), механизмы которых пока недостаточно ясны.

В настоящей работе исследовано влияние ряда химических агентов, модулирующих метаболизм и сопряженные с метаболизмом транспортные процессы, на генерацию ПД в клетках паренхимы стебля проростков тыквы *Cucurbita pepo*, инициируемых понижением температуры.

Материалы и методика

Исследования проводили на клетках основной паренхимы стеблей 2-недельных проростков тыквы *Cucurbita pepo* L. (сорт Мозолеевская). Проростки выращивали на гидропонной основе с использованием 50%-ной среды Хоглэнда—Арнона при освещении люминесцентными лампами (8000 лк, 16-часовой световой период) и температуре 21—23 °С.

Клетки основной паренхимы стебля перед опытом обнажали с помощью небольшого продольного среза. Участок стебля со срезом укрепляли в плексигласовой чювете, расположенной на поверхности термоохлаждающего столика ТОС-2. Состав водного раствора в чювете: 1 мМ KCl, 0.5 мМ CaCl_2 и 0.1 мМ NaCl. Генерацию ПД в клетках основной паренхимы стебля вызывали постепенным охлаждением со скоростью 1.3—1.5 °С/мин. Возникновение ПД в клетках объекта происходило при понижении температуры на несколько градусов от исходной (21—23 °С). Регистрацию изменения мембранного потенциала (E_m) в зоне охлаждения осуществляли по стандартной методике микроэлектродами из стекла «пирекс» с диаметром кончиков не более 1 мкм, заполненными 3 М KCl. Микроэлектроды вводили в клетки с помощью механического микроманипулятора комплекта КМ-2 при 225-кратном увеличении микроскопа. Температуру среды вблизи среза на стебле с введенным микроэлектродом контролировали миниатюрным термистром. Измеренная величина E_m клеток основной паренхимы стеблей проростков тыквы при 21—23 °С в исходном растворе варьировала в пределах от –120 до –160 мВ ($n = 20$). После генерации ПД на первое охлаждение (контроль) E_m клеток восстанавливали до исходного стационарного уровня путем повышения температуры. Повторное ох-

лаждение клеток (опыт) осуществляли спустя 30 мин инкубации в присутствии определенного химического агента. При этом учитывали, что рефрактерный период возбудимых тканей объекта после генерации ПД в ответ на охлаждение составляет менее 30 мин (Ретивин и др., 1988).

В опытах использовали следующие химические агенты: ингибитор клеточного метаболизма азид натрия (NaN_3), лимитирующий внутриклеточный пул АТФ (Reid et al., 1985); ингибитор H^+ -АТФазы плазматической мембраны N, N'-дициклогексилкарбодимид (ДЦКД) (Tu et al., 1992); фитогормон индолилуксусную кислоту (ИУК), стимулирующий активность H^+ -АТФазы (Hager, 2003); хелатор ЭГТА, который добавляли в омывающую клетки среду для снижения концентрации ионов кальция. Концентрации Ca^{2+} и ЭГТА в среде рассчитывали с помощью программы CHELATOR (Schoenmakers et al., 1992).

Реактивы: ДЦКД (Serva, Германия); ИУК, ЭГТА и NaN_3 (Sigma, США); остальные — отечественного производства квалификации «хч» и «чда».

Биологическая повторность опытов — 4–5. В результате представлены типичные записи изменения E_m клеток в ответ на охлаждение.

Результаты и обсуждение

Ингибитор клеточного метаболизма NaN_3 оказывал значительное угнетающее влияние на генерацию индуцированного охлаждением ПД в клетках объекта. Как видно на рис. 1, под влиянием NaN_3 амплитуда импульса существенно уменьшилась. Угнетение ПД было тем сильнее, чем выше использованная концентрация агента (соответственно 1 и 2 мМ). Эти данные весьма определенно свидетельствуют о наличии тесной связи процесса генерации ПД в клетках стебля объекта с величиной внутриклеточного пула АТФ, к редукции которого приводит влияние азиды (Reid et al., 1985). Если принять это во внимание, то ингибирующий эффект азиды на генерацию ПД, судя по

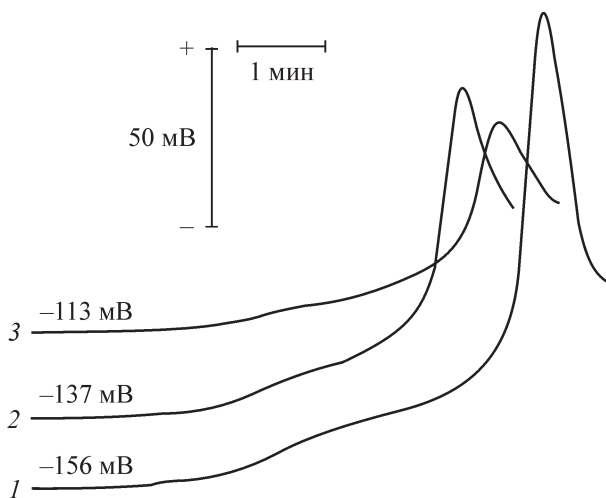


Рис. 1. Влияние NaN_3 на генерацию потенциала действия (ПД), индуцированного охлаждением, в клетке основной паренхимы стебля тыквы.

1 — контроль (без NaN_3), 2 — 1 мМ NaN_3 , 3 — 2 мМ NaN_3 . Время инкубации в присутствии NaN_3 в каждом варианте опытов составляло 30 мин, начало охлаждения совпадает с началом кривых изменения ПД.

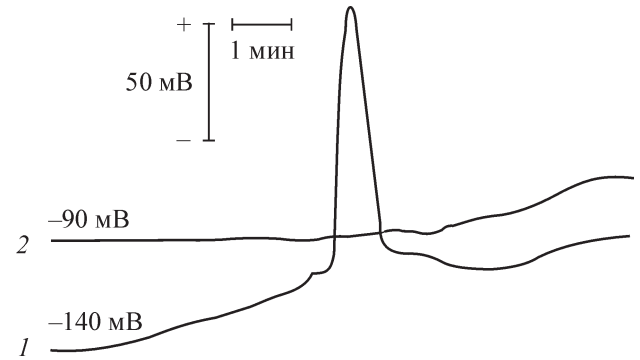


Рис. 2. Влияние уменьшения концентрации Ca^{2+} во внеклеточной среде с помощью ЭГТА на генерацию индуцированного охлаждением ПД в клетке основной паренхимы стебля тыквы.

1 — контроль ($5 \cdot 10^{-4}$ М Ca^{2+}), 2 — в присутствии ЭГТА (10^{-6} М Ca^{2+}). Условия эксперимента здесь и на рис. 3, 4 те же, что и на рис. 1.

характеру наблюдаемых на рис. 1 изменений, можно объяснить по меньшей мере двумя основными причинами.

С одной стороны, под влиянием NaN_3 имела место значительная деполяризация клеточной мембраны, связанная с угнетением метаболически-зависимой компоненты потенциала покоя, формируемой АТФ-зависимым H^+ -насосом (H^+ -АТФазой) плазмалеммы (Пятыгин и др., 1989). Пороговый уровень генерации ПД при этом смещался в область менее отрицательных значений E_m , сокращая диапазон развития импульса (рис. 1).

С другой стороны, пик ПД в присутствии азиды смещался в область отрицательных значений E_m , что в свою очередь приводило к редукции возникающих в ответ на охлаждение клеток импульсов (рис. 1). При этом длительность импульсов с увеличением концентрации NaN_3 возрастала. Эти данные указывают на то, что влияние азиды на генерацию ПД проявлялось, скорее всего, не только через ограничение метаболически-зависимой компоненты E_m , но и в определенной мере через ослабление пассивных ионных потоков, формирующих ПД. Предполагаемое ослабление этих потоков могло быть вызвано нарушением метаболической регуляции соответствующих ионных каналов (Пятыгин и др., 2005).

Известно, что в осуществлении связи различных физиологических процессов с метаболизмом в клетках растений важную роль играет кальциевая сигнальная система (Marme, 1985; White, Broadley, 2003). Можно предполагать, что такая связь имеет место и при генерации ПД. При этом следует учитывать, что по одним данным, кальциевый сигнал предшествует возникновению фазы деполяризации ПД у растений, являясь триггером пассивного деполяризующего потока ионов хлора (Lunevsky et al., 1983), а по другим — возникает как следствие развития этой фазы импульса (Fisahn et al., 2004). Известно также, что в условиях охлаждения сигнальное увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме происходит в основном за счет входа извне через плазматическую мембрану (Пятыгин, 2004). Учитывая все эти обстоятельства, мы исследовали влияние снижения концентрации ионов кальция во внешней среде от 0.5 мМ (в исходном стандартном растворе) до 1 мкМ с помощью хелатора ЭГТА на индуцированную холодом генерацию ПД в клетках объекта.

Как видно на рис. 2, в присутствии ЭГТА происходила деполяризация плазмалеммы на несколько десятков милливольт, что может быть связано прежде всего с умень-

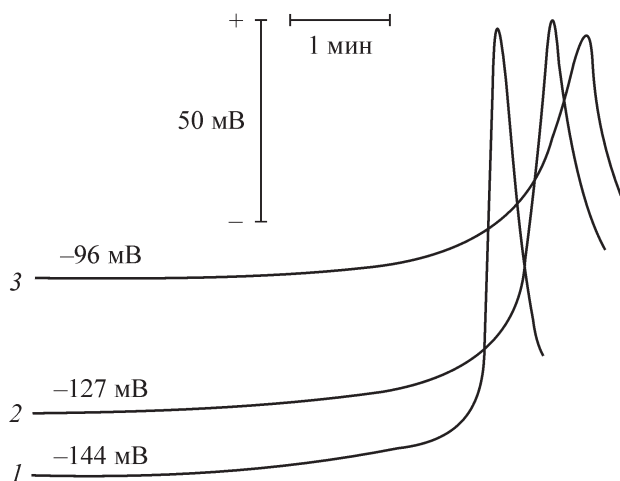


Рис. 3. Влияние ДЦКД на генерацию индуцированного охлаждения ПД в клетке основной паренхимы стебля тыквы.
1 — контроль (без ДЦКД), 2 — $5 \cdot 10^{-4}$ М ДЦКД, 3 — 10^{-3} М ДЦКД.

шением влияния ионов Ca^{2+} на формирование трансмембранного электрического градиента (Hodick, Sievers, 1988). В еще большей степени столь резкое снижение концентрации Ca^{2+} во внеклеточной среде отразилось на генерации ПД — она фактически прекратилась (рис. 2). Таким образом, устранение кальциевого сигнала оказывало на генерацию ПД не менее сильное влияние, чем ингибитор клеточного метаболизма азид. С учетом отмеченной выше неоднозначности представлений о роли кальциевого сигнала в инициации пассивной составляющей процесса генерации ПД у растений полученный результат позволяет предположить, что угнетение ПД в клетках объекта в этих условиях могло происходить вследствие нарушения кальцийцитируемого сопряжения этого процесса с работой транспортного механизма, использующего внутриклеточный пул АТФ.

Основным транспортным механизмом плазматической мембраны, преобразующим энергию АТФ в электрическую форму, является H^+ -АТФаза (Sze et al., 1999). В частности, известно, что величина метаболически-зависимой компоненты E_m пропорциональна уровню активности H^+ -АТФазы в качестве электрогенного протонного на-

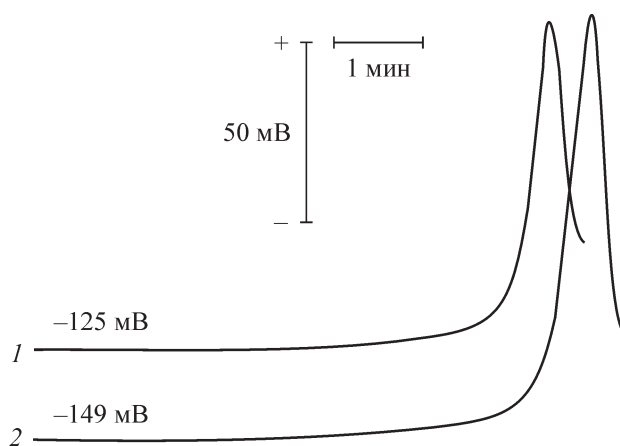


Рис. 4. Влияние ИУК на генерацию индуцированного охлаждения ПД в клетке основной паренхимы стебля тыквы.
1 — контроль (без ИУК), 2 — $5 \cdot 10^{-4}$ М ИУК.

соса этой мембраны (Morse, Spanswick, 1985). Известно также, что активность H^+ -АТФазы Ca^{2+} -зависима (De Nisi et al., 1999). Учитывая это, мы исследовали далее влияние на процесс генерации ПД ингибитора H^+ -АТФазы ДЦКД (Tu et al., 1992) и стимулятора ее активности ИУК (Hager, 2003).

Как видно на рис. 3 и 4, под влиянием ДЦКД и ИУК амплитуда вызванных охлаждением ПД, как и в опытах с азидом, отчетливо изменялась. При этом, поскольку ни ДЦКД, ни ИУК в отличие от азиды не влияли на значение E_m в пике ПД, можно считать, что наблюдаемые изменения амплитуды ПД в обоих случаях были полностью детерминированы соответствующими изменениями величины метаболически-зависимой компоненты E_m , формируемой АТФ-зависимым электрогенным H^+ -насосом. Направление изменений амплитуды ПД (уменьшение под влиянием ДЦКД и увеличение под влиянием ИУК) в опытах совпадало с характерным для каждого из использованных агентов влиянием на активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны, играющей роль насоса (соответственно угнетение под влиянием ДЦКД и стимуляция под влиянием ИУК). Полученные данные весьма определенно указывают на то, что связь генерации ПД с метаболизмом реализуется при непосредственном участии электрогенного H^+ -насоса (H^+ -АТФазы) плазматической мембраны.

В целом результаты опытов с использованием NaN_3 , ЭГТА, ДЦКД и ИУК позволяют говорить о наличии следующих звеньев сопряжения генерации ПД в клетках стебля *Cucurbita pepo* с метаболизмом: внутриклеточный пул АТФ—АТФ-зависимый электрогенный насос (H^+ -АТФаза) плазматической мембраны— Ca^{2+} сигнал—генерация ПД. Важное место, на наш взгляд, среди этих звеньев принадлежит протонному насосу, активность которого, с одной стороны, зависит от внутриклеточного пула АТФ (Sze et al., 1999), а с другой — регулируется кальциевым сигналом (De Nisi et al., 1999).

Полученные данные допускают реальную возможность непосредственного участия изменения активности АТФ-зависимого электрогенного протонного насоса плазматической мембраны в генерации ПД в клетках объекта. Механизм генерации ПД в этом случае должен включать, на наш взгляд, так называемую метаболическую компоненту, связанную, вероятно, с транзитным Ca^{2+} -регулируемым изменением активности насоса по типу «инактивация—активация» (Пятыгин и др., 1999; Воденев и др., 2006).

Список литературы

- Воденев В. А., Опритов В. А., Пятыгин С. С. 2006. Обратимое изменение внеклеточного рН при генерации потенциала действия у высшего растения *Cucurbita pepo*. Физиол. раст. 53 (4): 538—545.
- Иост Х. 1975. Физиология клетки. М.: Мир. 864 с.
- Опритов В. А. 1977. Распространяющееся возбуждение у высших растений. Успехи соврем. биол. 83 (3): 442—458.
- Пятыгин С. С. 2003. Электрогенез клеток растений в условиях стресса. Успехи соврем. биол. 123 (6): 552—562.
- Пятыгин С. С. 2004. Роль плазматической мембраны в восприятии холодового воздействия на клетки растений. Биол. мембраны. 21 (6): 442—449.
- Пятыгин С. С., Воденев В. А., Опритов В. А. 2005. Сопряжение генерации потенциала действия в клетках растений с метаболизмом: современное понимание проблемы. Успехи соврем. биол. 125 (5): 534—542.

- Пятыгин С. С., Опритов В. А., Половинкин А. В., Воденев В. А. 1999. О природе генерации потенциала действия у высших растений. Докл. РАН. 366: 404—407.
- Пятыгин С. С., Опритов В. А., Худяков В. А., Гнездилов А. В. 1989. Природа температурной зависимости потенциала покоя клеток холодочувствительного растения *Cucurbita*. Физиол. раст. 36 (1): 118—125.
- Ретивин В. Г., Пятыгин С. С., Опритов В. А. 1988. Рефрактерность проводящих тканей высшего растения. Физиол. раст. 35 (2): 486—494.
- Davies E. 1987. Action potentials as multifunctional signals in plants: a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ.* 10: 623—631.
- De Nisi P., Dell'Orto M., Pirovano L., Zocchi G. 1999. Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane H⁺-ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta*. 209: 187—194.
- Dziubinska H., Trebacz K., Zawadzki T. 2001. Transmission route for action potentials and variation potentials in *Helianthus annuus* L. *J. Plant Physiol.* 158: 1167—1172.
- Fisahn J., Herde O., Willmitzer L., Pena-Cortes H. 2004. Analysis of the transient increase in cytosolic Ca²⁺ during the action potential of higher plants with high temporal resolution: requirement of Ca²⁺ transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PIN II gene expression. *Plant Cell Physiol.* 45: 456—459.
- Fromm J., Spanswick R. 1993. Characteristics of action potentials in willow (*Salix viminalis* L.). *J. Exp. Bot.* 44: 1119—1125.
- Hager A. 2003. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J. Plant Res.* 116: 483—505.
- Hodick D., Sievers A. 1988. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta*. 174: 8—18.
- Lunevsky V. Z., Zherelova O. M., Vostrikov I. Y., Berestovskiy G. N. 1983. Excitation of *Characeae* cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J. Membr. Biol.* 72: 43—58.
- Marmé M. 1985. The role of calcium in the cellular regulation of plant metabolism. *Physiol. Veg.* 23: 945—953.
- Morse M. J., Spanswick R. M. 1985. ATP requirements for the electrogenic pump in perfused *Nitella* cells. *Biochim. biophys. acta.* 818: 386—390.
- Pickard B. G. 1973. Action potentials in higher plants. *Bot. Rev.* 39: 172—201.
- Pyatygin S. S., Opritov V. A., Khudyakov V. A. 1992. Subthreshold changes in excitable membranes of *Cucurbita pepo* L. stem cells during cooling-induced action-potential generation. *Planta*. 186: 161—165.
- Reid R. J., Dejaegere R., Pitman M. G. 1985. Regulation of electrogenic pumping in barley by pH and ATP. *J. Exp. Bot.* 36: 535—549.
- Schoenmakers T. J. M., Visser G. J., Flik G., Theuvsen A. P. R. 1992. CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Bio Techniques*. 12: 870—879.
- Shiina T., Tazawa M. 1986. Action potential in *Luffa cylindrica* and its effects on elongation growth. *Plant Cell Physiol.* 27: 1081—1089.
- Sibaoka T. 1991. Rapid plant movements triggered by action potentials. *Bot. Mag. (Tokyo)*. 104: 73—95.
- Sze H., Li X., Palmgren M. G. 1999. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *Plant Cell*. 11: 677—690.
- Trebacz K., Sievers A. 1998. Action potentials evoked by light in traps of *Dionaea muscipula* Ellis. *Plant Cell Physiol.* 39: 369—372.
- Tu S.-I., Loper M. T., Brauer D., Hsu A.-F. 1992. The nature of proton-translocating ATPases in maize roots. *J. Plant Nutr.* 15: 929—944.
- Vlovok A. G., Mwesigwa J. 2000. Interfacial electrical phenomena in green plants: action potentials. In: *Liquid interfaces in chemical, biological, and pharmaceutical applications*. New York; Basel: Marcel Dekker Inc. 649—681.
- White J. P., Broadley M. R. 2003. Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487—511.

Поступила 20 III 2007

METABOLIC DEPENDENCE OF COOLING-INDUCED ACTION POTENTIAL GENERATION IN EXCITABLE CELLS OF PUMPKIN STEM

V. A. Vodenev, S. S. Pyatygin

Department of Biophysics, N. I. Lobachevsky State University, Nizhny Novgorod;
e-mail: kbf@bio.unn.ru

The presence of strongly pronounced metabolic dependence of cooling-induced action potentials (APs) in excitable cells of pumpkin stem was shown using NaN₃, DCCD, and IAA. This dependence might be connected with participation of the plasma-membrane ATP-dependent pump in the excitation process. The decrease of extracellular Ca²⁺ concentration had as strong depressive effect on the AP as that of the inhibition of metabolism. It has been supposed that the calcium signal is important coupling factor between the AP generation and the metabolism of excitable cells.

Key words: calcium, metabolism, plasma membrane, action potential, proton pump.