

УДК 577.353:576.322

ЛАЗЕРНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕСТАЦИОНАРНОГО ТЕЧЕНИЯ ПРОТОПЛАЗМЫ В КЛЕТКАХ ВОДОРΟΣЛИ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ МЕМБРАНЫ

Е. Б. Черняева

(кафедра общей физики и волновых процессов)

Введение. Направленное движение протоплазмы присуще практически всем растительным клеткам [1]. В основе этого явления лежит, по-видимому, общее с мышечными видами подвижности механо-химическое преобразование энергии гидролиза АТФ, осуществляемое в результате взаимодействия сократительных белков актина и миозина. Однако конкретный механизм этого взаимодействия в настоящее время до конца не известен. Определенные сведения о нем можно получить,

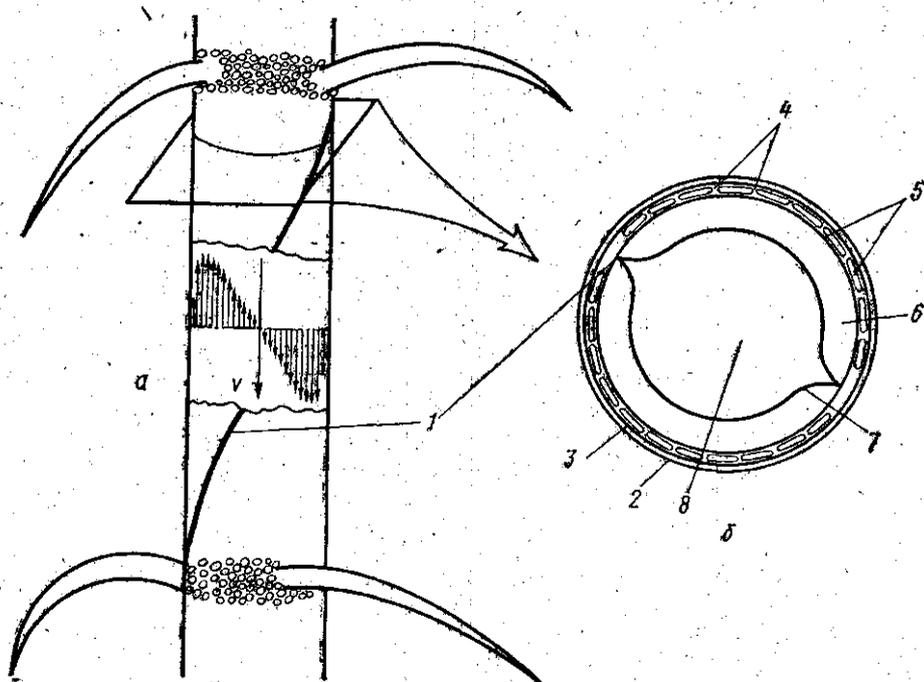


Рис. 1. Общий вид (а) и строение клетки междуузлия (б) водоросли *Nitella*: 1 — индифферентные зоны, 2 — клеточная стенка, 3 — плазмалемма, 4 — кортекс, 5 — хлоропласты, 6 — эндоплазма, 7 — тонопласт, 8 — вакуоль с клеточным соком

исследуя параметры переходных процессов при установлении потока протоплазмы после его вынужденной остановки.

В работе [2] приведены полученные нами данные об этапах восстановления скорости течения протоплазмы после временной остановки, вызванной возбуждением мембраны клетки коротким импульсом тока. Настоящая работа посвящена изучению кинетики переходного процесса установления потока при изменении параметров стимулирую-

шего импульса (СИ) и условий освещенности клетки. Регистрация скорости потока осуществлялась методом лазерной доплеровской спектроскопии в реальном масштабе времени.

Объект исследования. В качестве объекта были выбраны гигантские клетки междуузлий харовой водоросли *Nitella*. Клетки за несколько суток до эксперимента изолировались от таллома водоросли и непосредственно перед экспериментом помещались в держатели кюветы, заполненной средой культивирования. Использовались вторые-третьи от верхушки клетки длиной 2—3 см и диаметром 0,4—0,8 мм.

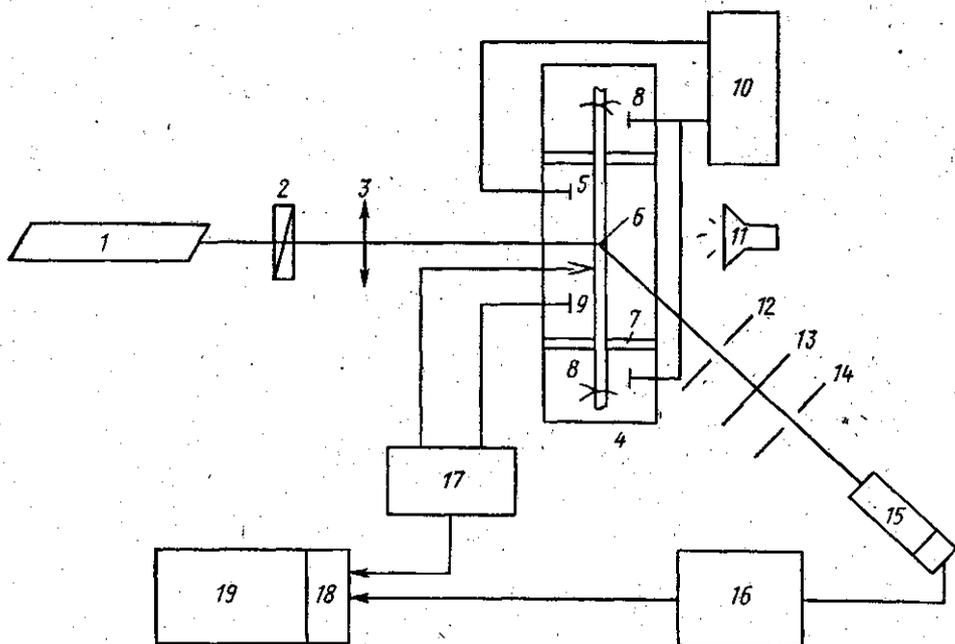


Рис. 2. Схема измерительно-вычислительного комплекса «Лазерный доплеровский спектрометр — ЭВМ ЕС-1010»: 1 — He-Ne-лазер, 2 — фильтр, 3, 13 — линзы, 4 — кювета, 5 — стимулирующие электроды, 6 — измерительный объем, 7 — держатели клетки, 8 — клетка, 9 — электроды, отводящие потенциал, 10 — стандартный источник питания, 11 — осветитель, 12, 14 — диафрагмы, 15 — ФЭУ, 16 — усилитель, одновременно осуществляющий аналоговую фильтрацию сигнала, 17 — рН-метр, используемый в качестве электрометрического усилителя, 18 — аналого-цифровой преобразователь, 19 — ЭВМ ЕС-1010 с графопроектором, графическим дисплеем, АЦПУ и перфоратором

Клетка считалась адаптированной к данным условиям освещенности через 40—50 мин. Освещенность в плоскости расположения клетки составляла 1700 лк.

Строение клетки приведено на рис. 1. Две мембраны клетки: тонопласт и плазмалемма — представляют собой как бы два concentрических цилиндра, «сшитых» по двум винтовым линиям, так называемым индифферентным зонам. При этом в клетке образуются три канала: центральный (вакуоль с клеточным соком), составляющий до 90% объема клетки, и два боковых, заполненных эндоплазмой. Направления потока в боковых каналах противоположны, и в целом в клетке существует замкнутый спиралевидный стационарный поток протоплазмы со скоростью 60—80 мкм/с.

Водоросли были привезены из озер Литовской ССР и культиви-

ровались в отстоянной водопроводной воде при комнатной температуре и естественном освещении.

Метод. Измерение скорости течения протоплазмы производилось на автоматизированном измерительно-вычислительном комплексе «Лазерный доплеровский спектрометр — ЭВМ ЕС-1010» [3]. Метод лазерной доплеровской спектроскопии основан на регистрации сдвига частоты лазерного излучения при рассеянии на движущейся частице. Выделение доплеровского сдвига частоты происходит при нелинейном смещении излучения, рассеянного движущимися с потоком протоплазмы внутриклеточными органеллами и включениями, с излучением, рассеянным неподвижными стенками клетки. Схема комплекса приведена на рис. 2. Алгоритм определения скорости течения по спектру выходного сигнала спектрометра описан в работе [2]. Основные характеристики комплекса: пределы измерения скорости — от 10 мкм/с до 1 см/с (точность $\sim 5\%$), длительность одного измерения $\tau = 1-3$ с.

В ряде экспериментов одновременно с измерением скорости течения протоплазмы регистрировалась разность потенциалов «вакуоль — внешняя среда» с помощью стандартной микроэлектродной техники [4]. Остановка течения вызывалась СИ длительности $\tau_0 = 0,3$ с, подаваемым от стандартного источника.

Результаты. Мембраны клеток харовых водорослей возбудимы, т. е. способны к генерации потенциала действия (ПД), при приложении деполяризующего мембрану импульса тока, величина которого превышает некоторое пороговое значение. Прохождение ПД сопровождается практически мгновенной остановкой течения [5, 6, 7]. Ранее нами было получено [2], что в ряде случаев процесс восстановления потока не заканчивается монотонным ростом скорости до начального значения v_0 . Скорость течения может достигать значения $v = (1,1 \div 1,4)v_0$ и выходить на исходный уровень после серии медленно затухающих осцилляций.

Нами проведено изучение зависимости характера кривой восстановления скорости течения для клеток, адаптированных к свету и темноте, от величины СИ при регистрации скорости как в одном, так и одновременно в двух сечениях клетки. Проведены также одновременные измерения скорости течения протоплазмы и потенциала «вакуоль — внешняя среда». Величина СИ изменялась от порогового значения $U = U_0$ до $U = (8 \div 10)U_0$. Интервал времени между последовательными СИ составлял 40—60 мин. Схема подачи СИ пояснена на рис. 2.

Полученные данные показывают, что возникновение колебаний скорости не является следствием патологического состояния клетки. Через 3—10 периодов (в зависимости от начальной амплитуды колебаний) осцилляции затухают, и клетка возвращается к нормальному физиологическому состоянию, о чем свидетельствует повторяемость результатов, получаемых для одной и той же клетки в течение нескольких дней.

При прочих постоянных условиях характер кривой восстановления скорости определяется величиной СИ U и условиями освещенности: 1) при $U < U_0$ скорость течения протоплазмы не меняется; 2) при $U = U_0$ длительность первой фазы восстановления скорости T_0 (рис. 3) минимальна и составляет: для клетки, адаптированной к свету — 2—6 мин, к темноте — 8—11 мин; при этом вторая фаза — фаза осцилляций скорости — отсутствует; 3) при $U > U_0$ для клеток, адаптированных к свету, T_0 увеличивается (рис. 4) и появляются медленно затухающие колебания скорости; период колебаний не зависит от U , а амплитуда — от $U - U_0$.

литуда пропорциональна отношению U/U_0 (см. рис. 3); для клеток, адаптированных к темноте, зависимость T_0 от U/U_0 не проявляется (см. рис. 4).

На эпюрах скорости (см. рис. 3) обращают на себя внимание заметные флуктуации скорости течения как до, так и после стимуляции клетки. Их происхождение имеет несколько причин. Во-первых, это

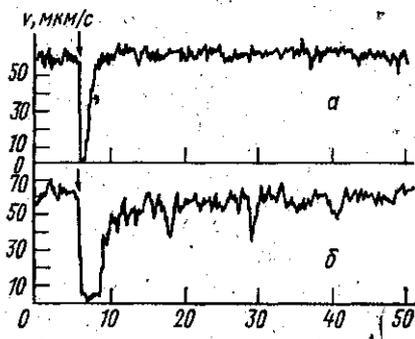


Рис. 3. Эпюры скорости течения протоплазмы при изменении величины возбуждающего импульса тока U . Момент стимуляции клетки отмечен стрелкой; а — $U=U_0$; б — $U=5U_0$, где U_0 — пороговое значение стимула

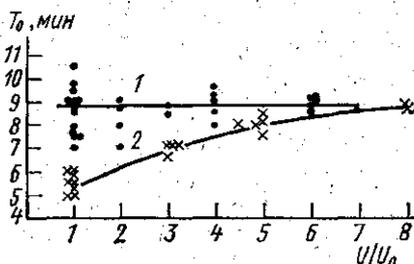


Рис. 4. Зависимость длительности первой фазы восстановления скорости; T_0 от отношения величины стимулирующего импульса U к пороговому значению U_0 для клетки, адаптированной к темноте (1) и к свету (2). Измерения проведены на 6 клетках

ошибка определения скорости по форме спектра, возникающая прежде всего из-за ограниченности времени усреднения τ [3] при получении одного спектра от потока в клетке. Верхний предел величины τ выбирается из условия $\tau \ll T_0$. Во-вторых, это существующий разброс скоростей движения внутриклеточных частиц [6].

На 5 клетках были проведены двухточечные измерения кинетики переходного процесса. Оба измерительных объема находились между вазелиновыми держателями клетки на расстоянии 1,0—1,5 см друг от друга. Получены следующие результаты: 1) с точностью до времени τ остановка течения в обоих сечениях происходила одновременно; 2) при достаточном отношении U/U_0 наблюдалось возникновение колебаний

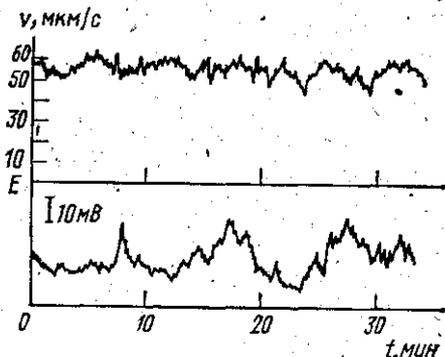


Рис. 5. Эпюры скорости течения протоплазмы и потенциала «вакуоль—внешняя среда» для одной из 14 клеток

как в одном, так и одновременно в двух сечениях клетки; 3) периоды колебаний скорости в обоих сечениях были практически одинаковы, но между ними существовала некоторая разность фаз.

Получены также следующие результаты при одновременной регистрации скорости течения протоплазмы и потенциала «вакуоль — внешняя среда»: 1) время восстановления потенциала после ПД $T \ll \ll T_0$; 2) в ряде случаев колебания скорости течения сопровождалось колебаниями потенциала (рис. 5): период колебаний потенциала $11,1 \pm \pm 3,0$ мин, амплитуда $13,6 \pm 4,1$ мВ, период колебаний скорости $5,6 \pm$

$\pm 1,4$ мин. В среднем период колебаний потенциала вдвое превышает период колебаний скорости. Однако, на наш взгляд, имеющиеся в настоящий момент данные еще не позволяют сделать однозначный вывод о корреляции колебаний скорости течения протоплазмы и потенциала мембраны.

Обсуждение результатов. С целью интерпретации полученных результатов приведем здесь некоторые данные о предполагаемом механизме создания движущей силы течения протоплазмы и об ионных потоках через мембрану при возбуждении. Одна из гипотез заключается в том, что генерация движущей силы течения происходит в результате взаимодействия эндоплазматических актиновых филаментов, одним концом закрепленных в кортексе, и растворенного в эндоплазме миозина [6]. Возможность существования однородного и стационарного течения в такой системе подтверждается экспериментально [8] на примере мышечных белков, однако детали ее функционирования еще не ясны. Есть также данные о том, что в цитоплазме содержится неполимеризованный G-актин и актинсвязывающие белки [9].

При изменении потенциала мембраны в сторону деполяризации, превышающем некоторое определенное значение, на короткое время активируются кальциевые каналы [10], повышающие концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме от 10^{-1} М в норме до 10^{-4} — 10^{-5} М на пике ПД [7]. Как предполагается в [11], время откачивания Ca^{2+} до нормы для адаптированных к свету клеток меньше, чем для клеток, выдержанных в темноте, что и обуславливает увеличение T_0 для адаптированных к темноте клеток. Далее, есть данные о том, что на свету функционируют не все Ca^{2+} -каналы, как это имеет место в темноте, и что именно число открытых каналов изменяется при изменении величины СИ [12]. С этой точки зрения становится понятным различие кривых $T_0 = f(U/U_0)$ для клеток, выдержанных на свету и в темноте.

Таким образом, можно предположить, что вид реакции потока на внешний стимул определяется количеством вошедшего при этом в цитоплазму Ca^{2+} . Возможно, что сама остановка течения обусловлена быстрой полимеризацией G-актина и актинсвязывающих белков и «вымораживанием» активной актомиозиновой системы в густую пассивную сетку. Такой механизм остановки течения объясняет и наблюдаемое повышение вязкости протоплазмы сразу после прохождения ПД [5, 6]. После откачивания лишнего Ca^{2+} происходят саморазборка сети и восстановление функционирования активного аппарата подвижности. В пользу того, что именно ионы Ca^{2+} вызывают остановку течения, говорит тот факт, что в бескальциевой среде мембрана клетки остается возбуждаемой, но генерация ПД не сопровождается остановкой течения [5].

Относительно происхождения колебаний скорости во второй фазе переходного процесса можно высказать следующие предположения.

1. Колебания скорости вызываются периодическим изменением величины движущей силы. Одной из причин этого может быть периодическое изменение ионного состава внутриклеточной среды за счет колебаний мембранного потенциала.

В частности, такая ситуация характерна для тяжелой плазмодия миксомицета *Physarum* [13]. В тяжах этого гриба наблюдается возвратно-поступательное движение протоплазмы, вызываемое волнами сокращения, распространяющимися по стенкам тяжа. При этом наблюдаются осцилляции мембранного потенциала и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , период которых совпадает с периодом колебаний скорости течения. Согласно одной из существующих гипотез, имен-

но колебания концентрации Ca^{2+} являются процессом, задающим ритм автоволновой активности тяжелой плазмодии миксомицета. Тем не менее окончательной ясности во взглядах на вопрос о взаимосвязи трансмембранного потенциала и подвижности протоплазмы как в растительных клетках, так и плазмодии миксомицета в настоящее время не существует, что связано, в частности, с малоизученностью свойств актомиозина, выделенного из этих клеток.

Однако в нашем случае амплитуда зарегистрированных колебаний потенциала недостаточна для активации Ca^{2+} -каналов [10]. Поэтому если исходить из предположения о связи колебаний потенциала и скорости, то управляющими могут быть только те ионы, проницаемость к которым определяет потенциал покоя. При этом следует подчеркнуть необходимость нелинейной связи между изменениями потенциала и скорости. Однако полученные данные не исключают того, что колебательные процессы на мембране и в цитоплазме связаны друг с другом только по моменту возбуждения ПД, а их дальнейшее развитие независимо. Этот вопрос является предметом дальнейших исследований.

2. Другой причиной колебаний скорости может быть периодическое изменение ширины канала течения. Поскольку концентрация расщепителей в эндоплазме существенно больше, чем в клеточном соке, а определяемая по форме спектра скорость соответствует наивероятнейшей скорости движения частиц в измерительном объеме, то изменения регистрируемой нами скорости, по-видимому, отражают в основном изменения скоростей частиц в эндоплазме. Поэтому в таком случае следует говорить об изменении толщины канала течения эндоплазмы δ , что может быть вызвано деформациями границы кортекста с эндоплазмой или, что более вероятно, деформациями тонопласта. Изменения величины δ (составляющей обычно 10—20 мкм) на 20% вызывают изменение скорости течения на 30%.

Следует отметить, что так как между колебаниями скорости в двух сечениях клетки существует некоторая разность фаз, то любой процесс, ответственный за возникновение колебаний, должен носить автоволновой характер.

Автор благодарен Р. Жилюкасу за любезно предоставленные популяции водорослей; Г. Н. Берестовскому и О. М. Жереловой, а также Г. А. Курелле и М. Денешу за неоднократные консультации по электрофизиологическим характеристикам мембран харовых водорослей; Ю. М. Романовскому, А. В. Приезжеву и М. В. Евдокимову за постоянные обсуждения и помощь при выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Курсанов А. Л. Транспорт ассимилятов в растении. М.: Наука, 1976.
[2] Евдокимов М. В. и др. Биофизика, 1982, 27, № 5, с. 918. [3] Евдокимов М. В., Приезжев А. В. Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон., 1981, 22, № 3, с. 88. [4] Красте И. В. В кн: Приборы и методы для микроэлектродного исследования клеток. Пушкин, 1975, с. 42. [5] Норе А. В., Walker N. A. The physiology of giant algal cells. Cambridge University Press, London, 1975. [6] Allen N. S., Allen R. D. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1978, 7, p. 497. [7] Williamson R. E., Ashley C. C. Nature, 1982, 296, N 5858, p. 647. [8] Yano M., Yamada T., Shimizu H. J. Biochem., 1978, 84, N 2, p. 277. [9] Korn E. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, N 2, p. 588. [10] Берестовский Г. Н., Вострыков И. Я., Луневский В. З. Биофизика, 1976, 21, № 5, с. 829. [11] Gyenes M., Saxena R., Kurella G. A. J. Exp. Bot., 1981, 32, N 130, p. 973. [12] Gyenes M., Kurella G. A. Ibid., 1980, 31, N 123, p. 937. [13] Ueda T., Yonosuke K. Cell Struct. Funct., 1978, 3, p. 129.