

УДК 581.17

А.П. КУДРЯШОВ, Т.В. ЦАП

ОЦЕНКА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АММОНИЯ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

On the base of monitoring electro-physiological response (shift of membrane electrical potential) of plasma membrane and tonoplast of *Nitella flexilis* upon treatment with ammonium salts we made conclusions that cytoplasmic concentration of ammonium is not constant and do not equal 0. An estimated intracellular steady-state NH_4^+ concentration of $2 \cdot 10^{-4} \div 3,5 \cdot 10^{-4}$ M was calculated in the context of (relying on) the idea of passive transport of NH_3 and NH_4^+ through tonoplast. Obtained values, we believe, represent concentration range where ammonium transport system remains functional.

Характерной особенностью растений является их способность усваивать неорганические соединения азота, синтезируя органические. Главными элементами минерального азотного питания растения являются нитраты и аммоний, при этом аммонийный азот считается более

предпочтительным, поскольку для его ассимиляции не требуется предварительное восстановление, что, в свою очередь, обуславливает значительно меньшие энергетические затраты на биосинтез аминокислот. Следует отметить, что и нитратный азот в процессах первичной биотрансформации превращается в соединения аммония.

Таким образом, для обеспечения биосинтетической активности растений необходимо наличие аммония (поскольку в водных растворах присутствуют как молекулы NH_3 , так и ионы NH_4^+ (далее – аммонийный азот и аммоний), если нет уточняющих терминов, обозначается суммарное содержание NH_4^+ и NH_3) в цитоплазме клеток. Однако хорошо известно и токсическое действие аммиака, в связи с чем чрезмерное накопление аммония в цитоплазме губительно для живого организма. В литературе отмечаются значительно различающиеся данные относительно содержания аммонийного азота в клетках растений [1–3]. Исследователи, применяя для оценки содержания аммония в клетках растений разные методические приемы, приводят значения от крайне низких концентраций около 10^{-5} М до 10^{-2} М [1–3]. Какая же концентрация аммония в цитоплазме наиболее оптимальная? Этот вопрос весьма актуален еще и потому, что поступление аммонийного азота через плазмалемму внутрь клетки может происходить как в результате функционирования транспортной системы аммония, так и путем диффузии молекул NH_3 через липидный бислой плазматической мембраны. Кроме того, исследователи так и не пришли к единому мнению о движущих силах транспорта аммония через мембрану.

Согласно нашим представлениям о процессах поступления и ассимиляции аммонийного азота [4], цитоплазматическая концентрация аммония не определяет направление транспорта ионов NH_4^+ через мембрану и, следовательно, величина непостоянная, которая может сильно варьировать в зависимости от обеспеченности растения азотом, а также в процессе переноса ионов аммония через плазмалемму клетки. Цель настоящей работы и заключается в том, чтобы привести убедительные аргументы, подтверждающие этот тезис, кроме того, оценить содержание аммония в цитоплазме клеток, при котором не нарушается работа транспортной системы аммония плазмалеммы.

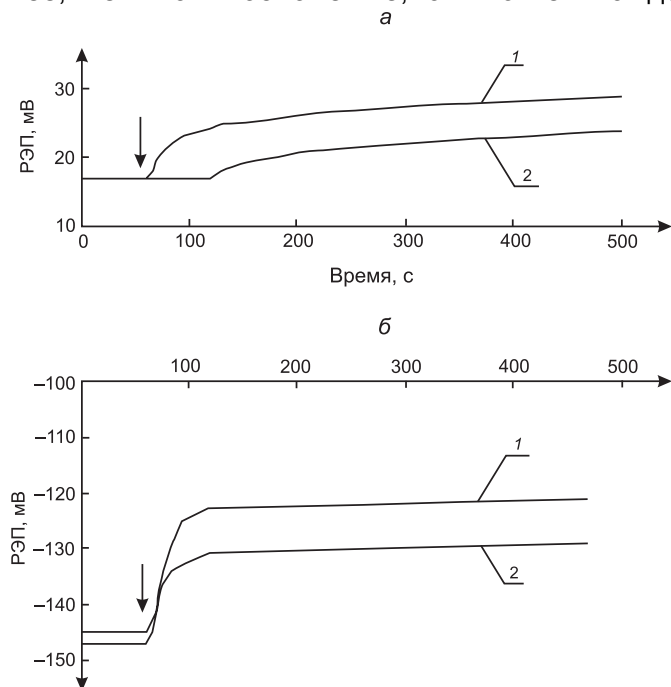
Модельным объектом являлись клетки междоузлий харовой водоросли *Nitella flexilis*, выращенной в лабораторных условиях на питательной среде следующего состава: NaHCO_3 (10^{-3} М), $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ($2 \cdot 10^{-4}$ М), CaCl_2 ($4 \cdot 10^{-4}$ М), KH_2PO_4 (10^{-4} М). Указанный объект достаточно давно используется для изучения транспорта аммония через плазматическую мембрану электрофизиологическими методами [4]. Электрофизиологические исследования плазмалеммы и тонопласта клеток *Nitella flexilis* осуществлялись с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 3 М хлоридом калия.

Еще в первых наших работах [5], посвященных изучению транспортной системы аммония плазмалеммы клеток *Nitella flexilis*, было установлено наличие двух типов растений, различающихся по их электрофизиологической реакции на действие микромолярных концентраций хлорида аммония, позднее эти группы были идентифицированы как растения с активированной и инактивированной транспортной системой аммония [4].

Для клеток с активированной системой транспорта характерна значительная деполяризация плазмалеммы, возникающая при добавлении в среду солей аммония в концентрациях от $0,3 \cdot 10^{-6}$ М до $3 \cdot 10^{-4}$ М [4]. Раздельная регистрация электрофизиологической реакции плазмалеммы и тонопласта выявила у этих клеток не только деполяризацию плазмалеммы при воздействии солями аммония, но и гиперполяризацию тонопласта [5]. Сдвиги разности электрических потенциалов на плазмалемме идентифицируются с результатом функционирования транспортной системы аммония, осуществляющей перенос ионов NH_4^+ из среды внутрь клетки. Что касается электрофизиологической реакции тонопласта, то мы и ранее трактовали ее как результат поступления аммония в цитоплазму. В настоящей работе попытаемся привести дополнительные аргументы в пользу этого и более подробно обсудить результаты экспериментов.

Характерными различиями электрофизиологических реакций плазмалеммы и тонопласта у клеток с активированной транспортной системой аммония, на наш взгляд, является не столько направленность поляризационных процессов на мембранах, сколько существенные отличия в динамике развития изменений величин разности электрических потенциалов

(РЭП) на этих мембранах. Изменения РЭП на тонопласте происходят значительно медленнее, чем на плазмалемме, а в ответ на действие очень низких концентраций ионов NH_4^+ ($3 \cdot 10^{-7} \div 5 \cdot 10^{-6}$ М) электрофизиологическая реакция тонопласта запаздывает на несколько десятков и даже сотен секунд (рисунок).



Развитие реакции тонопласта (а) и плазмалеммы (б) в ответ на добавление хлорида аммония: 1 – $5 \cdot 10^{-6}$ М; 2 – $2 \cdot 10^{-5}$ М. Стрелкой обозначен момент введения в среду хлорида аммония

Изменения РЭП тонопласта при функционировании транспортной системы аммония плазмалеммы отражают рост содержания аммония в цитоплазме, а величина сдвига РЭП этой мембраны от контрольных значений, скорее всего, должна определяться цитоплазматическим содержанием аммония. Действительно, нами были установлены закономерность сдвигов РЭП плазмалеммы и зависимость скорости транспорта ионов аммония от их концентрации в среде [4]. Таким образом, вполне логично предположить, что существует подобная зависимость величины сдвига РЭП тонопласта от содержания аммония в цитоплазме. При этом цитоплазматическая концентрация аммония должна определяться, помимо прочих явлений, и скоростью его поступления через плазмалемму. Более высоких концен-

траций аммония в цитоплазме следует ожидать в том случае, когда скорость его поступления извне велика, а рост направленного внутрь клетки потока ионов NH_4^+ происходит именно при увеличении концентрации солей аммония в среде. Полученная нами зависимость сдвигов РЭП тонопласта от концентрации аммония в среде [4] как раз и соответствует нашим логическим построениям.

Анализ развития электрофизиологической реакции тонопласта на добавление солей аммония позволяет сделать вывод о том, что даже при отсутствии аммония в среде в цитоплазме уже имеется «фоновое» (т. е. определяемое не поступлением NH_4^+ из среды, а внутренними причинами) содержание аммония. Этот вывод следует из наблюдаемой задержки сдвига РЭП тонопласта при действии очень низких концентраций ионов NH_4^+ . В этом случае поток ионов аммония внутрь клетки мал, и прирост цитоплазматической концентрации NH_4^+ будет происходить медленно. Сдвиг же РЭП тонопласта в виде реально регистрируемых величин, превышающих $2 \div 4$ мВ, должен наблюдаться лишь тогда, когда изменение концентрации вещества, определяющего значение РЭП мембраны (в нашем случае NH_4^+), достигает весьма заметной относительной величины. По аналогии зависимостей РЭП плазмалеммы от концентрации ионов в среде (K^+ , NH_4^+ , Na^+ и т. п.) следует определить такой сдвиг не менее чем на $20 \div 30$ %.

При относительно малой скорости поступления ионов аммония из среды такой прирост цитоплазматической концентрации NH_4^+ будет отмечаться через достаточно продолжительные периоды времени (согласно результатам экспериментов, задержка сдвига РЭП на тонопласте при добавлении 10^{-6} М NH_4Cl в среду составляет $50 \div 80$ с), при десятикратном увеличении потока NH_4^+ (например, в ответ на добавление 10^{-5} М NH_4Cl) задержка сдвига РЭП на тонопласте по сравнению с плазмалеммой практически отсутствует.

По нашему мнению, «фоновая» концентрация аммония в цитоплазме определяется внутриклеточными процессами, главные из которых – обмен аммиака и ионов NH_4^+ между цитоплазмой и вакуолью. Ранее нами было установлено, что в вакуолях клеток *Nitella flexilis* с инактивированной транспортной системой аммония содержится в среднем около 10^{-2} М аммония, а в клетках с активированной системой транспорта аммония концентрация NH_4^+ колеблется в весьма широких пределах – от менее 10^{-4} М до $2 \cdot 10^{-2}$ М [6]. Попытаемся оценить

цитоплазматическую концентрацию аммония, предполагая, что распределение аммонийного азота между цитоплазмой и вакуолью определяется процессами пассивного транспорта через тонопласт молекул аммиака и ионов аммония. Для проведения оценки цитоплазматической концентрации NH_4^+ будем исходить из того, что содержание последнего в вакуоли равно $2 \cdot 10^{-2}$ М (поскольку ранее нами было установлено, что такое содержание NH_4^+ не нарушает работу ТСА [6]), величину показателя кислотности вакуолярного содержимого будем считать равной 5,25, а цитоплазматического – 7,25. Указанные значения близки тому, что было определено экспериментально различными исследователями, например в [7], однако предлагаемые величины нами взяты лишь с целью упрощения расчетов, так как значение pK_a аммония при 25 °С составляет 9,25.

Еще в начале XX в. была установлена исключительно высокая способность аммиака проникать через биологические мембраны [8], поэтому наличие разности pH между клеточными компартментами будет способствовать аккумуляции аммонийного азота в вакуоли, а равновесная цитоплазматическая концентрация, определяемая процессом диффузии NH_3 , должна быть приблизительно в 100 раз ниже вакуолярной, т. е. составлять приблизительно $2 \cdot 10^{-4}$ М. Однако биологические мембраны проницаемы и для ионов NH_4^+ . В этом случае равновесная концентрация аммония в цитоплазме должна определяться не только концентрациями ионов NH_4^+ по обе стороны мембраны, но и существующей на тонопласте РЭП. Согласно данным Плакса [9], в состоянии покоя РЭП на тонопласте клеток *N. flexilis* находится в пределах от +5 до +25 мВ относительно цитоплазматического содержимого. Если для оценки этой концентрации считать значение РЭП максимальным, то равновесная цитоплазматическая концентрация, обусловленная лишь транспортом ионов NH_4^+ , должна составлять приблизительно $5,4 \cdot 10^{-2}$ М. Поскольку в системе вакуоль – цитоплазма взаимодействуют оба процесса (диффузия аммиака и ионов аммония через тонопласт), концентрация аммония в цитоплазме должна быть в пределах $2 \cdot 10^{-4} \div 5,4 \cdot 10^{-2}$ М. Для вычисления точного значения воспользуемся уравнением Онзагера, устанавливающим соответствие между движущими силами транспортных процессов и проводимостями мембраны по отношению к переносимым веществам. В нашем случае это уравнение запишется в виде

$$L_{\text{NH}_3} \Delta\mu_{\text{NH}_3} - L_{\text{NH}_4} \Delta\mu_{\text{NH}_4}^{\text{ox}} = 0, \quad (1)$$

где L_{NH_3} и L_{NH_4} – проводимости тонопласта для молекул NH_3 и ионов NH_4^+ соответственно; $\Delta\mu_{\text{NH}_3} = RT \ln(C_{\text{NH}_3}^{\text{ц}}/C_{\text{NH}_3}^{\text{в}})$ и $\Delta\mu_{\text{NH}_4}^{\text{ox}} = \{RT \ln(C_{\text{NH}_4}^{\text{ц}}/C_{\text{NH}_4}^{\text{в}}) + F\Delta\psi_m\}$ – трансмембранные разности химических потенциалов NH_3 и электрохимических потенциалов ионов NH_4^+ соответственно; индексы ц и в относятся к цитоплазме и вакуоли; C_j – концентрации аммиака и ионов аммония; R , T и F – универсальная газовая постоянная, абсолютная температура и число Фарадея.

Так как аммоний – слабое основание, то концентрации NH_3 и NH_4^+ в растворах взаимосвязаны и определяются значениями pH клеточных компартментов:

$$C_{\text{NH}_3}^i \approx C_{\text{NH}_4}^i / 10^{(9,25 - \text{pH}_i)},$$

где $i = \text{ц, в}$.

Гендерсон, рассматривая нативные биологические и искусственные бислоиные липидные мембраны, заключил, что их проницаемость для NH_3 приблизительно в 100 раз выше, чем для ионов NH_4^+ [8]. При этих условиях (т. е. когда $L_{\text{NH}_3} = 100 L_{\text{NH}_4}$) решение уравнения (1) дает величину, лишь на 10÷20 % превышающую $2 \cdot 10^{-4}$ М. Однако в литературе имеются данные о том, что ионы аммония способны проникать через биомембраны по калиевым каналам. Полученные нами оценки проницаемости плазмалеммы для NH_3 [10] показывают, что плазматическая мембрана клеток *N. flexilis* в несколько десятков раз более проницаема для молекул аммиака, чем даже для ионов калия (катионов, для которых плазмалемма наиболее проницаема). Тем не менее для получения «оптимистической» оценки цитоплазматической концентрации аммония примем, что проницаемости тонопласта по отношению к NH_3 и NH_4^+ различаются лишь в 10 раз (т. е. $L_{\text{NH}_3} = 10 L_{\text{NH}_4}$). При этих условиях цитоплазматическая концентрация аммония должна составлять приблизительно $3,5 \cdot 10^{-4}$ М.

Таким образом, согласно нашим оценкам, в цитоплазме клеток *N. flexilis* может содержаться $2 \cdot 10^{-4} \div 3,5 \cdot 10^{-4}$ М аммония. Как следует трактовать эту оценку? По нашему мнению, данные величины соответствуют установленным значениям цитоплазматической концентрации аммония, при которых не нарушается работа транспортной системы аммония плазмалеммы растительной клетки. В реальных условиях содержание аммония может быть и меньше и больше названных значений. Что касается последней возможности, то пока еще нет надежных данных, указывающих на то, что превышение этого предела не нарушает функционирование ТСА.

Полученная нами путем вычислений оценка вполне согласуется с результатами экспериментов других авторов [1] и заключением Ванга, который оценивал цитоплазматическую концентрацию аммония, исходя из величин констант Михаэлиса, ферментов, участвующих в азотном метаболизме [3]. Имеющиеся в литературе сведения о более низком значении цитоплазматической концентрации аммония не противоречат нашей концепции. Что же касается концентраций порядка 10^{-2} М [2], то к этим результатам следует относиться скептически, поскольку столь высокое содержание аммонийного азота в цитоплазме должно приводить к разобщению фосфорилирования в митохондриях и хлоропластах [8].

Полученная оценка содержания аммония вполне согласуется и с результатами наших электрофизиологических экспериментов, упомянутых в первой части статьи. По результатам наших исследований [4] и данным [11], максимальный поток ионов NH_4^+ через плазмалемму в состоянии покоя должен превышать 10^{-11} моль/(см²·с). Такая величина практически достигается при содержании солей аммония в среде свыше $2 \cdot 10^{-5}$ М. Расчеты показывают, что уже в течение 10 с в слое цитоплазмы толщиной 10 мкм вполне может быть создана концентрация NH_4^+ порядка 10^{-4} М. При более низком содержании солей аммония в среде подобный прирост аммония в цитоплазме должен отмечаться через заметно большие промежутки времени (порядка сотен секунд), но для установления стационарного гиперполяризованного уровня тонопласта при наличии в среде солей аммония в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М требуется более чем за 400 с.

Предложенная нами методика оценки основана лишь на предположении достижения равновесного распределения аммонийного азота между цитоплазмой и вакуолью за счет процессов пассивного транспорта, возможно, не учитывает иные факторы, определяющие цитоплазматическое содержание аммонийного азота. Однако следует признать, что наличие постоянного контакта цитоплазмы с заметно большим по объему компартментом (вакуолью), содержащим высококонцентрированный раствор аммония, должно быть одним из главных факторов, определяющих содержание NH_4^+ в цитоплазме.

1. Wang M., Siddiqi M.Y., Ruth T.J., Glass A.D.M. // P. Physiology. 1993. Vol. 103. № 71. P. 1249.
2. Brito D.V., Glass A.D.M., Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y. // P. Physiology. 2001. Vol. 125. № 62. P. 523.
3. Loque D., Wiren N. // J. of Experimental Botany. 2004. Vol. 55. № 401. P. 1293.
4. Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Мн., 1991.
5. Кудряшов А.П., Гончарик М.Н. // Докл. АН БССР. 1980. Т. 24. № 6. С. 1128.
6. Кудряшов А.П., Юрин В.М. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2005. № 2. С. 54.
7. Walker N.A., Smith F.A. // Plant Sci. Let. 1975. Vol. 4. P. 125.
8. Henderson P.J.F. // Ann. Rev. Microbiol. 1971. Vol. 25. P. 393.
9. Плакс А.В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2008. № 2. С. 31.
10. Кудряшов А.П., Кудряшова В.А. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Сб. ст. Междунар. науч. конф.: в 2 ч. Мн., 2004. Ч. 1. С. 195.
11. Smith F.A., Walker N.A. // J. Exp. Bot. 1978. Vol. 29. P. 107.

Поступила в редакцию 22.05.08.

Анатолий Петрович Кудряшов – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и биохимии растений.

Татьяна Васильевна Цап – аспирант кафедры физиологии и биохимии растений. Научный руководитель – А.П. Кудряшов.