

ПОЛЯРИЗАЦИЯ ПЛАЗМАЛЕММЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ИОННОГО ТРАНСПОРТА

А. П. Кудряшов, В. А. Кудряшова, Т. В. Цап

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Асимметрия распределения ионов между растительной клеткой и окружающей ее средой, поддерживаемая за счет процессов активного транспорта, вызывает появление электрохимических градиентов на плазматической мембране. Величина разности электрических потенциалов (РЭП) на мембране определяется стационарными концентрациями ионов по обе ее стороны и проницаемостью плазмалеммы для этих ионов, в то же время, заметный вклад в РЭП вносят и системы активного транспорта ионов. С другой стороны, РЭП сама может оказывать существенное влияние на работу систем пассивного и активного транспорта. В этом плане величина РЭП может выступать в роли весьма тонкого регулятора транспортных процессов. Изменение величины РЭП плазматической мембраны возможно в результате как модификации физико-химических свойств молекулярных структур, определяющих ее проницаемость, посредством метаболических процессов протекающих в клетке, так и в следствии прохождения через нее электрического тока.

Электрический ток, обусловленный направленным перемещением через мембрану ионов, может быть вызван различными причинами: внешним электрическим полем, электрическим полем мембраны, работой систем активного или пассивного транспорта и т. п. В зависимости от причин, побуждающих перенос ионов, отмечаются определенные различия в процессах поляризации мембраны. Между тем само по себе процесс изменения разности электрических потенциалов мембраны, равно как и величина РЭП существенным образом влияет на работу мембранных систем, участвующих в переносе ионов [1, 2]. В этом плане достаточно сложно выявить причинно-следственные связи экспериментально наблюдаемых явлений, обусловленных функционированием ион-транспортирующих систем плазмалеммы. Между тем, во многих случаях анализ результатов в рамках хорошо зарекомендовавших себя модельных представлений, с учетом конкретных физико-химических свойств транспортных систем мембраны, позволяет не только найти весьма простые объяснения, но и установить принципы регулирования потоков ионов через плазмалемму клеток растений. Авторы статьи попытаются дать объяснения наблюдаемым эффектам поляризации мембраны, обусловленным прохождением через нее электрического тока от различных источников, и рассмотреть механизмы регуляции

величиной стационарных значений РЭП работы систем транспорта ионов аммония и водорода.

Объект и методы исследования

В экспериментах были использованы клетки междоузлий водоросли *Nitella flexilis*, которая относится к семейству *Nitellaceae*. Водоросль *Nitella flexilis* является весьма удобным объектом в электрофизиологических экспериментах, так как ее интернодальные клетки имеют довольно крупные размеры, у них резко обозначена дифференцировка основных микроструктур, стабильность процессов жизнедеятельности, кроме того, клетки легко препарируются. Для стандартизации отпрепарированные клетки водоросли помещали в плотно закрытые чашки Петри с искусственной прудовой водой (ИПВ) состава: 10^{-4} М КСl; 10^{-3} М NaCl; 10^{-4} М CaCl₂. Клетки хранились в этой среде в режиме обычного чередования дня и ночи (10-12 ч – свет, 14-12 ч – темнота) при освещенности 1000-3000 лк. При этом, для сохранения активности системы транспорта аммония, клетки выдерживались в условиях азотного голодания не менее 7-10 сут, а при проведении исследований Н⁺-АТФазы использовались свежесрезанные (не более 1-2 сут). Величина рН ИПВ, используемой в экспериментах, на уровне 6,5 поддерживалась постоянной за счет буфера состава: $0,27 \cdot 10^{-3}$ М NaH₂PO₄ + $0,7 \cdot 10^{-3}$ М Na₂HPO₄. Измерения электрических параметров мембраны проводились с помощью прецизионной микроэлектродной техники. Внутриклеточные микроэлектроды, которые были изготовлены из стекла пирекс, имели кончик диаметром 0,5-2 мкм и заполнялись 3 М раствором хлорида калия. Электрод сравнения представлял собою стеклянную микропипетку с кончиком диаметром около 50 мкм, заполненную 3 М КСl на 3% агар-агаровом геле. Микроэлектрод и электрод сравнения соединялись с электрометрическими усилителями через неполяризующиеся каломельные полуэлементы.

Экспериментальная камера была изготовлена из оргстекла и состояла из трех отсеков. Интернодальная клетка *Nitella flexilis* укладывалась в прорези камеры так, что ее торцы выходили в боковые отсеки. Отсеки изолировались вазелином (длина изолирующих промежутков составляла 10 мм), а в среднем (рабочем) отсеке находился фрагмент клетки длиной 5 мм, это обеспечивало однородность тока через клеточную поверхность. Рабочий отсек имел объем около 60 мкл, что позволяло, с одной стороны, производить быструю смену растворов, с другой – увеличивать скорость протока растворов до 20 мм/с (при таком течении практически отсутствуют неперемешивающиеся слои жидкости у поверхности клетки).

Установка для регистрации электрических параметров мембран позволяла проводить измерения разности электрических характеристик плазмалеммы, как в условиях тока, так

и напряжения. Снятие вольтамперных характеристик плазмалеммы производилось в режиме фиксации потенциала. Стационарные вольтамперные характеристики СВАХ плазмалеммы получали посредством медленных (0,1 мВ/с) линейно меняющихся деполяризующих (от -240 мВ до -30 мВ) напряжений при отсутствии возбуждения мембраны. Для построения СВАХ транспортной системы аммония нами предложена следующая методика [3]: напряжение на плазмалемме фиксировалось на различных уровнях от -240 мВ до -30 мВ; на каждом уровне снималась концентрационная зависимость величины ионного тока, возникающего в ответ на добавление хлорида аммония в наружный раствор. Затем для каждой концентрации NH_4^+ строилась зависимость тока, протекающего через транспортную систему аммония, от величины РПП на плазмалемме – т. е. СВАХ транспортной системы аммония.

В виду наличия методических сложностей построения СВАХ H^+ -АТФазной помпы, в работе для интерпретации результатов использовались мгновенные вольтамперные характеристики системы (МВАХ). СВАХ и МВАХ H^+ -АТФазной помпы, вероятнее всего неидентичны, но для интерпретации результатов эксперимента нам важна была лишь форма кривой, отражающей зависимость электрического тока, протекающего через H^+ -АТФазную помпу. Вероятнее всего СВАХ и МВАХ H^+ -АТФазной помпы по форме качественно отличаются не существенно. Снятие МВАХ проводилось в импульсном режиме; после фиксации потенциала плазмалеммы на заданном уровне (-180 мВ) и установления стационарного значения тока проводилось импульсное изменение РЭП от заданного уровня в сторону гипер- и деполяризации. Длительность импульсов напряжения составила 20 мс, а амплитуда каждого последующего импульса ступенчато нарастала с шагом в 20 мВ. Вначале подавались гиперполяризующие импульсы, а затем – деполяризующие. Одновременно с подачей импульсов напряжения производилась регистрация ответных импульсов тока с помощью запоминающего осциллографа С8-17. МВАХ H^+ -АТФазы представляла собой разность между МВАХ плазмалеммы, снятой в темноте и в пике гиперполяризации плазмалеммы, обусловленной освещением клеток харовой водоросли (1000–3000 лк)

Результаты и их обсуждение

Для описания электрических параметров плазмалеммы используются различные подходы, учитывающие вклад в эти величины от систем ионного транспорта. Ранее для описания электрических характеристик плазмалеммы нами была предложена относительно простая эквивалентная электрическая схема [4] (подобные эквивалентные схемы ныне достаточно широко используется для интерпретации экспериментальных данных, см. например [2]),

которая учитывала вклад всех систем ионного транспорта в электрические параметры мембраны, поэтому для моделирования электрических явлений, происходящих на плазмалемме будем пользоваться эквивалентной электрической схемой мембраны, в виде n параллельно соединенных цепей из последовательно соединенных источников ЭДС (E_i) и проводимостей (g_i) (рис. 1а), каждая элементарная цепь имитирует электрические характеристики конкретной системы ионного транспорта. Разумеется, величины E_i и g_i непостоянны и зависят как от концентрации i ионов по обе стороны мембраны, так и других факторов (внешних и внутренних), определяющих работу систем ионного транспорта.

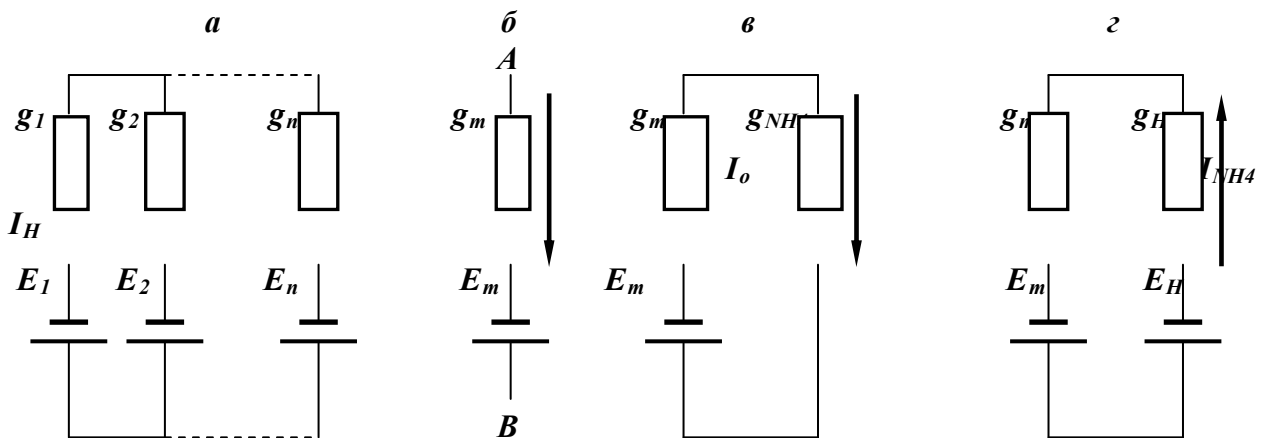


Рисунок 1 - Эквивалентная электрическая схема плазмалеммы.

Обычно в состоянии покоя при слабом освещении РЭП и проводимость плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* определяются главным образом работой систем пассивного транспорта, осуществляющих перенос ионов K^+ , Na^+ и Cl^- [4]. В этом случае эквивалентная электрическая схема плазмалеммы может быть упрощена до элементарной цепи, представляющей последовательное соединение источника ЭДС (E_m) и резистора проводимостью g_m (рис. 1б), при этом величина g_m определяется как сумма g_i всех систем ионного транспорта вносящих вклад в электрические параметры плазмалеммы при указанных условиях, а E_m определяются выражением (1):

$$E_m = \frac{\sum E_i}{\sum g_i} \quad (1)$$

Подключение внешнего источника тока I_o , приводит к изменению регистрируемой между точками А и В разности электрических потенциалов на величину I_o / g_m . Если ток I_o , направлен внутрь клетки, то отмечается возрастание по абсолютной величине РЭП, при

противоположном направлении I_o , отмечается деполяризация. Это явление достаточно хорошо изучено и применяется в электрофизиологических экспериментах, проводимых в режимах фиксации напряжения и тока. Качественно иные явления оказывает электрический ток, обусловленный переносом ионов через мембрану от внутренних ЭДС.

Ранее было продемонстрировано деполяризующее действие микромолярных концентраций аммонийных солей, обусловленное активацией системы, осуществляющей унипорт ионов NH_4^+ через плазмалемму клеток растений [1]. Было показано, что электрические явления, возникающие на плазмалемме при работе транспортной системы аммония, удовлетворительно описываются в рамках эквивалентной электрической схемы подобной той, что изображена на рис. 1а [5]. Однако анализ вольтамперных характеристик транспортной системы аммония позволяет предположить, что ее ЭДС равна нулю. В этом случае эквивалентная электрическая схема плазмалеммы при активированной транспортной системе аммония может быть представлена несколько иначе (рис. 1в). Согласно этой эквивалентной электрической схеме именно РЭП и побуждает перемещение ионов NH_4^+ через мембрану. Следует отметить, что подобная точка зрения в целом согласуется с моделью транспортной системы аммония [6]. В этом случае при активированной системе транспорта аммония добавление ионов NH_4 в среду вызывает деполяризацию плазмалеммы, при этом регистрируемое в присутствии аммония значение РЭП (E_m^*) в соответствии с эквивалентной схемой, изображенной на рис. 1в, должна определяться по формуле:

$$E_m^* = E_m g_m / (g_m + g_{NH_4}), \quad (2)$$

E_m^* должна быть меньше по абсолютной величине, чем E_m , т. е. направленный внутрь ток ионов аммония деполяризует мембрану. Экспериментальные данные достаточно хорошо согласуются с результатами вычисления, проведенными в рамках эквивалентной электрической схемы, изображенной на рис. 1в, только в ограниченном диапазоне концентраций ионов аммония: при низких концентрациях аммония (когда сдвиги РЭП относительно невелики) отмечается практически полное совпадение регистрируемых и вычисленных значений E_m^* , однако по мере возрастания концентрации аммония в среде экспериментальные и теоретические значения потенциала плазмалеммы все больше различаются (табл.).

Таблица 1. Сопоставление измеряемых и вычисленных значений РЭП плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* при функционировании системы транспорта аммония

параметр	Концентрация ионов NH ₄ в среде, М					
	0	10 ⁻⁶	3·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
E _m , мВ	-132±4	-132±4	-132±4	-132±4	-132±4	-132±4
g _m , мкСм/см ²	32,1±1,6	32,1±1,6	32,1±1,6	32,1±1,6	32,1±1,6	32,1±1,6
g _{NH₄} , мкСм/см ²	0	1,1±0,6	2,2±0,4	3,5±0,5	12,5±0,8	45,0±3,5
E _m [*] регистрируемая, мВ	-132±4	-128±3	-125±5	-121±4	-118±3	-98±5
E _m [*] вычисленная, мВ	-132,0	-127,6	-123,5	-119	-95	-55

На наш взгляд такое явление обусловлено тем, что вольтамперная характеристика плазмалеммы нелинейна. Поэтому при сдвиге потенциала свыше 20 мВ как оценка величины проводимости g_{NH₄} (в соответствии с экспериментальными данными), так и последующие вычисления E_m^{*} по формуле (2) оказываются некорректными. Вероятно, учет нелинейности вольтамперных характеристик позволил бы точно вычислить эффект поляризации мембраны при возникновении тока ионов аммония. Действительно, вычисленные значения E_m^{*} при содержании ионов NH₄⁺ свыше 5·10⁻⁶ М заметно ниже по абсолютной величине, чем измеряемые, при деполяризации плазмалеммы g_m возрастает и, следовательно, вычисляемые значения g_{NH₄} должны быть заметно завышены для этого диапазона концентраций ионов аммония.

Несколько иные явления происходят при активации системы активного транспорта ионов H⁺, индуцируемой на плазмалемме клеток *Nitella flexilis* при переходе от темноты к освещенности большей, чем 700 лк. Перемещение ионов H⁺ через мембрану обусловлено работой сторонних сил (т. е. сил не электрической природы), что на эквивалентной схеме равносильно подключению дополнительного источника ЭДС E_H с внутренней проводимостью g_H (рис. 1з), а результирующее значение E_m^{*} должна определяться соотношением ЭДС и проводимостей каждой цепи:

$$E_m^* = (E_m g_m + E_H g_H) / (g_m + g_H), \quad (3)$$

а, поскольку, E_H по абсолютной величине выше, чем E_m (это следует из анализа вольтамперных характеристик H⁺-АТФазы [1]), то в этом случае отмечается гиперполяризация мембраны. На первый взгляд предложенная эквивалентная схема позволяет относительно просто предсказать величину РЭП при активации той или иной

системы ионного транспорта (такого рода качественный анализ делался неоднократно, см., например, [2]), однако на самом деле точное предсказание значений E_m^* возможно лишь в некоторых случаях, поскольку как g_m , так и g_{NH_4} или g_H являются функциями РЭП. С другой стороны, процесс активации H^+ -АТФазной помпы при освещении клеток харовых водорослей приводит к возникновению гиперполяризованного состояния мембраны, в котором не отмечается заметного влияния ионов калия на РЭП, характерного для деполяризованного (темнового) состояния. Уже в первых исследованиях процесса фотоиндуцированной гиперполяризации отмечались отсутствие промежуточного состояния и возможности стабилизации гиперполяризации ионами Ca^{2+} , а деполяризации ионами K^+ [7]. Из рассмотренных эквивалентных электрических схем плазмалеммы следует, что чем выше g_m , тем слабее должно влиять на величину РЭП функционирование систем транспорта ионов аммония или H^+ . Увеличение же g_m может быть осуществлено, например, в результате повышения содержания ионов K^+ во внеклеточной среде. Действительно, в растворах 10^{-3} М K^+ работа системы транспорта аммония не вызывает значительной деполяризации плазмалеммы [1, 7], а фотоиндуцированной гиперполяризации, связанной с функционированием H^+ -АТФазной помпы, обычно не наблюдается. Напротив, в присутствии двухвалентных катионов деполяризующее,

1

2

снижающих величину g_m , действие ионов NH_4^+ усиливается [5] и стабилизируется гиперполяризованное состояние плазмалеммы клеток харовых водорослей при освещении.

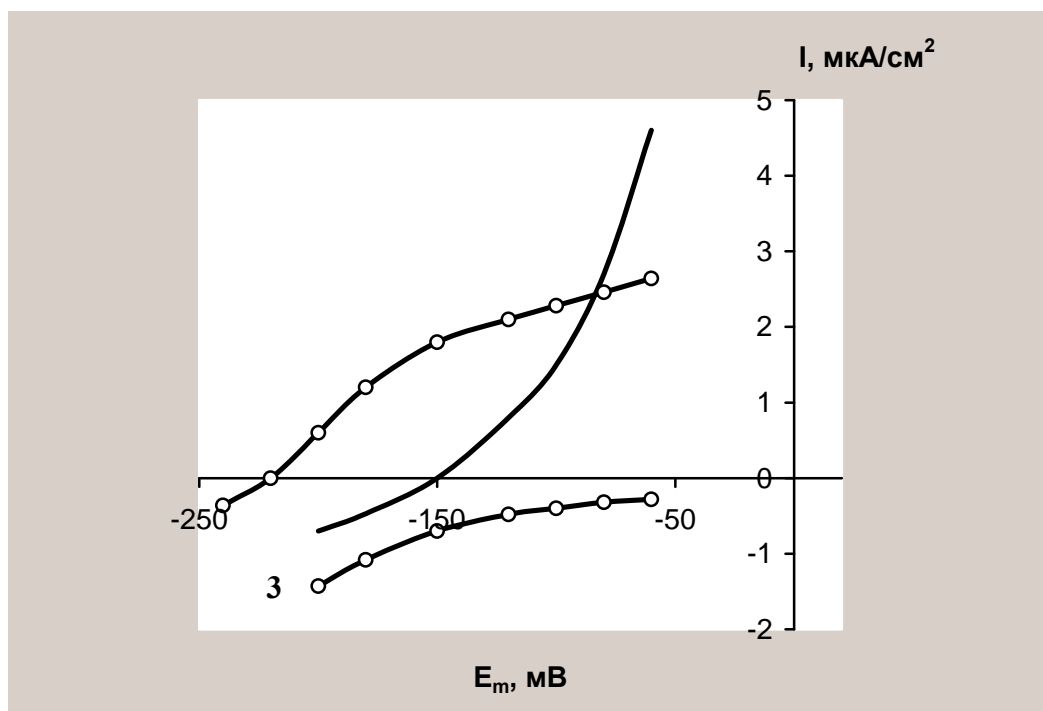


Рисунок 2 - СВАО плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* в темноте (1) МВАО фотоиндуцируемой H^+ -АТФазной помпы(2) и СВАО транспортной системы аммония в присутствии 10^{-5} М NH_4Cl (3)

Зачастую снижение характерных эффектов поляризации, обусловленной функционированием систем ионного транспорта, под действием ионов K^+ объясняют связью транспорта этого иона с функционированием соответствующих систем ионного транспорта. Анализ ВАО системы транспорта аммония отчасти подтверждает такое влияние (рис. 2), однако в этом случае приходится говорить об опосредованном влиянии ионов K^+ (через снижение РЭП). В этом плане любое воздействие, приводящее к деполяризации мембраны должно обуславливать снижение потока ионов аммония через плазмалемму. Ведь активация транспортной системы аммония тоже приводит к деполяризации плазмалеммы и, следовательно, к снижению потока ионов аммония через мембрану. Однако при функционировании транспортной системы аммония принципиально невозможна «катастрофическая» (как это следует из вычисленных значений E_m^* (см. табл.)) деполяризация, приводящая к многократному снижению потока ионов аммония, поскольку молекулярная структура систем ионного транспорта, определяющих РЭП в состоянии покоя, и обеспечивающих перенос ионов аммония таковы, что отмечается сложная зависимость их проводимостей от РЭП. При этом в гиперполяризованном состоянии величина g_{NH_4} , определяемая тангенсом угла наклона ВАО к оси напряжений, будет выше, чем в деполяризованном (см. рис. 2), а величина g_m наоборот – при деполяризации возрастает. Соотношение форм ВАО систем ионного транспорта таково, что становится возможной регуляция транспортных процессов

величиной РЭП. Так, в соответствии с характерной S-образной формой ВАХ H^+ -АТФазной помпы, можно заключить, что при деполяризации плазмалеммы должен увеличиваться поток ионов H^+ через мембрану, гиперполяризация же должна приводить к снижению выброса ионов H^+ . В то же время, в присутствии в среде K^+ в концентрации 10^{-3} М и выше значительно снижается фотоиндуцированная гиперполяризация, обусловленная транспортом ионов H^+ . Упомянутые факты могут указывать на противоположное влияние РЭП на работу H^+ -АТФазы.

Основное функциональное назначение H^+ -АТФазной помпы плазмалеммы – энергизация мембраны, т. е. создание и поддержание резко неравновесного распределения ионов H^+ по обе стороны мембраны. Однако эта задача достигается не за счет формирования резко отличающихся по обе стороны мембраны значений рН, а в результате генерации стабильно высокого значения РЭП. Вклад в процессы поддержания рН цитоплазмы на стабильном уровне от H^+ -АТФазной помпы относительно невелик, поэтому, с «экономической» точки зрения, желательно минимизировать энергозатраты в гиперполяризованном состоянии, что должно выражаться в минимизации потока ионов H^+ через H^+ -АТФазную помпу. Такое положение, согласно анализу ВАХ (см. рис. 2), может быть достигнуто при гиперполяризации мембраны до -200 - -220 мВ. Соотношение форм ВАХ H^+ -АТФазной помпы и ВАХ плазмалеммы в темноте таковы, что достижение ситуации близкой к идеальной вполне осуществимо, поскольку мере гиперполяризации будет происходить рост g_H и падение g_m (см. рис. 2). Т. е. при активированной H^+ -АТФазной переход РЭП на гиперполяризованный уровень означает стабилизацию энергизованного состояния плазмалеммы и наоборот – деполяризация может «деэнергизовать» плазмалемму за счет стабилизации деполяризованного состояния (в этом случае g_H падает, а g_m – возрастает). Таким образом, всякие воздействия на величины g_H или g_m должны приводить к переходам либо в гиперполяризованное, либо деполяризованное состояния плазмалеммы, а промежуточное состояние мембраны неустойчиво, что подтверждается экспериментально [7]. На наш взгляд эти явления, как и снижение показателей фотоэлектрической реакции плазмалеммы при содержания ионов K^+ свыше, чем 10^{-3} М можно объяснить ростом g_m . Хотя, при деполяризации через H^+ -АТФазную помпу идет больший поток H^+ , чем при гиперполяризации (отчасти этот эффект продемонстрирован в работе [8], где отмечалось заметное выделение ионов водорода из клеток мезофилла листа при 10^{-2} М КСl и ингибирование ацидофикации тетраэтиламмонием), однако ее проводимость резко снижена, поэтому результирующее значение РЭП будет гораздо ближе к E_m , чем к E_H .

Энергизация плазматической мембраны при активации H^+ -АТФазной помпы исключительно важна для функционирования систем вторичного активного транспорта, осуществляющих трансмембранный перенос физиологически значимых веществ в котранспорте с ионами H^+ . Система транспорта ионов аммония осуществляет унипорт NH_4^+ через плазмалеммы клеток. Эксперименты, проведенный в режиме фиксации потенциала не выявили влияния освещения или рН среды на поток ионов NH_4^+ через плазмалемму клеток *Nitella flexilis* [4]. Однако в рамках рассмотренного выше материала не следует исключать опосредованного существенного влияния света на транспорт аммония внутрь клеток растений. Сама по себе гиперполяризация мембраны при фотоиндуцированной активации H^+ -АТФазной помпы уже должна приводить к возрастанию потока ионов аммония, а увеличение проводимости мембраны за счет вклада системы активного транспорта ионов H^+ в значительной мере снижает деполяризующее (и, следовательно, уменьшающее поток NH_4^+) действие ионов аммония, во всяком случае при низких (микромольных) концентрация. Таким образом, клетки с энергизованной плазмалеммой должны весьма эффективно извлекать аммоний из крайне разбавленных растворов. В свою очередь, чрезмерный рост потока ионов аммония внутрь клеток, вызванный ростом содержания последних в среде, при указанных условиях невозможен, поскольку в этом случае заметный вклад на электрические характеристики мембраны будет оказывать возросшая проводимость системы транспорта аммония (g_{NH_4}), что может индуцировать заметную деполяризацию плазмалеммы, нарушающую ее стабилизацию в энергизованном состоянии. Деполяризация, во-первых, резко снизит поток ионов аммония, а, во-вторых, повысит активный выброс ионов H^+ из клетки, необходимый для поддержания баланса электрического заряда. В результате будет осуществляться взаимодействие и взаимовлияние двух систем ионного транспорта, которые являются функционально автономными.

Таким образом, на основе рассмотрения электрофизиологических явлений в рамках эквивалентной электрической схемы мы дали толкования наблюдаемым противоположным эффектам поляризации мембраны, обусловленным прохождением электрического тока от разных источников, причем, ввиду простоты этих объяснений мы не настаиваем на своем приоритете. Тем не менее, считаем необходимым дать развернутый анализ явлениям поляризации, происходящим на плазмалемме растительной клетки при функционировании систем ионного транспорта, поскольку эти явления лежат в основе процессов энергогенеза и регуляции процессов функционирования систем ионного транспорта. Приведенный анализ демонстрирует, что даже в отсутствии непосредственной связи в процессах

функционирования мембранных систем ионного транспорта возможно значительное взаимовлияние, затрудняющее толкование наблюдаемых в эксперименте зависимостей.

Литература

1. Юрин, В.М. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток / Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П.-Мн.: Наука і тэхніка, 1991.-271 с.
2. Miedema, H. Simulation of the Light-Induced Oscillations of the Membrane Potential in *Potamogeton* Leaf Cells / Miedema H., Prins H.B.A. // J. Membrane Biol. – 1993. Vol. 133, – P. 107-117
3. Кудряшов, А.П. О механизме транспорта аминов через плазмалемму клеток *Nitella* / Кудряшов А.П., Юрин В.М. //Биофизика, – 1987, Т.32, – №4. – С. 642-646.
4. Юрин, В.М., Рэгуляцыя транспарту катыёнаў праз плазмалему раслінных клетак / Юрин В.М. и др. // Весті АН БССР, сер. Биол. наук, – 1991, № 3, – С. 128-131.
5. Кудряшов, А.П. К вопросу об избирательности транспортной системы аммония плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* / Кудряшов А.П. Юрин В.М. //Физиология растений. – 1989. т.36, N5. – С. 893-899.
6. Кудряшов, А.П. К вопросу количественного описания потенциалозависимости тока ионов аммония через плазмалемму растительной клетки / Кудряшов А.П., Юрин В.М. // Сб. «Физиология, электрофизиология, ботаника и интродукция сельскохозяйственных растений». Н. Новгород. – 2001. С. 136 – 140.
7. Saito, K. The light-dependent effect of external pH on the membrane potential of *Nitella* / Saito K., Senda M. // Plant Cell Physiol. – 1973. Vol. 14, – P. 147-156.
8. Stiles, K.A. Role of K^+ in leaf growth: K^+ uptake is required for lightstimulated H^+ efflux but not solute accumulation / Stiles K.A., VanVolkenburgh E. // Plant, Cell and Environment. – 2004. Vol. 27, – P.315-325.