

11. Кузнецов, В.Г. // Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (псевдотуберкулез человека): Сб. науч. тр. Л., 1978. С. 24.
12. Лопушинский, Д.П. // Здоровоохранение Белоруссии. 1979. № 7. С. 46.
13. Новиков, П.Л., Зубрицкий, П.К., Карапетян Р.Г. и др. // Там же. 1982. № 2. С. 12.
14. Чистенко, Г.В., Горбачева, В.Н., Плахоть, Л.П. // Современные проблемы профилактики зоонозных болезней и пути их решения (Гродно, 20-21 мая 1987 г.): Тез. докл. III Респ. науч.-практ. конф. Гродно, 1987. С. 161.
15. Савицкий, Б.П., Кусенков, А.Н., Тимошенко, М.А. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1990. № 1. С. 117.
16. Черкасский, Б.П. Инфекционные и паразитарные болезни человека: Справ, эпидемиолога. М., 1994.
17. Поманская, Л.А. // ЖМЭИ. 1962. № 9. С. 102.
18. Там же. 1963. № 6. С. 99.
19. Гершун, В.И. Экология возбудителей сапронозов. М., 1988. С. 80.
20. Хруцкий, А.Е., Давидчик, Л.Я. // Ветеринарная наука - производство: (Тр. БелНИВИ). Мн., 1972. Т. 8. С. 115.
21. Ананчиков, М.А. // Современные проблемы профилактики зоонозных болезней и пути их решения: Тез. докл. III Респ. науч.-практ. конф. Гродно, 1987. С. 183.
22. Адамович, В.Л., Штолина, Л.П., Остапчук, Л.М. и др. // Проблемы паразитологии: Тр. IV Науч. конф. паразитологов УССР. Киев, 1963. С. 483.
23. Burgdorfer, W., Barbour, A., Hayes, S. et al. // Acta Tropica. 1983. Vol. 40. P. 70.
24. Трофимов, Н.М., Мороз, А.Г., Борткевич, В.С. и др. // Здоровоохранение. 2000. № 1. С. 20.
25. Горелова, Н.Б., Ковалевский, Ю.В., Коренберг, Э.И. и др. // VI Экологическое совещание, Санкт-Петербург, 28-30 сент. 1999 г.: Тез. докл. СПб., 1999. С. 21.
26. Nechemy, K. // Bull. Soc. Pathol. Exot. 1986. Vol. 79. № 1. P. 9.
27. Наумов, Р.Л., Васильева, И.С. // Мед. паразитология и паразитар. болезни. 2001. № 4. С. 38.
28. Тарасов, В.В. Членистоногие переносчики возбудителей болезней человека. М., 1981.
29. Вотяков, В.И., Грицкевич, А.В., Корзенко, В.Н. и др. // ЖМЭИ. 1960. № 2. С. 65.
30. Савицкий, Б.П., Цвирко, Л.С. Трансмиссивные зоонозы в Гомельской области. Мозырь, 1999.
31. Литвин, В.Ю. // Успехи современной биологии. 1983. Т. 96. Вып. 1 (4). С. 132.

Поступила в редакцию 14.12.04.

**Борис Парфенович Савицкий** - доктор биологических наук, профессор, заместитель директора Межведомственного центра проблем национальных парков и заповедников БГУ.

**Сергей Владимирович Кучмель** - кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией зоологии Государственного радиологического заповедника.

**Леонид Дмитриевич Бурко** - кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии.

**Лидия Сергеевна Цвирко** - кандидат наук, доцент, заведующая кафедрой медицинских знаний МГПУ.

**Михаил Борисович Савицкий** - младший научный сотрудник Межведомственного центра проблем национальных парков и заповедников БГУ.

УДК 581.13

Ж. В. ВЫСОЦКАЯ, А. И. СОКОЛИК В. М. ЮРИН

## ВЛИЯНИЕ КАТИОННОГО СОСТАВА СРЕДЫ НА ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Using the Characeae cell *Nitella flexilis* it was shown, that potential dependence of outward-rectified potassium channels in plasma membrane was modified with permeable and not permeable ions by means their influence on local electric field in location of potential sensitive part of channel gating mechanism.

Функционирование избирательных к калию катионных каналов чрезвычайно важно для нормального существования растительного организма, поскольку они играют решающую роль в снабжении как отдельных клеток, так и всего растительного организма одним из основных макроэлементов - калием [1]. Сегодня многое известно об этих каналах как молекулярных структурах, однако особенности их совместного функционирования в нативной клеточной мембране еще далеко не выяснены [2]. Прежде всего имеется в виду их взаимодействие и взаимовлияние посредством электрического поля, которое достигает значительных величин из-за малой толщины мембраны, и энергия взаимодействия заряда с полем сопоставима по величине с тепловой. Наиболее значимое для регуляции ионных потоков через каналы явление этого рода проявляется как

потенциалзависимость каналов, т. е. зависимость их числа в открытом состоянии (активированных) от величины разности электрических потенциалов на мембране. Цель настоящей работы - выяснить особенности влияния некоторых катионов на одну из важнейших интегральных характеристик плазматической мембраны растительных клеток - потенциалзависимость активации калиевых каналов.

### Материал и методика

В работе были использованы выращенные в лабораторных условиях интернодальные клетки харовых водорослей *Nitella flexilis* L. Agardz. Эти клетки являются классическим объектом исследований подобного рода, поскольку имеют значительные размеры, а главное - обнаруженные в них калиевые каналы схожи с аналогичными структурами плазматических мембран клеток высших растений [3, 4].

Особенности поведения каналов изучали с применением электрофизиологических подходов, основанных на микроэлектродной технике и методике фиксации потенциалов на мембране нативной клетки [5]. В ходе экспериментов получали стационарные и мгновенные вольт-амперные характеристики мембраны (СВАХ и МВАХ соответственно). В первом случае на мембране фиксировали линейно возрастающее со скоростью 20 мВ/мин напряжение и регистрировали протекающий ток, во втором регистрировали токи, проходящие через мембрану в ответ на короткие импульсы напряженной переменной амплитуды. Детали экспериментальных процедур описаны в работе [4]. В качестве базового использовали раствор искусственной прудовой воды (ИПВ) состава (ммоль/л): 0,1 КСl + 0,1 CaCl<sub>2</sub>; рН поддерживали на уровне 7,2, температуру - 20±2 °С.

### Результаты и их обсуждение

Типичные стационарные вольт-амперные характеристики плазматической мембраны показаны на рис. 1 а, 2 а. Видно, что увеличение концентрации калия в растворе, так же как и добавление ионов тетраэтиламмония (ТЭА<sup>+</sup>) и Cs<sup>+</sup>, существенно изменяет характер зависимостей тока от напряжения на мембране. Скорость изменения напряжения (деполяризация от -240 до +10 мВ) была выбрана такой, чтобы времязависимые процессы, связанные с активацией калиевых каналов выходящего выпрямления, успевали завершиться, а быстрые хлорные и кальциевые каналы не активировались в силу адаптации [4]. Таким образом, каждое значение тока на кривых отвечает стационарному состоянию проводимости, когда активация каналов при данном напряжении максимальна. Далее по СВАХ вычисляли значение так называемой хордовой проводимости мембраны [4] (рис. 1 б, 2 б и 3).

По зависимостям на рис. 1 б видно значительное влияние изменений ионного состава среды, особенно в диапазоне напряжений от -150 до 0 мВ, где и происходит активация калиевых каналов, соответствующих стационарному состоянию проводимости плазматической мембраны [4]. В частности, возрастание концентрации калия в среде значительно сдвигает кривую проводимости по оси напряжений в направлении гиперполяризации, одновременно вызывая рост величины проводимости. Добавление в раствор 3 ммоль/л ТЭА вызывает сходный для обеих концентраций калия эффект, который состоит в сдвиге кривых в направлении деполяризации и снижении величины проводимости во всем диапазоне напряжений. Если последнее представляет хорошо известный факт блокирования калиевых каналов ионами ТЭА, то сдвиг кривых ранее в литературе описан не был.

Известно, что блокирование каналов ионами зачастую является потенциалзависимым, т. е. степень блокирования зависит от напряжения на мембране [6]. Соответствующие кривые, полученные по данным рис. 1 б, показаны на рис. 1 е. Видно, что степень блокирования стационарной проводимости мембраны возрастает в том же диапазоне напряжений, в котором происходят процессы активации-деактивации калиевых каналов. Таким образом, данная зависимость степени блокирования каналов ионами ТЭА от напряжения на мембране является суммой двух эффектов: как собственно блокирования каналов, т. е. снижения проводимости тех из них, с которыми связался ТЭА, так и изменения их числа в

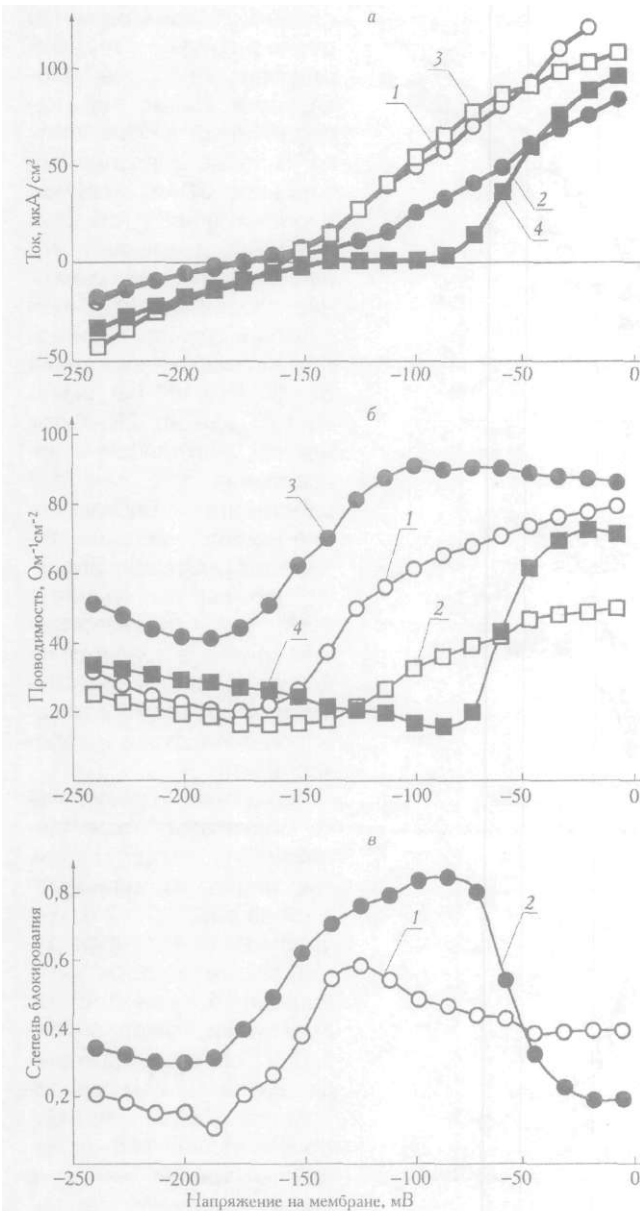


Рис. 1. Действие тетраэтиламмония на потенциалзависимость калиевых каналов выходящего выпрямления стационарного тока плазматической мембраны:

а – стационарные вольт-амперные характеристики, б – зависимости проводимости мембраны от напряжения, полученные в следующих растворах (ммоль/л): 1 – 0,1 KCl+0,1 CaCl<sub>2</sub>, 2 – тот же раствор + 3,0 ТЭАС, 3 – 0,5 KCl+0,1 CaCl<sub>2</sub>, 4 – тот же раствор + 3,0 ТЭАС; в – относительная степень блокирования каналов, полученная из зависимостей (б) как отношение разности исходной проводимости и в присутствии ТЭА к исходной; 1 – на фоне 0,1 KCl+0,1 CaCl<sub>2</sub>, 2 – с увеличенным до 0,5 содержанием калия. Здесь и на рис. 2, 3 величина pH 7,2

открытом состоянии при данном напряжении. Потенциалзависимость собственно блока каналов хорошо видна по мгновенным вольт-амперным характеристикам (зависимостям тока от напряжения), полученным за столь короткое время, чтобы число активированных каналов не успело заметно измениться [7]. В таких условиях, как показывают эксперименты, для ТЭА блокирование калиевых каналов исследуемого типа значительно меньше зависит от напряжения, чем для СВХ (рис. 1 в).

Таким образом, собственно блокирование каналов в силу весьма слабой потенциалзависимости взаимодействия иона-блокатора с каналом не может вызвать столь существенных изменений положения активационных кривых на оси напряжений. Отмеченные изменения характера потенциал зависимости каналов, по-видимому, являются результатом действия иона ТЭА на потенциалчувствительный механизм активации каналов.

Аналогичные эксперименты с ионами цезия показали подобную картину (см. рис. 2) изменения СВХ. Однако дальнейший анализ обнаруживает существенные различия. Так, наряду с аналогичным для ТЭА сдвигом активационных кривых отсутствует снижение проводимости при

действии цезия в условиях деполяризации мембраны свыше -50 мВ. В значительной степени резче проявляется потенциалзависимость блока - практически все снижение проводимости происходит в диапазоне от -50 до -100 мВ.

МВХ для цезиевого блока этих же каналов [4] показывают очень крутую потенциалзависимость эффекта при такой же концентрации цезия в среде. Так, величина тока убывает от значения в контроле до минимальной величины при блоке в диапазоне напряжений шириной менее 20 мВ, причем напряжение, при котором блокирование начинается, совпадает с точкой реверсии тока. Иными

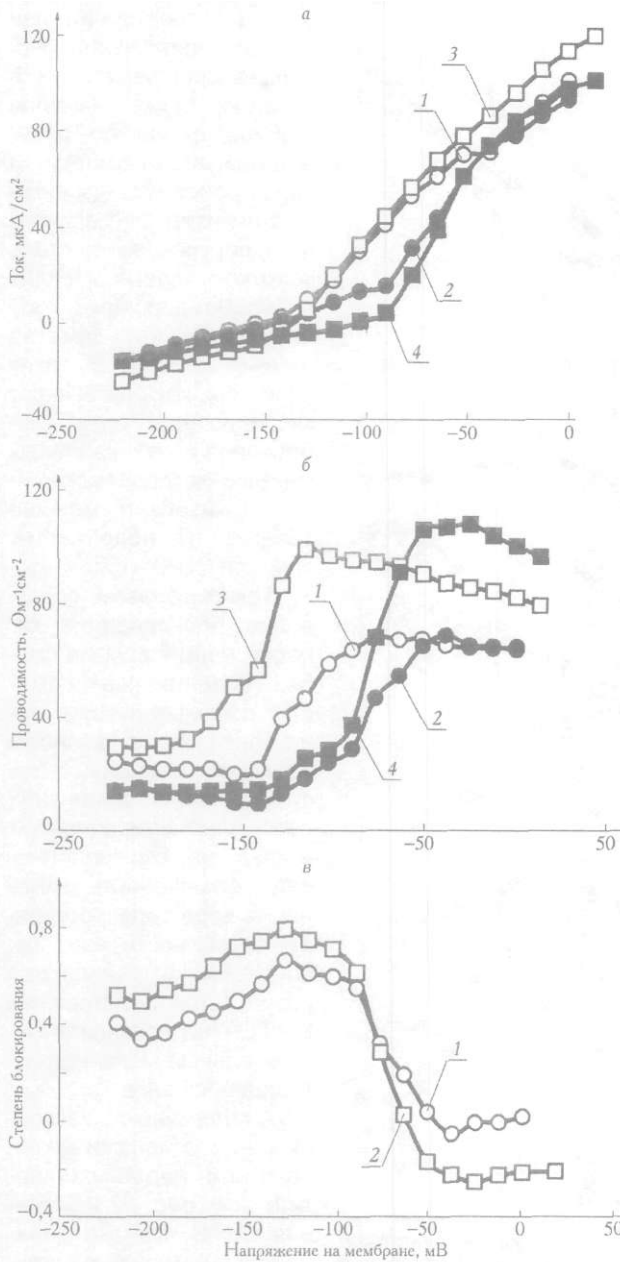


Рис. 2. Модификация на потенциалзависимости калиевых каналов выходящего выпрямления стационарного тока плазматической мембраны ионами цезия:

а – стационарные вольт-амперные характеристики, б – зависимости проводимости мембраны от напряжения, полученные в следующих растворах (ммоль/л): 1 – 0,1 KCl+0,1 CaCl<sub>2</sub>, 2 – тот же раствор + 1,0 CsCl, 3 – 0,5 KCl+0,1 CaCl<sub>2</sub>, 4 – тот же раствор + 1,0 CsCl; в – относительная степень блокирования каналов, полученная из зависимостей (б) как отношение разности исходной проводимости и в присутствии ипрбз к исходной; 1 – на фоне 0,1 KCl+0,1 CaCl<sub>2</sub>, 2 – с увеличенным до 0,5 содержанием калия

словами, при наличии цезия в среде с наружной стороны мембраны блокируется только ток, направленный внутрь клетки. В то же время сопоставление СВАХ и активационных кривых (см. рис. 2 а и 2 б) показывает, что практически все снижение проводимости в присутствии цезия происходит в области напряжения от -50 до -100 мВ, именно там, где на СВАХ ток имеет выходящее направление, т. е. там, где собственно блокирование каналов еще не началось. Отсюда следует, что, как и в случае с ТЭА, сдвиг активационных кривых в присутствии цезия не связан со снижением проводимости каналов вследствие их блокирования.

Отметим, что не только блокаторы, но и проникающий катион, как видно из зависимостей на рис. 1 б и 2 б, при увеличении концентрации вызывает сдвиг активационной кривой в направлении гиперполяризации, сопровождающийся возрастанием проводимости. Ранее нами было показано, что повышение уровня калия в среде активирует так называемые «медленные» калиевые каналы [4]. Здесь же мы не наблюдали активации каналов стационарного тока («быстрых»), зато зафиксировали выраженный сдвиг активационных кривых без заметного изменения их крутизны.

Известно, что положение активационных кривых калиевых каналов на оси напряжений в значительной степени определяется величиной поверхностного потенциала мембраны, создаваемого фиксированными отрицательными зарядами, локализованными вблизи входа в эти каналы со стороны наружного раствора [4, 7, 8]. Показано, что увеличение ионной силы раствора за счет катионов вызывает экранирование и частичную компенсацию заряда поверхностных

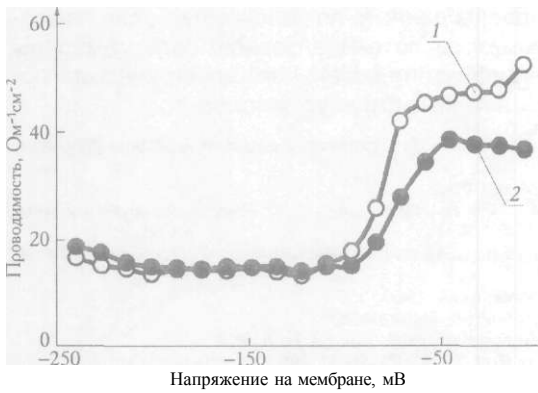


Рис. 3. Потенциалзависимость проводимости плазматической мембраны при изменении концентрации кальция в среде (ммоль/л).  
1 - раствор 0,1 KCl+0,1 CaCl<sub>2</sub>, 2 - после добавления 1,0 CaCl<sub>2</sub>

Полученные результаты (см. рис. 3) показывают, что увеличение содержания кальция действительно влечет за собой сдвиг активационных кривых, но величина его существенно меньше, чем при таком же возрастании уровня цезия.

Усредненные данные по положению и сдвигам активационных кривых приведены в таблице. Видно, что сдвиг, индуцированный кальцием, во всех случаях наименьший. В то же время изучение поверхностных потенциалов, созданных фиксированными на мембране зарядами [7, 8], показывает, что двухвалентные катионы снижают величину сдвига так же, как и одновалентные, но при концентрациях в десятки раз меньших. Таким образом, очевидно, что и в случае одновалентных катионов ТЭА и цезия эффект сдвига активационных кривых за счет изменения поверхностного потенциала пренебрежимо мал.

**Числовые значения, характеризующие положение активационных кривых калиевых каналов на оси напряжений**

Составы среды, ммоль/л	0,1 K <sup>+</sup> +0,1 Ca <sub>2</sub> <sup>+</sup>		0,5 K <sup>+</sup> +0,1 Ca <sub>2</sub> <sup>+</sup>	
	V <sub>1/2</sub> , мВ	V, мВ	V <sub>1/2</sub> , мВ	V, мВ
Контроль +3,0 ТЭА	-112±1,6		36±7,9	
	-76±13,8	-72,8±8,7		
Контроль +1,0 Cs	-92±6,9	26,8±6,6	-116±11,4	39±6,6
	-65,2±8,1		-77,4±10,4	
Контроль +1,0 Ca	-90±4,2	6,7±3,2	-113,8±8,4	23,8±3,7
	-83,3±9,8		-90±19,9	

Примечание. V<sub>ц</sub> - напряжение на мембране, при котором активирована половина каналов, AV - сдвиг активационной кривой, измеренный как изменение величины V<sub>ц</sub>.

Согласно данным таблицы, величины всех сдвигов возрастают с ростом уровня калия в среде. В то же время в присутствии ТЭА и цезия добавление калия не вызывает достоверных сдвигов активационных кривых, хотя в отсутствие этих катионов средний сдвиг составляет величину порядка 20 мВ. Отметим, что проводимость мембраны увеличивается с ростом концентрации калия и в присутствии блокаторов (см. рис. 1 б, 2 б). Это означает, что блокируется только часть каналов.

Таким образом, очевидно, что сдвиги активационных кривых обусловлены изменением величины электрического поля в месте расположения сенсора воротного механизма канала. Ионы, попадая в канал, своим полем вызывают эти изменения. Причем блокаторы, которые в канал проникают, но не проходят насквозь, инициируют локальные изменения поля, прямо противоположные тем, которые индуцируют в среднем более равномерно распределенные по длине канала ионы калия. Отметим, что эффект калия проявляется во всех открытых каналах, где он находится, а блокаторы воздействуют на расположенные в непосредственной близости от заблокированных открытые каналы.

Таким образом, в работе представлены данные, показывающие один из возможных механизмов регуляции параметров потенциалзависимости мембраны ионами среды, который состоит в модификации локального электрического поля в месте расположения потенциалзависимых структур каналов.

1. Bergmann, W. Nutritional disorders of plants - development, visual and analytical diagnosis. Heidelberg, 1992.
2. Tester, M. // New Phytol. 1990. Vol. 114. P. 305.
3. Юрин, В.М., Иванченко, В.М., Галактионов, С.Г. Регуляция функций мембран растительных клеток. Мн., 1979.
4. Юрин, В.М., Соколик, А.И., Кудряшов, А.П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Мн., 1991.
5. Костюк, П.Г. Микроэлектродная техника. Киев, 1960.
6. Hille, B. Ionic channels of excitable membranes, Sunderland, 1992.
7. Sokolik, A.I., Yurin, V.M. //J. Membr. Biol. 1986. Vol. 89. № 6. P. 9.
8. Kiss, T., Osipenko, O.N. //Pharm. Rev. 1994. Vol. 46. P. 245.

Поступила в редакцию 11.02.05.

**Жанна Валерьевна Высоцкая** - младший научный сотрудник НИЛ физиологии растительной клетки.

**Анатолий Иосифович Соколик** - кандидат биологических наук, заведующий НИЛ физиологии растительной клетки.

**Владимир Михайлович Юрин** - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений.

УДК 581.13

Ж.В. ВЫСОЦКАЯ, А.И. СОКОЛИК, В.М. ЮРИН

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕХАНИЗМОВ ИОННОГО ТРАНСПОРТА НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК: КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ И ЭЛЕКТРОГЕННАЯ ВОДОРОДНАЯ ПОМПА

On the model object - Characeae cell *Nitella flexilis* - it was shown, that the main ion transport mechanisms, such as electrogenic proton pump and inward and outward rectifying potassium channels, influence each other in an essential extent. As a result of their common activity the adoptive response of the cell on medium varying are effectively realized.

Существование растительного организма в непрерывно меняющихся условиях внешней среды предполагает наличие большого числа регуляторных цепей, обеспечивающих согласованное протекание основных жизненных реакций с необходимыми скоростями. Процессы роста и развития добавляют сюда еще целый ряд путей регуляции, отвечающих на внутренние стимулы. Во всем этом большом круге явлений и процессов немалое место занимает одна из существенных функций плазматических мембран - транспорт ионов между клеткой и средой, реализация которой обеспечивает один из важнейших процессов в растениях - минеральное питание. Для клетки - это поддержание ионного гомеостаза цитоплазмы и необходимые изменения притока тех или иных ионов в различные фазы клеточного цикла. Для всего растения в целом характерны специфика ион-транспортных процессов и их регуляции для мембран клеток, составляющих различные органы и ткани, а также видовая и сортовая специфичность. В частности, взаимодействие механизмов ионного транспорта является основой работы замыкающих клеток устьиц, где выявлен ряд факторов, опосредующих это взаимодействие, например, цитозольные - уровень АТФ, сигнальные цепи с участием кальция; реакция на освещение и т. д. [1].

В настоящей работе рассматривается один из возможных способов осуществления такого взаимодействия, когда совокупность механизмов ионного транспорта на плазмалемме рассматривается как система, в которой отдельные компоненты - ионные каналы, неселективная утечка,  $H^+$ -помпа - связаны между собой мембранным потенциалом (внутримембранным полем), в создании которого каждый из них принимает участие. Здесь существенную роль играет взаимная локализация конкретных механизмов на плазмалемме, когда начинает сказываться неоднородность электрического поля по поверхности мембраны [2]. Это может значительно расширить регуляторные возможности всей