

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

системы и особенно ее важнейших компонентов - протонной АТФазной помпы и калиевых каналов.

Ранее нами были зарегистрированы факты, когда активация помпы снижала проводимость наружу выпрямляющих калиевых каналов [6] и, возможно, стимулировала проводимость каналов внутрь направленного выпрямления [7]. Было выдвинуто предположение, что основой взаимодействия механизмов ионного транспорта может служить потенциалзависимость их основных характеристик, а электрическое поле в местах локализации соответствующих молекулярных комплексов каналов и помпы может изменяться за счет суперпозиции локальных полей, создаваемых этими механизмами [8]. Таким образом, задача настоящей работы - выявить характер и особенности влияния как состояния каналов на помпу, так и наоборот - воздействия степени активации помпы на параметры каналов.

### Материал и методика

В качестве объекта в работе были использованы клетки пресноводных харовых водорослей *Nitella flexilis* L. Agardz, которые культивировались в лабораторных условиях. Установлено, что основные черты ион-транспортных механизмов, изученных на плазмалемме клеток харовых водорослей [3], клеток и протопластов различных видов высших растений [4] и, наконец, корневых волосков [5], схожи между собой. Клетки *Nitella flexilis* имеют дополнительные преимущества, позволяя создать условия, когда тот или иной ион-транспортный механизм является доминирующим. Так, выдерживание клеток в темноте в течение 2-3 суток практически полностью ингибирует светозависимую электрогенную АТФазную водородную помпу, позволяя изучать механизмы пассивного транспорта. Наоборот, освещение предварительно выдержанных в темноте клеток активирует помпу так, что ее проводимость может стать доминирующей, и оказывается возможным ее адекватное вычленение [3].

Эксперименты проводили *in vivo* на нативной плазмалемме, когда сохраняется целостность всех возможных путей регуляторных взаимодействий. Ион-транспортные механизмы изучали главным образом посредством регистрации электрофизиологических характеристик плазмалеммы микроэлектродным методом с применением фиксации напряжения на ней; получали мгновенные и стационарные вольт-амперные характеристики плазмалеммы (МВАХ и СВАХ соответственно) [3]. В качестве основной среды использовали искусственную прудовую воду (ИПВ) состава (моль/л):  $10^{-4}$  KCl,  $10^{-3}$  NaCl,  $2 \cdot 10^{-4}$  CaCl<sub>2</sub>, pH подерживали на уровне 7,2, температуру -  $20 \pm 2$  °C.

### Результаты и их обсуждение

Были получены МВАХ плазматической мембраны при напряжении -160 мВ, когда проводимость мембраны определяется внутрь выпрямляющими калиевыми каналами (ВВКК) [3] как при нормальной, так и при повышенной концентрации калия в среде (рис. 1 а, б). Видно, что освещение существенно увеличивает проводимость и сдвигает потенциал нулевого тока в направлении гиперполяризации, ближе к значению электродвижущей силы помпы [3]. Также видно, особенно при повышенном уровне калия, что часть этой проводимости блокируется ионами тетраэтиламмония (ТЭА). Это однозначно свидетельствует о том, что часть индуцированной светом проводимости определяется калиевыми каналами. Исходя из экспериментально измеренных величин проводимости мембраны, расчетным путем можно оценить проводимости отдельных компонент ионного транспорта.

В отсутствие освещения общая проводимость состоит из суммы проводимостей каналов и утечки, при освещении добавляется проводимость помпы и дополнительно - каналов: в присутствии ТЭА часть (40 %) каналов блокирована, а помпа дополнительно активируется. Соответствующая система уравнений для обеих концентраций калия имеет единственное решение, согласно которому блок каналов существенно увеличивает проводимость помпы, а ее активация приводит к возрастанию проводимости каналов.

Для более детального изучения взаимовлияния наружу выпрямляющих калиевых каналов (НВКК) и помпы были получены СВАХ плазматической мем-

браны в присутствии блокаторов каналов ТЭА, цезия и кальция. Типичные кривые для случая цезия показаны на рис. 2. Здесь хорошо видны все основные эффекты. Прежде всего активация помпы при освещении существенно снижает максимальную проводимость каналов, заметно сдвигая сами кривые по оси напряжения в направлении деполяризации. Кроме того, при добавлении блокаторов происходит дополнительная активация помпы, что заметно увеличивает разность между световой и темновой проводимостями мембраны.

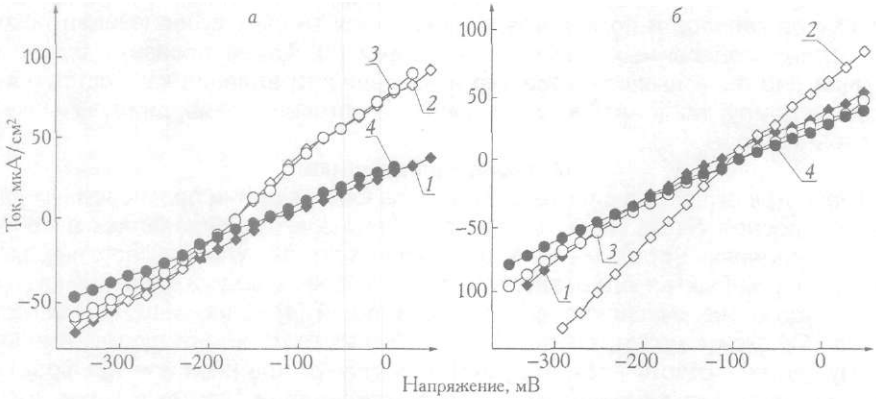


Рис. 1. Типичные мгновенные вольт-амперные характеристики плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis*.

Кривые получены при фиксации напряжения на уровне -180 мВ: а – в растворе ИПВ, б – при повышении уровня  $K^+$  до  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л; 1 – при отсутствии освещения, 2 – в условиях освещения, 3 – при добавлении  $3 \cdot 10^{-3}$  моль/л ТЭА на свету, 4 – при добавлении  $3 \cdot 10^{-3}$  моль/л ТЭА в темноте

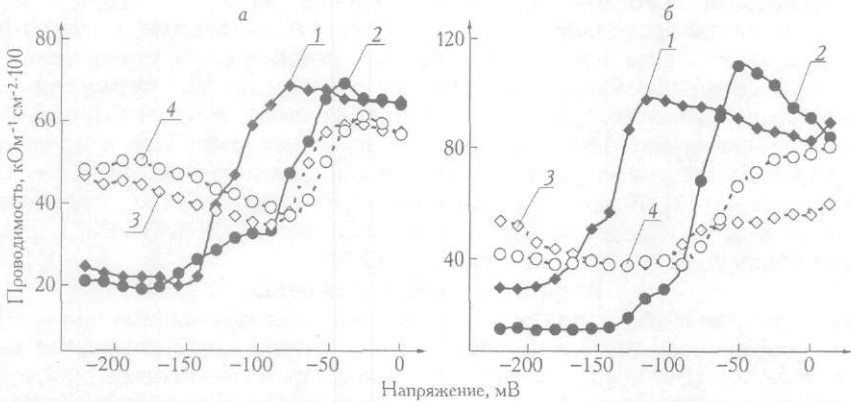


Рис. 2. Типичные стационарные вольт-амперные характеристики плазматической мембраны в условиях инaktivированной (кривые 1 и 2) и активированной светом  $H^+$ -помпы (кривые 3 и 4) в присутствии блокатора калиевых каналов  $10^{-3}$  моль/л  $Cs^+$  (кривые 2 и 4); а – ИПВ, б – повышенный до  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л уровень  $K^+$

Усредненные количественные характеристики приведены в табл. 1-3. На основе представлений [8] можно провести численный анализ полученных параметров. Разностная (световая минус темновая - с-т) проводимость мембраны при напряжении порядка -200 мВ складывается из проводимости помпы и индуцированной проводимости ВВКК. При добавлении блокатора проводимость помпы изменяется в  $K_a$  раз, а каналов - в  $K_5$ . При повышении уровня калия проводимость помпы становится равной  $G_{p2}$ , а каналов увеличивается в  $K_k$  раз. Таким образом, можно записать систему четырех уравнений с четырьмя неизвестными, которая имеет единственное решение:

$$\begin{aligned} G_{с-т} \alpha_i &= G_{p1} + D G_k, \\ G_{с-т} \alpha_i \beta_i &= K_a G_{p1} + K_5 A G_k, \\ G_{с-т} \alpha_{0.5} &= G_{p2} + K, A G_k, \\ G_{с-т} \alpha_{0.5} \beta_i &= K_a G_{p2} + K_k K_6 L G_k. \end{aligned}$$

Подставив соответствующие экспериментальные значения из левой части табл. 1 и решив систему уравнений, получим значения, приведенные в правой части той же таблицы. Отметим, что во всех трех случаях активация помпы индуцировала возрастание проводимости ВВКК, и величины этого возрастания близки между собой. Блок каналов дополнительно активирует помпу, причем для более эффективного блокатора цезия эффект существенно больше. В то же время возрастание проводимости каналов с ростом уровня калия заметно ингибирует помпу во всех трех случаях.

Таблица 1

**Исходные данные и результаты количественного анализа разностной (световая минус темновая) проводимости плазматической мембраны при действии блокаторов калиевых каналов и ионов кальция**

Блокатор	Экспериментальные данные				Результаты расчета			
	$1 \cdot 10^{-4}$ моль/л		$5 \cdot 10^{-4}$ моль/л		$K_s$	$G_i$	$G_m$	G кс.
G c-т	G л-т) fin	G c-т	G л-т) fin					
Cs*	20,1 ± 1,8	32,0 ± 2,1	24,9 ± 2,1	26,8 ± 1,9	2,5	12,5	9,0	7,6
ТЭА*	23,0 ± 1,4	2,2,5 ± 1,3	16,2 ± 1,3	14,8 ± 1,5	1,1	19,4	11,0	2,6
Ca^	22,0 ± 2,0	20,8 ± 1,5	18,5 ± 1,6	17,3 ± 1,2	0,96	17,6	9,8	4,4

Примечание. В расчете принимали двукратное увеличение проводимости каналов при возрастании концентрации калия в среде от 1 до  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л (значение параметра  $K_s = 2$ ) и степень блокирования проводимости каналов цезием, ТЭА и кальцием (параметр  $K_6$ ) соответственно 0,2, 0,7 и 0,95. Проводимость  $G$   $\kappa\text{Ом}^{-1} \text{см}^{-2} \cdot 100$  для удобства. Концентрации цезия, ТЭА и кальция составляли  $10^{-3}$ ,  $3 \cdot 10^{-3}$  и  $10^{-3}$  моль/л соответственно.

Таблица 2

**Максимальная проводимость наружу выпрямляющих калиевых каналов в темноте и при активации протонной помпы на разном кальциевом фоне,  $\kappa\text{Ом}^{-1} \text{см}^{-2} \cdot 100$**

Параметры мембраны	$G_i$		$G_m$	
	$G_i$	$G_i$	$G_m$	$G_m$
Контроль	67,4 ± 1,8	57,2 ± 2,3	76,6 ± 3,7	61,8 ± 5,1
С добавлением $10^{-3}$ моль/л $\text{Ca}^{2+}$	46,1 ± 3,4	52,5 ± 2,9	54,8 ± 4,1	59,3 ± 3,3

Таблица 3

**Параметры расположения активационной кривой калиевых каналов наружу направленного выпрямления на оси напряжения при варьировании условий освещения и в присутствии в среде различных блокаторов каналов**

Составы растворов	$K_s$ $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л						
	$V_{1/2 \text{ T}}$ , мВ	$V_{1/2 \text{ c}}$ , мВ	$V_{1/2 \text{ T}}$ , мВ	$V_{1/2 \text{ c}}$ , мВ			
Cs+	Контроль	-92,0 ± 3,8	-50,0 ± 1,8	42,0 ± 2,8	-116,4 ± 7,9	-61,7 ± 5,7	54,7 ± 7,7
	Блокатор	-65,2 ± 4,7	-45,4 ± 3,9	19,8 ± 4,1	-77,4 ± 6,7	-48,3 ± 6,1	29,1 ± 5,4
ТЭА*	Контроль	-112,5 ± 5,8	-49,5 ± 4,3	63,0 ± 5,2	-125,0 ± 8,9	-63,2 ± 4,8	61,8 ± 8,1
	Блокатор	-76,0 ± 5,1	-41,2 ± 5,1	34,8 ± 4,7	-72,8 ± 7,1	-50,0 ± 6,3	22,8 ± 5,2
Ca <sup>2+</sup>	Контроль	-98,9 ± 6,2	-63,0 ± 4,4	35,9 ± 6,8	-115,5 ± 10,3	-74,0 ± 4,2	41,5 ± 6,4
	Блокатор	-81,5 ± 4,9	-60,0 ± 5,2	21,5 ± 6,2	-90,0 ± 9,4	-70,5 ± 6,6	19,5 ± 3,9

Примечание. Концентрации цезия, ТЭА и кальция составляли  $10^{-3}$ ,  $3 \cdot 10^{-3}$  и  $10^{-3}$  моль/л соответственно.

Таким образом, как показывают полученные данные, помпа и ВВКК взаимодействуют практически напрямую путем суперпозиции своих локальных электрических полей, и наблюдаемые эффекты обусловлены характером потенциала зависимости помпы и каналов, причем те и другие активируются при гиперполяризации мембраны. Взаимодействие помпы и ВВКК представляет более сложную картину. Данные табл. 2 показывают, что активация помпы светом вызывает достоверное снижение максимальной проводимости каналов на 15-20 % (без учета утечки) для низкого и высокого уровня калия. В то же время повышение уровня кальция в среде ингибирует ту же проводимость на 30 % независимо от уровня калия в условиях инактивированной помпы и практически не оказывает никакого воздействия при активации помпы светом.

Существенную информацию дают параметры расположения активационных кривых ВВКК на оси напряжения (см. табл. 3). Видно, что при активированной помпе добавление в среду кальция не вызывает смещения кривых по оси напряжений, тогда как в условиях инактивированной помпы этот сдвиг составляет 20-25 мВ. Учитывая, что эффект смещения кривых, вызванный кальцием, как показано ранее, обусловлен экранированием и нейтрализацией поверхностных фиксированных анионов [3], можно заключить, что при активации помпы этот

заряд нейтрализуется выбрасываемыми ионами водорода, причем создаваемое помпой локальное подкисление достаточно сильное. Отметим, что сама по себе активация помпы сдвигает кривую на 50-60 мВ и снижает максимальную проводимость каналов, однако в меньшей степени, чем если бы эффекты были обусловлены только поверхностным зарядом.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу эффекта локального подкисления наружного раствора вблизи фиксированных зарядов, но большая величина смещения кривых предполагает участие в этом и прямой суперпозиции локальных полей помпы и каналов. Результаты табл. 3 показывают, что не только кальций, но и блокаторы калиевых каналов цезий и ТЭА снижают величину смещения кривой, индуцированного активацией помпы. Вместе с тем блокаторы сдвигают кривые на значительно большую величину при неактивной помпе, чем при активной.

Таким образом, полученные результаты показывают существенное взаимовлияние электрогенной водородной помпы и калиевых каналов как входящего, так и выходящего выпрямления, причем выявленные эффекты имеют физиологическое значение. Так, снижение уровня калия в среде, вызывая уменьшение проводимости каналов, дополнительно активирует помпу, которая гиперполяризует плазматическую мембрану. Открываются каналы внутрь направленного выпрямления, по которым калий дополнительно входит в клетку. При этом проводимость каналов, по которым калий выходит (НВКК), снижается. В результате происходит ускорение входа калия в клетку в ответ на снижение его уровня в среде.

1. Hoth, S., Hedrich, R. // JBC. 2004. Vol. 274. P. 11599.
2. Соколик, А. И. // Докл. НАН Беларуси. 2000. Т. 44. № 2. С. 89.
3. Юрин, В. М., Соколик, А. И., Кудряшов, А. П. Регуляция ионного транспорта через мембрану растительных клеток. Мн., 1991.
4. Hedrich, R., Schroeder, J. I. // Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 1989. Vol. 40. P. 539.
5. Грабов, А. М. // Физиология растений. 1990. Т. 37. Вып. 2. С. 324.
6. Соколик, А. И., Высоцкая, Ж. В., Крытынекая, Е. Н., Юрин, В. М. // Материалы междунар. науч. конф. «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды». Мн., 2000. С. 429.
7. Высоцкая, Ж. В., Соколик, А. И., Юрин, В. М. // Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды: Материалы II Междунар. науч. конф., Минск - Нарочь, 22-26 сент. 2003 г. Мн., 2003. С. 109.
8. Sokolik, A. I., Visotskaya, Zh., Krytynskaya, E., Yurin, V. // Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 92. Plant Nutrition. Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research. 2001. P. 200.

Поступила в редакцию 15.03.05.

**Жанна Валерьевна Высоцкая** - младший научный сотрудник НИЛ физиологии растительной клетки при кафедре физиологии и биохимии растений,

**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 587.352.4

А. П. КУДРЯШОВ, В. М. ЮРИН

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АММОНИЙНОГО АЗОТА В ВАКУОЛЯРНОМ СОКЕ КЛЕТОК *NITELLA FLEXILIS* С АКТИВИРОВАННОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМОЙ АММОНИЯ\*

The ammonium concentration in the vacuoles of single internodal cells of Characeae alga *Nitella flexilis* was carried out. The ammonium concentration in vacuoles of internodal cells with inactivated ammonium transport system was sufficiently high ( $10^{-2} M$ ) and it was registered for sure. The fluctuation of vacuolar concentration of  $NH_4^{+}$  in the cells with activated ammonium transport system was not a result of inaccuracy of analysis, because the injection of  $NH_4Cl$  into the cell vacuole by means micro injectors doesn't lead to inactivation of the ammonium transport system. Probably the functional state of plasmalemma ammonium transport system is regulated by somewhat different endogenous factors, but not by intracellular concentration of  $NH_4$ .

\* Авторы статьи - сотрудники кафедры физиологии и биохимии растений.