

КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ И ХАОТИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА И pH В ПРИМЕМБРАННОЙ ОБЛАСТИ КЛЕТКИ ХАРОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Лаврова А. И., Плюснина Т. Ю., Украинец А. В.,
Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б.

(Россия, Москва)

В данной работе развивается предложенная ранее модель [1] потенциалозависимого протонного переноса через мембрану клетки водоросли Chara. В предыдущем варианте модели [1] в качестве переменных рассматриваются концентрация протонов снаружи клетки и трансмембранный потенциал. В предлагаемом варианте модели вводится новая переменная — концентрация протонов в цитоплазме. При исследовании модели получены колебательная и хаотическая динамика трансмембранного потенциала. Обсуждается физиологическая роль наблюдаемых режимов.

Введение. Для исследования динамики трансмембранного потенциала в растительных клетках используются одноклеточные водоросли *Chara corallina* и *Nitellopsys abtusa*. Эти клетки являются удобным объектом для изучения различных электрофизиологических явлений. Они обладают большими размерами (диаметром 0.6 – 1.0 мм и длиной 40 – 80 мм), и имеют более простое строение по сравнению с клетками высших растений или животных. Физиология этих клеток достаточно хорошо исследована и найдено.

Имеются многочисленные экспериментальные данные о нелинейных режимах изменения мембранного потенциала и pH вблизи мембраны [2–12]. Распределения потенциала и pH могут характеризоваться как пространственной неоднородностью [2–7], так и колебательной динамикой во времени [8, 9]. Колебания потенциала и pH обычно измеряются в выбранной точке вблизи

внешней стороны мембраны [8, 9]. Колебания могут быть как затухающими [8, 9], так и незатухающими [10, 11] период составляет 2–3 мин. [9–11] а также носить квази-хаотический характер [9]. Колебания могут возникать как спонтанно [8], так и при внешних воздействиях, например, при изменении интенсивности освещения [9] или действии электрических стимулов [12].

Изменения трансмембранного потенциала и рН снаружи клетки происходят в основном за счет работы протонной АТФ-азы плазматической мембраны, которая переносит протоны из цитоплазмы во внешнюю среду, и зависят от интенсивности света. Экспериментально было показано, что рН цитоплазмы является одним из регуляторов протонной АТФ-азы [13, 14, 15]. По-видимому, цитоплазматическое рН — один из «индикаторов» процессов, происходящих в хлоропластах на свету, так как при освещении происходит уменьшение концентрации протонов в цитоплазме в результате их оттока в хлоропласты [16, 17]. Для того, чтобы связать процессы внутри и снаружи клетки в ранее предложенную модель была введена третья переменная — рН цитоплазмы.

Предложенная в данной работе модель потенциалозависимого протонного переноса качественно описывает экспериментально найденные нелинейные режимы. С помощью модели исследуется динамика потенциала и рН снаружи и внутри клетки в зависимости от интенсивности света.

Модель. Для исследования колебательных и хаотических режимов мы развили модель потенциалозависимого протонного переноса через плазмалемму, разработанную нами ранее [1]. Для получения конкретного вида потока протонов, была использована кинетическая схема работы транспортной системы, включающей в себя потоки наружу клетки через АТФ-азу, а также поток протонов через каналы (рис. 1а). Чтобы получить выражение для изменения концентрации протонов снаружи и внутри клетки за счет работы транспортной системы был применен метод Кинга-Альтмана (метод графов).

Модель представляет собой систему трех обыкновенных дифференциальных уравнений. Переменными модели являются

концентрация протонов вблизи внешней стороны мембраны (h_o) и трансмембранный потенциал (ψ) и концентрация протонов в цитоплазме (h_i). Система уравнений имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{dh_o}{d\tau} &= J_{ATPase} - \gamma h_o, \\ \frac{d\psi}{d\tau} &= -J_{ATPase} z - J_l, \\ \frac{dh_i}{d\tau} &= -J_{ATPase} - J_{Chl}. \end{aligned}$$

Первое уравнение описывает изменение концентрации протонов вблизи внешней стороны мембраны. Выражение

$$J_{ATPase} = \frac{h_i h_o e^{\psi} K_3}{(1 + h_o)^2 e^{2\psi} (2 + K_3 h_i) + (1 + h_i)^2 K_2 h_o}$$

описывает изменение

концентрации протонов за счет работы транспортной системы. В ходе вывода было сделано допущение о том, что, процессы переноса протонов с одной стороны мембраны на другую, происходят гораздо медленнее по сравнению с процессами присоединения и отщепления протонов (рис. 1а). Для описания общего изменения концентрации протонов снаружи мембраны клетки учитывались также отток протонов из примембранной области в среду γh . Второе уравнение описывает изменение трансмембранного потенциала за счет тока протонов через транспортную систему $J_{ATPase} z$ и пассивного тока утечки $J_l = g(\psi - \psi_0)$. Третье уравнение описывает изменение концентрации протонов в цитоплазме за счет потоков через транспортную систему J_{ATPase} и через мембрану хлоропластов

$$J_{Chl} = \frac{(ah_i - 1)me^{-l}}{1 + h_i b}.$$

Выражение для потока J_{Chl} выводилось со-

гласно кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 1б).

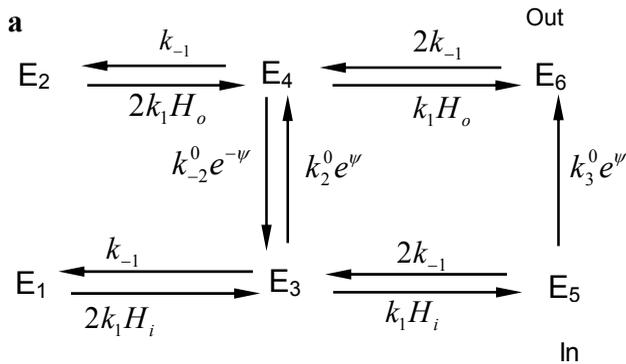


Рис. 1а. Кинетическая схема работы транспортной системы. Out — внешняя сторона мембраны, In — внутренняя сторона мембраны, H_{in} — концентрация протонов в цитоплазме, H_{out} — концентрация протонов вблизи внешней стороны мембраны. $E_1, E_2, E_3, E_4, E_5, E_6$ — конформационные состояния транспортной системы. $k_2^0 e^{\psi}, k_2^0 e^{-\psi}, k_3^0 e^{\psi}$ — потенциалозависимые константы переноса протона через мембрану

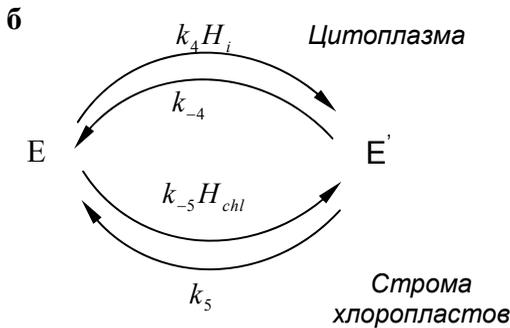


Рис. 1б. Кинетическая схема работы транспортера, осуществляющего перенос протонов из цитоплазмы в строму хлоропластов: H_i — концентрация протонов в цитоплазме, H_{chl} — концентрация протонов в строме хлоропластов. T — свободный транспортер (без субстрата) T_1 — с субстратом. k_4, k_{-4}, k_5, k_{-5} — константы переноса протона из цитоплазмы в строму хлоропластов

Безразмерные переменные модели: $h_o = \frac{[H_{out}]}{K_1}$ — концентрация протонов вблизи внешней стороны мембраны, $\psi = \frac{\varphi F}{2RT}$ — трансмембранный потенциал, $h_i = \frac{[H_i]}{K_1}$ — концентрация протонов в цитоплазме, $\tau = \frac{tk_{-2}[E_0]}{K_1}$ — время.

Параметры модели, выраженные через элементарные константы кинетической схемы и электрические характеристики мембраны:

$$K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}, \quad K_2 = \frac{k_{-2}^0}{k_2^0}, \quad K_3 = \frac{k_3^0}{2k_2^0}, \quad g = \frac{\tilde{g}K_1}{Ck_{-2}[E_0]}, \quad z = \frac{pF^2 K_1}{CRT},$$

$$\psi_0 = \frac{\varphi_0 F}{2RT}, \quad m = \frac{t_0 k_2^0 E_{Chl} k_{-4} k_{-5} H_{Chl}}{K_1 k_5 (k_{-4} + k_{-5} H_{chl} + k_5)}, \quad a = \frac{k_4 k_5 K_1}{k_{-4} k_{-5} H_{chl}},$$

$$b = \frac{k_4 K_1}{k_{-4} + k_{-5} H_{chl} + k_5}.$$

Здесь H_{chl} — концентрация протонов в строме хлоропластов. E_0 — полная концентрация всех состояний транспортера на плазматической мембране (моль · м⁻³). T_{chl} — полная концентрация всех состояний транспортера на мембране хлоропласта (моль · м⁻³). \tilde{g} — проводимость пассивных каналов (Ом⁻¹ · м⁻²), C — емкость мембраны (мкФ · м⁻²), p — диаметр клетки (м), φ_0 — потенциал покоя на плазматической мембране (В), R_i — сопротивление цитоплазмы (Ом · м). Константы k_1 (моль · с⁻¹ · м⁻³) и k_{-1} (с⁻¹) — характеризуют присоединение и отщепление протона, константы k_2 (с⁻¹), k_3 (с⁻¹) характеризуют перенос протона через мембрану во внешнюю среду за счет работы АТФ-азы, k_{-2} (с⁻¹) — перенос протонов в клетку через каналы (рис. 1а). k_4 , k_{-4} , k_5 ,

k_{-5} — константы переноса протона из цитоплазмы в строму хлоропластов.

С увеличением интенсивности света поток протонов через мембрану хлоропластов уменьшается и приходит к насыщению. Поэтому была введена зависимость потока протонов через мем-

брану хлоропластов от интенсивности света: $J_{chl} = J_{chl}^0 e^{\left(\frac{I-\beta}{I+\alpha}\right)}$, где

$I = \frac{\tilde{I}}{I_0}$. \tilde{I} — величина интенсивности света, которая меняется в

эксперименте. I_0 выбиралось таким образом, чтобы модельные результаты были количественно сопоставимы с экспериментальными данными, β, α - феноменологические параметры. [18].

Параметры модели оценивались в работе [19] по экспериментальным данным и соответствовали условиям освещения $\tilde{I} = 40 \text{ Вт/м}^2$.

Результаты. Для численного решения системы обыкновенных дифференциальных уравнений использовались пакеты программ DBSolve 7.0 и TRAX.

В интервале интенсивностей от 0.8495 до 0.86 (2.6 – 3.1 Вт/м²) наблюдается квази-хаотическая динамика (странный аттрактор, рис. 2 в,г) и при дальнейшем увеличении света до 0.9 (8 Вт/м²) устанавливается режим автоколебаний (предельный цикл). При увеличении интенсивности освещения от 2.206 до 2.218 (8 – 34 Вт/м²) колебания вновь теряют периодический характер, и устанавливается квази-хаотическая динамика (странный аттрактор). При $I = 2.21$ (35.2 Вт/м²) колебания вновь становятся периодическими (автоколебания малой амплитуды, рис.2д) и при дальнейшем увеличении интенсивности затухают (рис. 2е).

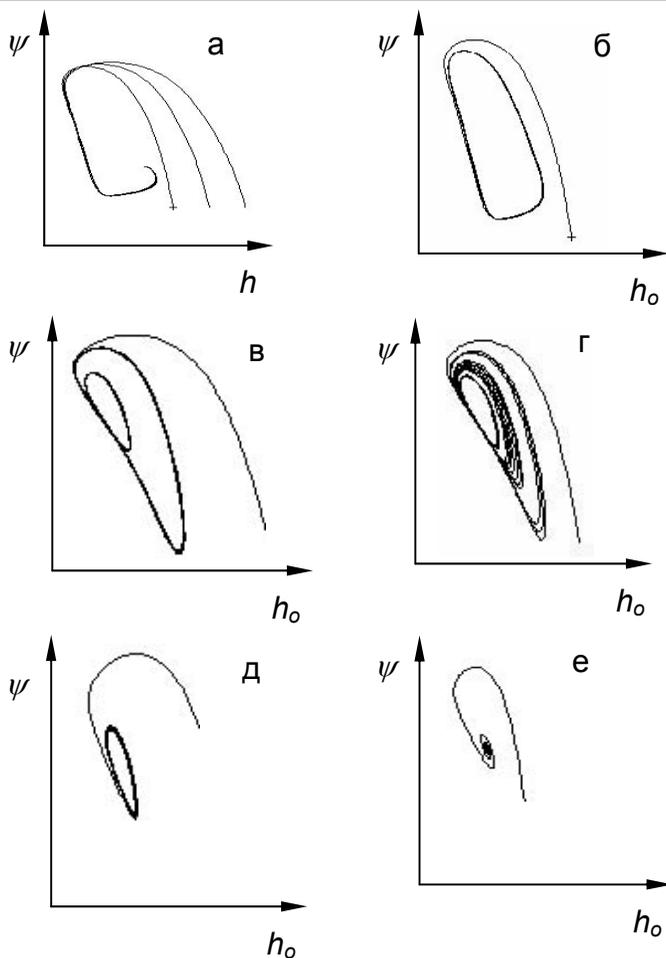


Рис.2. Фазовые портреты системы при изменении интенсивности света.
а) $I = 0$ (устойчивый узел), б) $I = 0.75$ (предельный цикл), в) $I = 0.8495$ (удвоение периода колебаний), г) $I = 0.85$ (странный аттрактор), д) $I = 2.21$ (предельный цикл), е) $I = 2.25$ (устойчивый фокус). Параметры системы: $z = 4$, $K_2 = 0.001$, $K_3 = 0.5$, $a = 0.0596$, $b = 0.01$, $m = 1.95$, $\gamma = 0.339$, $g = 1.81$, $\psi_0 = -0.21$, $\alpha = 1$, $\beta = 2.424$.

Была исследована динамика поведения трансмембранного потенциала и концентрации протонов снаружи и внутри клетки в зависимости от интенсивности света. Значения интенсивности света постепенно изменялись от 0 (свет выключен) до 2.24 (37 Вт/м² — интенсивность света в размерном виде). В темноте, $I = 0$, наблюдается устойчивое стационарное состояние (устойчивый узел, рис. 2а). При изменении интенсивности света от 0 до 0.75 (1 Вт/м²) возникают затухающие колебания рН и потенциала (устойчивый фокус). При изменении интенсивности света от 0.75 до 0.845 (1 – 2.6 Вт/м²) возникают автоколебания (рис. 2б, предельный цикл).

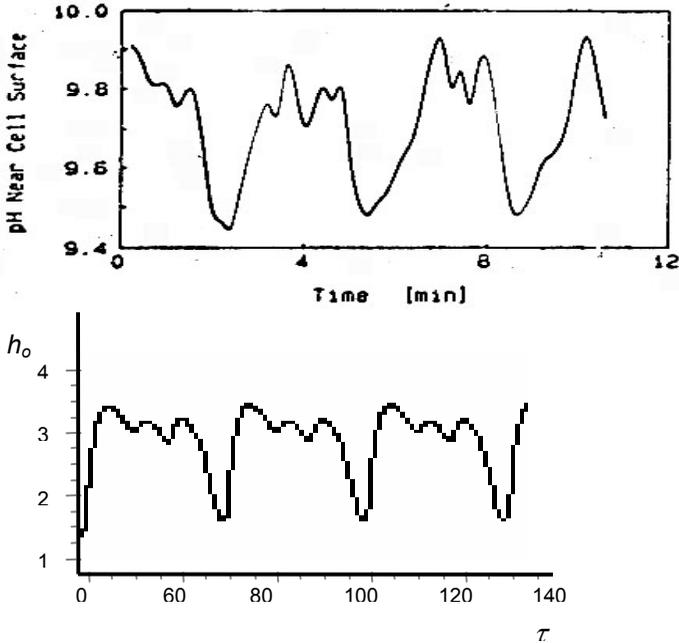


Рис. 3. Квази-хаотическая динамика рН снаружи клетки харовой водоросли. а) лабораторный эксперимент [9]; б) модельный эксперимент. Параметры системы: $z=4$, $K_2=0.001$, $K_3=0.5$, $a=0.0596$, $b=0.01$, $m=1.95$, $\gamma=0.339$, $g=1.81$, $\psi_0=-0.21$, $I=2.202$, $\alpha=1$, $\beta=2.424$.

Таким образом, при постепенном изменении интенсивности света наблюдается широкий спектр нелинейных режимов, включающий как периодические, так и непериодические (квази-хаотические) колебания.

В результате исследования кинетики потенциала и рН были найдены режимы, сходные с полученными экспериментальными данными (рис. 3а,б).

Обсуждение. В предыдущем варианте модели [1] мы исследовали динамику трансмембранного потенциала и рН снаружи клетки. Были получены периодические колебания этих величин, обусловленные обратной связью между трансмембранным потенциалом и рН снаружи клетки. В данной работе была введена третья переменная - рН цитоплазмы для того, чтобы учесть взаимосвязь процессов внутри и снаружи клетки. Введение третьей переменной позволило получить квази-хаотические режимы. Таким образом, рН цитоплазмы обуславливает возникновение нерегулярности в колебаниях рН снаружи клетки, что позволяет описать экспериментально наблюдаемые непериодические колебания (рис. 3а,б).

На основании полученных результатов можно сделать некоторые предположения о роли колебательных и хаотических режимов в физиологии клетки. Переход от темновых условий к условиям интенсивного освещения имеет сложный характер и состоит из нескольких этапов. Этапы перехода представляют собой колебательные и квази-хаотические режимы, которые, по-видимому, возникают тогда, когда клетке «необходимо» установить некий баланс процессов, нарушенный в результате внешних воздействий. То есть такие режимы являются переходными процессами, позволяющими живой системе при резком изменении внешних условий (например, при включении или выключении света) перейти в новое состояние не скачкообразно, что могло бы негативно отразиться на физиологических функциях клетки, а постепенно «подстраивая» все параметры к новому состоянию.

Авторы благодарят А.И.Лобанова, А.А.Полежаева, А.А.Булычева, А.А.Черкашина и за полезные обсуждения.

Работа поддержана гратом РФФИ, № 03-04-04000.

Список литературы:

1. Плюснина Т.Ю., Лаврова А.И., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. // Моделирование неоднородного распределения и колебаний трансмембранного потенциала и pH вблизи внешней стороны мембраны клетки водоросли *Chara corallina* // Биофизика. 2005. Т.50. №.3. С.492-497.
2. Lucas W. J., and Nuccitelli R. // HCO_3^- and OH^- transport across the plasmalemma of *Chara*. // *Planta*. 1980. V.150. P.120–131.
3. Lucas W.J. // Plasmalemma transport HCO_3^- and OH^- in *Chara corallina*: non-antiporter systems // *J. Exp. Bot.* 1976. V.27. P.19–31.
4. Lucas W.J., Dainty J. // Spatial Distribution of Functional OH^- Carriers Along a Characean Internodal Cell: Determined by the Effect of Cytochalasin B on $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ Assimilation // *J. Membrane Biol.* 1977. V.32. P.75–92.
5. Walker, N.A. Smith, F.A. // Circulating electric current between acid and alkaline zones associated with HCO_3^- assimilation in *Chara* // *J. Exp. Bot.* 1977. V.28. P.1190–1206.
6. Lucas W.J. // Mechanism of acquisition of exogenous bicarbonate by internodal celles of *Chara corallina* // *Plant Physiol.* 1982. V.156. P.181–192.
7. Leonetti M, Pelce P. // On the theory of pH bands in characean algae // *C.R. Acad. Sci. Paris*. 1994. V.317. P.801–805.
8. Fisahn J., Hansen U.P., Mikschl E. // Separate oscillations of the electrogenic pump and of a K-channel in *Nitella* as revealed by simultaneous measurement of membrane potential and of resistance // *J. Exp. Botany*. 1986. V.37. P.34–47.
9. Fisahn J., Lucas W. J. // Oscillations in extracellular current, external pH and membrane potential and conductance in the alkaline bands of *Nitella* and *Chara* // *J. Exp. Botany*. 1989. V.40. P.1185–1193.
10. Lefebvre J., Gillet C. // Periodic variations of the chloride electrochemical potential difference during spontaneous oscillations of the membrane potential in *Nitella* // *BBA*. 1970. V.103. P.575–578.
11. Hayashi H., Hirazawa K. // *Nitella* fluctuation and instability in the membrane potential near threshold // *Biophysical Journal*. 1980 V.31. P.31–44.
12. Boels H.D., Hansen U.P // Light and electrical current stimulate the same feed-back system in *Nitella* // *Plant and Cell Physiol.* 1982. V.23. P.343–346.
13. Morsomme P., Boutry M. // The plasma membrane H^+ -ATPase: sttucture, function and regulation // *BBA*.2000. V.1465. P.1–16.

14. Mimura T., Kirino Y. // Light-induced membrane hyperpolarization and adenine nucleotide levels in perfused characean cells. // *Plant Cell Physiol.* 1984. V.25. P.813–820.
15. Tazawa M. // Cell Physiological Aspects of the Plasma Membrane Electrogenic H⁺ pump // *J. Plant Res.* 2003. V.116. P.419–442.
16. Vanselow K.H., Kolbowski J., Hansen U-P. // Further evidence for the relationship between light-induced changes of plasmalemma transport and transthylakoid proton uptake // *J.Exp.Bot.* 1989. V.40. P.239–245.
17. Felle H., Bertl A. // Light-induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans* // *BBA.* 1986. V.848. P.176–182.
18. Булычев А.А., Черкашин А.А., Рубин А.Б., Мюллер С. // Распределение кислых и щелочных зон на поверхности клеток *Chara corallina* при стационарном и локальном освещении // *Физиология растений.* 2002. Т.49. С.805–813.
19. Takeuchi Y., U. Kishimoto, T. Ohkawa, and N. Kami-ike. // A kinetic analysis of the electrogenic pump of *Chara corallina*: II. Dependence of the pump activity on external pH // *J. Membrane Biol.* 1985. V.86. P.17–26.

**OSCILLATIVE AND CHAOTIC DYNAMIC OF THE
TRANSMEMBRANE POTENTIAL AND pH ALONG THE
CELL MEMBRANE OF CHARA ALGA**

**Lavrova A. I., Plusnina T.Yu., Ukrainetz A. V.,
Riznichenko G. Yu., Rubin A. B.**

(Russia, Moscow)

The model of potential dependent proton transfer through the cell membrane of Chara alga developed in [1] is considered. In the last version of the model we considered two variables: proton concentration near the surface cell and transmembrane potential. In present version we introduce the new variable — proton concentration in cytoplasm. Oscillative and chaotic dynamic of transmembrane potential was obtained in calculations. The physiological role of these patterns is discussed.