

## Нелинейная динамика трансмембранного потенциала и рН в примембранной области клетки харовых водорослей

А. И. Лаврова<sup>1,a</sup>, Т. Ю. Плюснина<sup>1</sup>, А. В. Украинец<sup>2</sup>,  
Г. Ю. Ризниченко<sup>1</sup>, А. Б. Рубин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
биологический факультет,  
119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет),  
141700, г. Долгопрудный Московской обл., Институтский переулок, д. 9

E-mail: <sup>a</sup>aurebours@googlemail.com

Получено 29 июня 2008 г.

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.

Ключевые слова: харовые водоросли, трансмембранный потенциал, рН, колебания

### Nonlinear dynamic of the transmembrane potential and pH along the cell membrane of *Chara* alga

A. I. Lavrova<sup>1</sup>, T. Yu. Plusnina<sup>1</sup>, A. V. Ukrainetz<sup>2</sup>, G. Yu. Ryznichenko<sup>1</sup>, A. B. Rubin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University, Biological Faculty, MSU, 1, building 12, GSP-1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Institutskii pereulok 9, 141700, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

**Abstract.** — 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.

Key words: *Chara* alga, transmembrane potential, pH, oscillations

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2009, vol. 1, no. 2, pp. 233–239 (Russian).

## 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.

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

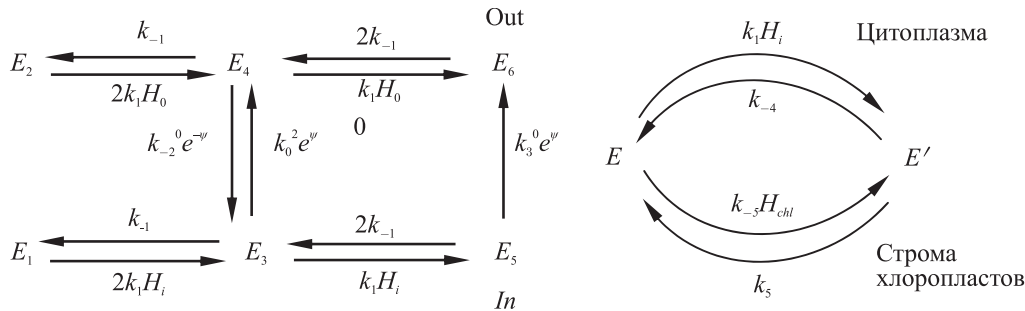
## Модель

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 АТФазу, 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 ( $\psi$ ) и концентрация протонов в цитоплазме ( $h_i$ ). Система уравнений имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{dh_o}{d\tau} &= J_{ATPase} - \gamma h_o, \\ \frac{d\psi}{d\tau} &= -J_{ATPase} z - J_l, \\ \frac{dh_i}{d\tau} &= -J_{ATPase} - J_{chl}. \end{aligned} \quad (1)$$

Первое уравнение описывает изменение концентрации протонов вблизи внешней стороны мембраны. Выражение  $J_{ATPase} = \frac{h_i^2 h_o e^\psi K_3}{h_i(1+h_o)^2 e^{2\psi} (2+K_3 h_i) + 2(1+h_i)^2 K_2 h_o}$  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  $\gamma h$ . Второе уравнение описывает изменение трансмембранного потенциала за счет тока протонов через транспортную систему  $J_{ATPase}$  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 мембрану хлоропластов  $J_{chl} = \frac{(ah_i - 1)me^{-I}}{1+h_i b}$ , где  $I = \frac{\tilde{I}}{I_0}$ .  $\tilde{I}$  — величина интенсивности света, которая меняется в эксперименте.  $I_0$  выбиралась таким образом, чтобы модельные результаты были сопоставимы с экспериментальными данными [18]. Выражение для потока  $J_{chl}$  выводилось согласно 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,  $\psi = \frac{\phi F}{2RT}$  — 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:

$$K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}, K_2 = \frac{k_{-2}^0}{k_2^0}, K_3 = \frac{k_3^0}{2k_2^0}, g = \frac{\tilde{g}K_1}{Ck_{-2}[E_0]}, z = \frac{pF^2 K_1}{CRT}, \psi_0 = \frac{\phi_0 F}{2RT}, m = \frac{t_0 k_2^0 E_{chl} k_{-4} k_{-5} H_{chl}}{K_1 k_5 (k_{-4} + k_{-5} H_{chl} + k_5)},$$

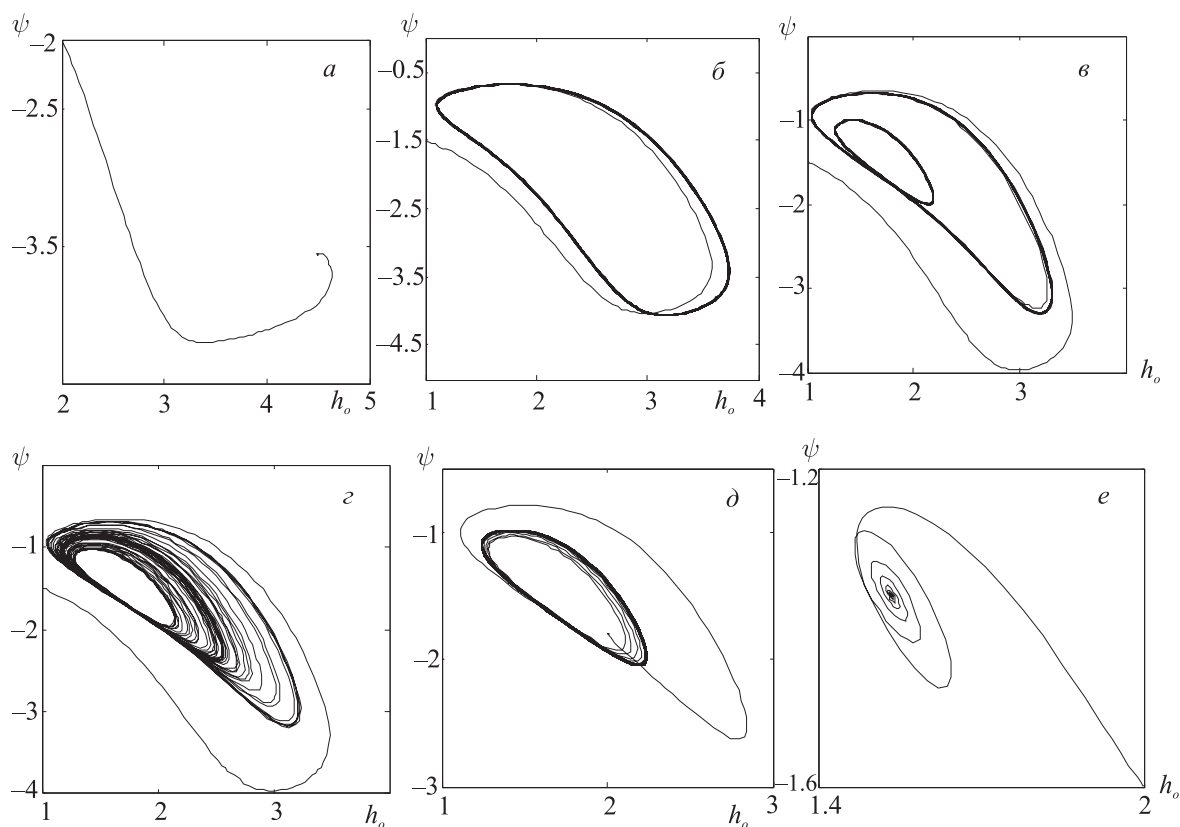
$$a = \frac{k_4 k_5 K_1}{k_{-4} k_{-5} H_{chl}}, b = \frac{k_4 K_1}{k_{-4} + k_{-5} H_{chl} + k_5}.$$

Здесь  $H_{chl}$  — концентрация протонов в стромах хлоропластов.  $E_0$  — полная концентрация всех состояний транспортера на плазматической мембране (моль · м<sup>-3</sup>).  $T_{chl}$  — полная концентрация всех состояний транспортера на мембране хлоропласта (моль · м<sup>-3</sup>).  $\tilde{g}$  — проводимость пассивных каналов (Ом<sup>-1</sup> · м<sup>2</sup>),  $C$  — емкость мембраны (мкФ · м<sup>2</sup>),  $p$  — диаметр клетки (м),  $\varphi_0$  — потенциал покоя на плазматической мембране (В),  $R_i$  — сопротивление цитоплазмы (Ом · м). Константы  $k_1$  (моль · с<sup>-1</sup> · м<sup>-3</sup>) и  $k_{-1}$  (с<sup>-1</sup>) — характеризуют присоединение и отщепление протона, константы  $k_2$  (с<sup>-1</sup>),  $k_3$  (с<sup>-1</sup>) характеризуют перенос протона через мембрану во внешнюю среду за счет работы АТФазы,  $k_{-2}$  (с<sup>-1</sup>) — перенос протонов в клетку через каналы (рис. 1а).  $k_4$ ,  $k_{-4}$ ,  $k_5$ ,  $k_{-5}$  — константы переноса протона из цитоплазмы в стромах хлоропластов.

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

## Результаты

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



**Рис. 2.** Фазовые портреты системы при изменении интенсивности света: *a* —  $I = 0$  (устойчивый узел); *б* —  $I = 0.75$  (предельный цикл); *в* —  $I = 0.8495$  (удвоение периода колебаний); *г* —  $I = 0.9$  (странный аттрактор); *д* —  $I = 0.855$  (предельный цикл); *е* —  $I = 2.25$  (устойчивый фокус). Параметры системы:  $z = 4$ ,  $K_2 = 0.001$ ,  $K_3 = 0.5$ ,  $a = 0.0596$ ,  $b = 0.01$ ,  $m = 1.95$ ,  $\gamma = 0.339$ ,  $g = 1.81$ ,  $\varphi_0 = -0.21$

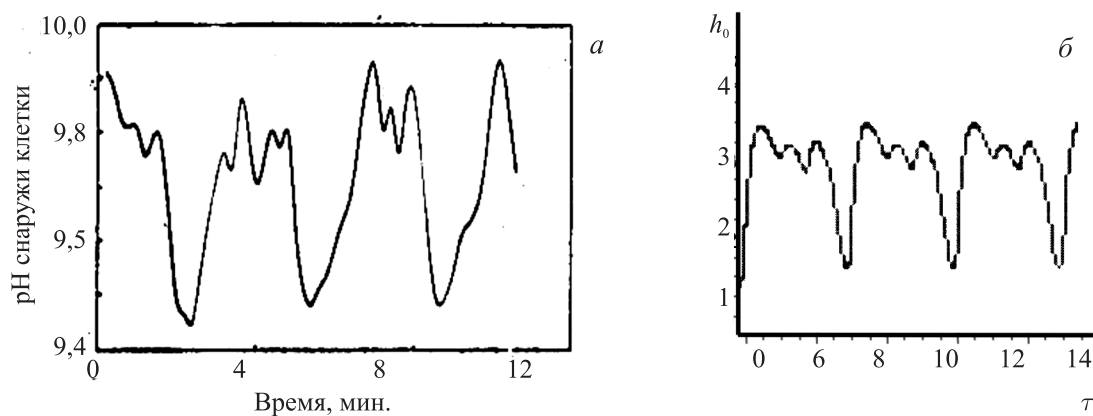
В интервале интенсивностей от 0.8495 до 0.86 (2.6–3.1 Вт/м<sup>2</sup>) наблюдается хаотическая динамика (странный аттрактор, рис. 2в, г) и при дальнейшем увеличении света до 0.9 (8 Вт/м<sup>2</sup>) устанавливается режим автоколебаний (предельный цикл). При увеличении интенсивности освеще-

ния от 2.206 до 2.218 ( $8\text{--}34 \text{ Вт/м}^2$ ) колебания вновь теряют периодический характер, и устанавливается хаотическая динамика (странный аттрактор). При  $I = 0.855$  ( $35.2 \text{ Вт/м}^2$ ) колебания вновь становятся периодическими (автоколебания малой амплитуды, рис. 2*д*) и при дальнейшем увеличении интенсивности затухают (рис. 2*е*).

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 ( $37 \text{ Вт/м}^2$  — интенсивность света в размерном виде). В темноте,  $I = 0$ , наблюдается устойчивое стационарное состояние (устойчивый узел, рис. 2*а*). При изменении интенсивности света от 0 до 0.75 ( $1 \text{ Вт/м}^2$ ) возникают затухающие колебания рН и потенциала (устойчивый фокус). При изменении интенсивности света от 0.75 до 0.845 ( $1\text{--}2.6 \text{ Вт/м}^2$ ) возникают автоколебания (рис. 2*б*, предельный цикл).

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

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



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

## 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 квазихаотические режимы. Таким образом, рН цитоплазмы обуславливает возникновение нерегулярности в колебаниях рН снаружи клетки, что позволяет описать экспериментально наблюдаемые непериодические колебания (рис. 3*а, 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 квазихаотические режимы, которые, по-видимому, возникают тогда, когда клетке «необходимо» установить некий баланс процессов, нару-

шенный 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 и А. А. Черкашина за полезные обсуждения.

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

## Список литературы

1. *Plyusnina T. Yu., Lavrova A. I., Price C. B., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B.* Nonlinear dynamics near the cell membrane of *Chara corallina* // *J. of Biol. Systems*. 2008. Vol. 16. P. 197–217.
2. *Lucas W. J. and Nuccitelli R.*  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{OH}^-$  transport across the plasmalemma of *Chara* // *Planta*. 1980. Vol. 150. P. 120–131.
3. *Lucas W. J.* Plasmalemma transport  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{OH}^-$  in *Chara corallina*: non-antiporter systems // *J. Exp. Bot.* 1976. Vol. 27. P. 19–31.
4. *Lucas W. J., Dainty J.* Spatial Distribution of Functional  $\text{OH}^-$  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. Vol. 32. P. 75–92.
5. *Walker N. A., Smith F. A.* Circulating electric current between acid and alkaline zones associated with  $\text{HCO}_3^-$  assimilation in *Chara* // *J. Exp. Bot.* 1977. Vol. 28. P. 1190–1206.
6. *Lucas W. J.* Mechanism of acquisition of exogenous bicarbonate by internodal cells of *Chara corallina* // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 156. P. 181–192.
7. *Leonetti M., Pelce P.* On the theory of pH bands in characean algae // *C. R. Acad. Sci. Paris*. 1994. Vol. 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. Vol. 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. Vol. 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. Vol. 103. P. 575–578.
11. *Hayashi H., Hirazawa K.* *Nitella* fluctuation and instability in the membrane potential near threshold // *Biophysical Journal*. 1980. Vol. 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. Vol. 23. P. 343–346.
13. *Morsomme P., Boutry M.* The plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase: structure, function and regulation // *BBA*. 2000. Vol. 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. Vol. 25. P. 813–820.
15. *Tazawa M.* Cell Physiological Aspects of the Plasma Membrane Electrogenic  $\text{H}^+$  pump // *J. Plant Res.* 2003. Vol. 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. Vol. 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* // ВВА. 1986. Vol. 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., Kishimoto U., Ohkawa T. and Kami-ike N. A kinetic analysis of the electrogenic pump of *Chara corallina*: II. Dependence of the pump activity on external pH // J. Membrane Biol. 1985. Vol. 86. P. 17–26.





