

НЕЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭЛЕКТРОЁМКОСТИ ПЛАЗМАЛЕММЫ *NITELLOPSIS* ПРИ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВОЙ ФАЗЫ

Ш.С. Махмудова¹, Н.А. Мусаев^{2*}

¹Институт Ботаники НАНА, Баку, Азербайджан

²Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

NON-SENSITIVITY PLASMA MEMBRANE CAPACITY OF *NITELLOPSIS* CELLS DURING MODIFICATION PROTEIN PHAZE

Sh.S. Mahmudova, N.A. Musayev (Institute of Botany, Baku, Azerbaijan; Baku State University, Baku, Azerbaijan)

Резюме. В работе показано отсутствие изменения электроёмкости плазматической мембраны *Nitellopsis obtusa* при действии полипептидных антибиотиков валиномицина и грамицидина. Постоянство электроёмкости плазматической мембраны в присутствии антибиотиков белковой природы сопровождалось изменением электрогенной активности и проводимости мембраны. Результаты обсуждаются с точки зрения, что электроёмкость биологических мембран является показателем липидной фазы биологических мембран.

Abstract. At that work is shown the absence change of electrical capacity plasma membrane *Nitellopsis obtusa* cells in the presence of polypeptide antibiotics valinomisine and gramisidine. The absence effect of polypeptide antibiotics on capacity accompanied with change of electrogenic activity and conductivity of plasma membrane. The results of investigations discussed on that point of, the capacity is characteristic of lipid phase of biomembranes.

Ключевые слова: *Nitellopsis obtusa*, мембранный потенциал, мембранное сопротивление, мембранная ёмкость, полипептидные антибиотики.

Keywords: *Nitellopsis obtusa*, Membrane potential, membrane resistance, membrane capacity, polypeptide antibiotics.

* Н.А. Мусаев, д.б.н., проф., Бакинский Государственный Университет, AZ1148, ул. 3. Халилова 23, Баку, Азербайджан, e-mail: nagi.musayev@hotmail.com

Поступила в редакцию: 24 Мая 2017

1. Введение

Плазматическая мембрана растительных клеток представляет собой сложную многофазную систему. Она включает в себя компоненты транспортной системы, которые осуществляют обмен веществ между средой и клеткой. Большинство функциональных компонентов биомембран имеют белковую природу, а липидная фаза поддерживает их функциональную активность, обеспечивая их подвижную конформацию. Следовательно, изменение физических свойств мембранных липидов должно отразиться в изменениях функциональной активности мембранных белков. Наиболее адекватным параметром физического состояния плазматической мембраны

может служить её электрическая ёмкость. Но изучению лабильности электроёмкости плазматической мембраны растительных клеток было посвящено ограниченное количество исследований [1,3,5]. Это связано с определёнными трудностями измерения этого параметра. К ним можно отнести многофазность клеточной структуры и проблемы адаптации входных цепей измерительных приборов к исследуемому объекту. Однако применение экспериментальной техники с высокой разрешающей способностью позволило установить для электроёмкости биомембран $C_M \sim 1 \text{ мкф} \cdot \text{см}^{-2}$. На основе интуитивных соображений эта величина была отнесена к липидной фазе мембраны [1,3]. Экспериментальная дифференциация этой величины к липидной или белковой фазе мембран практически не проводилась. С этой целью нами было проведено изучение влияния полипептидных антибиотиков валиномицина, грамицидина и повышенной активности K^+ на потенциал φ , сопротивление единицы площади R_M , электроёмкость единицы площади C_M плазматической мембраны клеток *Nitellopsis obtusa*.

2. Методика исследований

Измерение комплекса электрофизиологических параметров плазматической мембраны φ , R_M , C_M *Nitellopsis obtusa* проводилось методом импедансной спектроскопии с использованием прецизионной микроэлектродной техники [5,6]. Измерительная установка, позволила осуществить многочасовую, непрерывную запись одновременно трёх основных электрофизиологических характеристик исследуемой клетки φ , R_M , X_C , где X_C - ёмкостное сопротивление плазматической мембраны. C_M исследуемых клеток вычисляли на основе формулы ёмкостного сопротивления $C_M = 1/2 \pi f X_C$, где f -линейная частота переменного тока. В ходе измерений электрофизиологических параметров обеспечена полная интактность опытной клетки. Средой выращивания опытных растений служила искусственная прудовая вода (ИПВ) [3], состава: (мМ) NaHCO_3 - 1,0, KH_2PO_4 -0,1, CaCl_2 - 0,4, MgSO_4 - 0,1, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ - 0,2, pH- 7,0÷7,5. Температура ИПВ накануне измерений электрофизиологических параметров составляла $20 \pm 2^\circ \text{C}$. Рабочие растворы используемых реактивов добавлялись непосредственно в измерительную камеру с помощью микротрубок её проточной системы.

3. Результаты и их обсуждения

Разброс значений φ опытных клеток в стандартных условиях находился в пределах $-125 \div -245 \text{ мВ}$ со средним значением $168 \pm 4 \text{ мВ}$. Распределение φ по числам клеток не подчинялось закону нормального распределения, но значительная часть опытных клеток обладали повышенной электрогенной активностью. Мембранное сопротивление опытных клеток варьировало в пределах $1,5 - 9 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$, а их электрические ёмкости – в пределах $0,44 - 1,33 \text{ мкф} \cdot \text{см}^{-2}$. Средние значения этих величин

для 42 клеток в стандартных условиях среды составляли $R_m = 4,1 \pm 1 \text{ Ом}\cdot\text{м}^2$, $C_m = 0,9 \pm 0,05 \text{ мкФ}\cdot\text{см}^{-2}$ соответственно.

Реакцией исследуемых клеток на ступенчатое увеличение концентрации K^+ в среде была деполяризация плазматической мембраны. Величина и кинетика деполяризации мембраны зависела от уровня их мембранного потенциала в стандартных условиях и концентрации K^+ в среде (Рис.1).

φ , R_m клеток с высокой электрогенной активностью на увеличение концентрации K^+ в среде реагировали очень слабо. Наклоны зависимостей φ , R_m на единицу логарифма концентрации составляли 6 мВ , $0,2 \text{ Ом}\cdot\text{м}^2$ соответственно (Рис.1). Наоборот, параметры клеток, φ которых находились на уровне K^+ - Na^+ - диффузионного потенциала оказались очень чувствительными на увеличение внешней концентрации K^+ . Наклоны зависимостей φ , R_m на единицу логарифма внешней концентрации K^+ в диапазоне $30\text{-}100 \text{ мМ}$ составляли 58 мВ , $1,7 \text{ Ом}\cdot\text{м}^2$ соответственно (Рис.1).

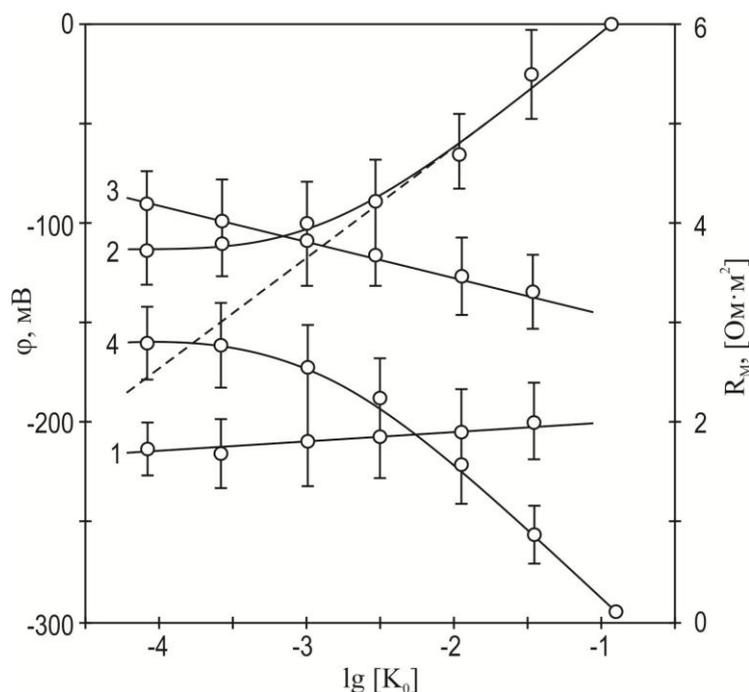


Рис. 1. Зависимость потенциала φ и сопротивления R_m плазматической мембраны клеток *Nitellopsis obtusa* от десятичного логарифма концентрации K^+ в омывающем растворе. Значение логарифма концентрации -4 по оси абсциссы соответствует содержанию K^+ в искусственной прудовой воде. Кривые 1, 3 соответствуют потенциалу и сопротивлению клеток с высокой электрогенной активностью, а 2, 4- те же самые параметры клеток, φ которых находились на уровне K^+ - Na^+ - диффузионного потенциала. Пунктиром проведена зависимость Нернстовского потенциала от концентрации K^+ в среде, с учётом внутриклеточной активности ионов калия $a_k = 104 \text{ мМ}$.

Изменения C_m оценивались по смещению амплитудно-частотной характеристики ёмкостного сопротивления (Рис. 2). В наших исследованиях 10 , 100 -кратное увеличение содержания K^+ в составе питательной среды не

приводило к смещению амплитудно-частотной характеристики ёмкостного сопротивления плазматической мембраны (Рис.2). Нечувствительность ёмкостного сопротивления плазматической мембраны к повышению концентрации K^+ в составе питательной среды была характерна для всех исследуемых клеток. Это свидетельствует об отсутствии изменения электрической ёмкости плазматической мембраны при 100-кратном увеличении концентрации K^+ в составе внешней среды. С другой стороны на фоне постоянства электрической ёмкости происходили уменьшения φ , R_m . Эти факты свидетельствуют о перестройках структурно-функциональной организации ионных каналов и ионных насосов мембраны, составляющих её белковую фазу.

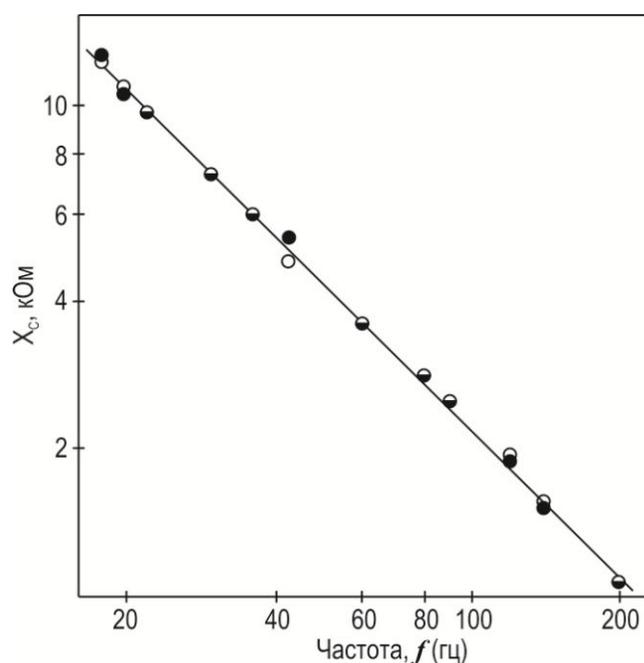


Рис.2. Амплитудно-частотная характеристика ёмкостного сопротивления плазматической мембраны клетки *Nitellopsis obtusa* в стандартных условиях среды (o), в среде с повышенной концентрацией K^+ (●). (○) совпадающие точки названных характеристик. Длина и диаметр клетки составили 21 и 0,8 мм соответственно. $C_m = 0,6 \text{ мкф} \cdot \text{см}^{-2}$.

Для тестирования отсутствия изменения мембранной ёмкости при конформационных перестройках белковых каналов и ионных насосов плазматической мембраны нами была предпринята попытка измерения ёмкости плазматической мембраны при включении в её состав компонентов белковой природы. С этой целью нами выбраны два модификатора проводимости белковой природы, молекулы которых эффективно внедряются в структуру клеточных мембран и обеспечивают селективный перенос одновалентных катионов между средой и цитоплазмой клеток [4,7]. Так, включение в состав питательной среды полипептидного антибиотика - 10^{-6} М валиномицина деполяризовало плазматическую мембрану в течение 30 минут на 25-30 мВ. Деполяризация плазматической мембраны

сопровождалась уменьшением мембранного сопротивления на 25-30% (Рис.3). Изменения φ , R_m происходили при постоянстве C_m . Эти результаты свидетельствуют о том, что изменение белкового содержания плазматической мембраны не затрагивает величину мембранной ёмкости. Увеличение концентрации антибиотика в составе питательной среды до 10^{-5} М не вызвало существенное изменение регистрируемых нами параметров плазматической мембраны φ , R_m , C_m . При исключении антибиотика из состава питательной среды происходило полное восстановление φ , R_m на своих первоначальных уровнях в стандартных условиях.

Клетки, мембранный потенциал которых находился на уровне K^+ - Na^+ -диффузионного потенциала, на введение в среду вышеуказанных концентраций антибиотика не реагировали. Нечувствительность φ , R_m на отмеченных уровнях мембранного потенциала свидетельствует об отсутствии градиента электрохимического потенциала по ионам, для которых плазматическая мембрана хорошо проницаема. На этом уровне мембранного потенциала каналформеры билипидных мембран 10 нМ грамицидин А и его производная грамицидин С также не вызывали электрофизиологические эффекты. Однако у клеток с высокой электрогенной активностью (с φ - $220 \div -240$ мВ) появление в наружной среде 10 нМ грамицидина А или С в течение 30 мин вызывали деполяризацию плазматической мембраны до уровня K^+ - Na^+ -диффузионного потенциала -12 ± 12 мВ и двухкратного уменьшения R_m . Эти эффекты антибиотиков связаны с формированием токопроводящих комплексов в плазматической мембране в присутствии антибиотиков, о чём свидетельствует существенное уменьшение мембранного сопротивления, сопровождаемое деполяризацией мембраны. Вероятно, названный комплекс функционирует как ионный канал, о котором свидетельствует долгое отмывание антибиотика от мембраны [4]. В наших экспериментах полное восстановление φ , R_m мембраны при отмывании клеток от полипептидных антибиотиков длилось в течение 45 мин. Интересным является тот факт, что электрофизиологические эффекты грамицидина А и С проявлялись при неизменном C_m .

Таким образом, нами установлено, что при модуляции белкового содержания плазматической мембраны: перестраиванием канального белка, встраиванием циклического полипептида, включением полипептидной цепи в мембранную структуру не происходит изменения электрической ёмкости плазматической мембраны интактной клетки. Следовательно, вклад белковой фазы плазматической мембраны в её суммарную электроёмкость незначителен. Остаётся предположить, что электрическая ёмкость плазматической мембраны отражает структурно-поляризационное состояние её липидной фазы. Действительно проводимость и электроёмкость белков несколько велики, что они не способны накопить заряд, как в статистических, так и в переходных условиях [1,3].

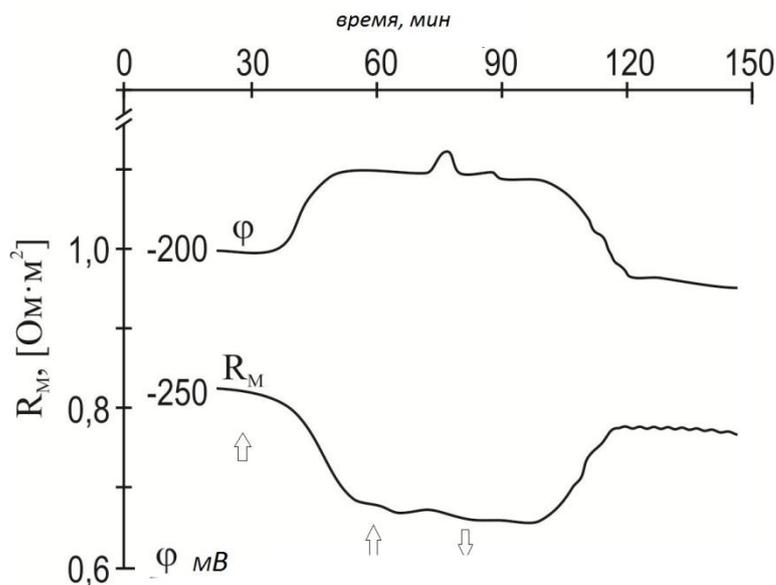


Рис.3. Кинетика изменения мембранного потенциала (φ) и сопротивления (R_M) клетки *Nitellopsis obtusa* при последовательном включении в состав питательной среды 10^{-6} и 10^{-5} М валиномицина. Стрелками вверх указаны моменты добавления антибиотика в состав питательной среды. Стрелкой вниз указан момент исключения антибиотика из состава питательной среды.

Справедливость сделанного нами предположения подтверждается ещё тем, что целый ряд липофильных веществ оказался способным изменить электроёмкость как липидных [1], так и нативных [1,5] мембран, воздействуя на их липидную фазу. А в ряде случаев изменение физического состояния липидной фазы мембраны отразилось в изменениях функциональной активности мембранных белков [9, 10]. Поэтому при рассмотрении функциональной активности мембранных белков необходимо учитывать возможное изменение фазового состояния её липидной фазы. Следовательно, при электрофизиологическом анализе транспортных свойств клеточных мембран необходимо сопоставление их функциональной активности и структурной лабильности вместе.

В результате наших исследований установлены следующие положения функционирования плазматической мембраны растительных клеток:

i) модуляция перестраиванием белкового содержания или внесением полипептидов в структуру плазматической мембраны не изменяют её электрическую ёмкость;

ii) электрическая ёмкость биологических мембран есть показатель структурно поляризационного состояния их липидной фазы.

Литература

1. Almers W., (1975) Observations of intermembrane charge movements in the skeletal muscle, *Philos Trans. Roy Soc. London (Biol. Sci.)*, 270, 507-513.
2. Cole K.S., (1972), *Membranes, Ions, Impulses*, University of California Press., Berkley, California, 317-354.
3. Coster H.G.L., Smith J.R., (1974) Low-frequency impedance of *Chara corallina*, *Austr. Journ. Plant Physiol.*, 4, 667-674.
4. Касумов Х.М., (2009) Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков, Монография, Баку, «Элм», 510 с.
5. Мусаев Н.А., Юрин В.М., Соколик А.И. Али-заде В.М., (2012) Механизмы модификации транспортных свойств плазматической мембраны растительных клеток, *Труды Белорусск. Государст. Универ., сер. Физиол., биохим. и молек.основ. функц. биосистем.* 7(1), 154-162.
6. Мусаев Н.А., (2009) Изменение структурно-поляризационного состояния плазматической мембраны клеток *Nitellopsis obtusa* при действии ксенобиотиков, *Труды Института Ботаники НАНА*, 630-637.
7. Самойлов В.О., (2004) Медицинская биофизика, Санкт-Петербург, Спец.-Лит., 496 с.
8. Skierczynska J., Zolnierczuk R., Bulanda W., (1973) Impedance of *Nitellopsis obtusa* cells at low-frequency, *Journ. of Exp. Botany*, 24, 38-46.
9. Thomas M.S., Fredrick S., (2004) Dynamic regulation of mechanosensitive channels: capacitance used to monitor patch tension real time, *Phys. Biol.*, 1,(1), 1-18.
10. Tunstall M.J, Gala J.E., Ashmore J.F., (1995) Action of salicylate on membrane capacitance of outer hair cells from the guinea-pig cochlea, *J.Physiol.*, 485(3), 739-752.