

ПОТЕНЦИАЛ, СОПРОТИВЛЕНИЕ И ЁМКОСТЬ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК *NITELLOPSIS OBTUSA* В ПРИСУТСТВИИ КАТИОНОВ КОБАЛЬТА

Ш.С. Махмудова¹, Н.А. Мусаев^{2*}

¹Институт Ботаники НАНА, Баку, Азербайджан

²Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

POTENTIAL, RESISTANCE AND CAPACITY OF PLASMALEMMA OF *NITELLOPSIS OBTUSA* IN PRESENCE OF COBALT CATIONS

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

Резюме. С помощью импедансной спектроскопии исследованы закономерности изменения потенциала φ_m , сопротивления R_m , ёмкости C_m плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* под влиянием Co^{2+} . Первичной реакцией на экзогенное воздействие Co^{2+} оказалось уменьшение C_m на 20-32%. Уменьшение C_m с увеличением концентрации Co^{2+} происходило по закону $C_m = 0,93 - 0,065 \lg[Co]$. Следом за изменением C_m происходило увеличение φ_m на 20-25% при постоянстве R_m . Многократное увеличение R_m при воздействии Co^{2+} обнаружили у клеток, φ_m которых находился в диапазоне активации наружу выпрямляющих K^+ -каналов. Эффекты катиона обсуждаются с точки зрения блокирования K^+ -каналов и изменения физического состояния липидной фазы плазмалеммы под влиянием Co^{2+} .

Abstract. With the help of impedance spectroscopy has been investigated the regularity of change in potential φ_m , resistance R_m , capacity C_m of plasmalemma *Nitellopsis obtusa* cells under the Co^{2+} influence. The initial reaction of exogenous Co^{2+} influence was the decrease of C_m 20-32%. The C_m decrease with the increase of Co^{2+} concentration occurred due to $C_m = 0,93 - 0,065 \lg [Co]$. Due to C_m change happened φ_m increase 20-25% in the R_m presence. Multiple R_m increase, under the Co^{2+} influence was observed in cells, φ_m which located in activation range of outward rectifying K^+ -channels. The kation effects are discussed from the point of view blocking the outward rectifying K^+ -channels and the change of physical state of lipid phase in plasmalemma under the Co^{2+} .

Ключевые слова: *Nitellopsis obtusa*, плазмалемма, потенциал, сопротивление, электроёмкость мембраны, катионы кобальта.

Keywords: *Nitellopsis obtusa*, plasmalemma, membrane potential, membrane resistance, membrane capacity, cobalt cations.

*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: 12 Июля 2017

1. Введение

Co^{2+} является модификатором транспортных свойств плазматических мембран растительных, животных, нервных клеток и клеточных мембран других тканей. Для Co^{2+} характерна быстрая аккумуляция во все компартменты

растительных клеток [13], если растение находится в среде с кобальтом. В отдельных случаях для катионов Co^{2+} были установлены эффекты блокирования Na^+ -каналов [9], K^+ -каналов [14], усиление Na^+ -потоков через электровозбудимые мембраны [7], а также токсическое действие катиона на фотосинтетическую активность микроводорослей [8].

Установление общих закономерностей взаимодействия катиона с клеточной мембраной, которые могли бы пролить свет на отмеченное разнообразие, и даже контрастные позиции некоторых полученных данных, требуют комплексный подход к решению проблемы. Никто из авторов перечисленных работ не обратил внимания на возможную роль липидной фазы в регуляции транспорта веществ через мембрану. Практически не рассмотрены изменения структурно-поляризационных свойств мембраны при активации, инактивации компонентов системы транспорта веществ через плазмалемму растительных клеток. Поэтому основной целью настоящей работы было выявление возможных изменений структурно-поляризационных свойств плазмалеммы при регуляции мембранного транспорта через неё. Следовательно, комплекс параметров для описания транспорта ионов через мембрану должен включать ещё и параметр, являющийся показателем структурно-поляризационного состояния плазмалеммы растительных клеток. Таким параметром служит электрическая ёмкость плазмалеммы. Электрическая ёмкость была использована для идентификации компонентов ионотранспортной системы в классических работах Коула, Блинкса [11,12] как неизменная характеристика клеточных мембран.

2. Объект и методика исследований

В качестве объекта исследования применены клетки *Nitellopsis obtusa*. Высокая электрогенная активность, прозрачность, чёткая дифференцировка отдельных фаз клеточной структуры, правильная цилиндрическая форма делают их уникальными объектами электрофизиологических исследований. Измерение комплекса электрофизиологических параметров плазмалеммы, потенциала φ_M сопротивления R_M , ёмкости C_M *Nitellopsis obtusa* проводилось методом импедансной спектроскопии с использованием прецизионной микроэлектродной техники [4]. Измерительная установка, позволила осуществить многочасовую, непрерывную запись одновременно трёх электрофизиологических параметров интактных клеток φ_M , R_M , X_C , где X_C ёмкостное сопротивление плазмалеммы. C_M исследуемых клеток вычисляли на основе формулы ёмкостного сопротивления $C_M = 1/2 \pi f X_C$, где f -линейная частота применённого переменного тока.

Для оценки движущей силы транспорта ионов необходимо было экспериментальное определение внутриклеточной активности K^+ в вакуоле или цитоплазме a_K . С этой целью нами применены K^+ -чувствительные микроэлектроды осадочного типа с соответствующей цепью электрометрических измерений.

В ходе измерений электрофизиологических параметров обеспечена полная интактность опытной клетки. Средой выращивания растений *Nitellopsis obtusa* служила искусственная прудовая вода (ИПВ) [4], 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 Co^{2+} приготовлены на ИПВ.

3. Результаты и их обсуждения

Результаты обработки значений электрофизиологических характеристик исследуемых клеток в стандартных условиях, об их распределении по числам клеток нами сообщалось ранее в работе [2]. Средние значения φ_M опытных клеток в стандартных условиях составляли $-168 \pm 4 \text{ мВ}$, $R_M = 4,1 \pm 1 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$, $C_M = 0,9 \pm 0,05 \text{ мкФ} \cdot \text{см}^{-2}$ соответственно. φ_M и R_M являются интегральными показателями протонных помп, диффузионных каналов проводимостей разного типа. Однако C_M является дифференциальным показателем физического состояния липидной фазы плазмалеммы [2, 3, 10].

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

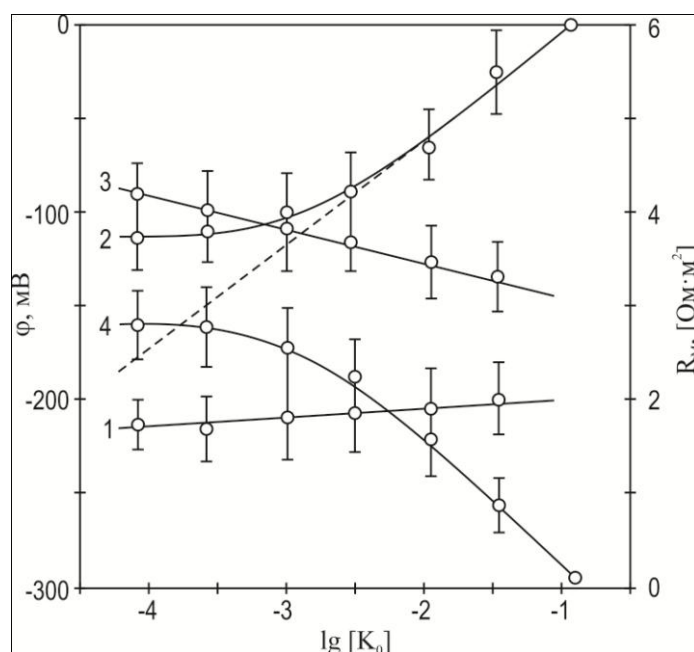


Рис. 1. Зависимость потенциала φ_M и сопротивления R_M плазматической мембраны клеток *Nitellopsis obtusa* от десятичного логарифма концентрации K^+ в омывающем растворе. Значение логарифма концентрации -4 по оси абсциссы соответствует содержанию K^+ в искусственной прудовой воде. Кривые 1, 3 соответствуют потенциалу и сопротивлению клеток, φ_M которых находились в диапазоне активации внутрь выпрямляющих K^+ -каналов, а 2, 4- те же самые параметры клеток, φ_M которых находились в диапазоне активации наружу выпрямляющих K^+ -каналов. Пунктиром проведена зависимость Нернстовского потенциала от концентрации K^+ в среде, с учётом внутриклеточной активности ионов калия $a_K = 104 \text{ мМ}$.

Клетки с высокой электрогенной активностью, мембранный потенциал которых находился в диапазоне активации внутрь выпрямляющих K^+ -каналов, на увеличение концентрации K^+ в среде реагировали очень слабо. Наклоны

зависимостей φ_M , R_M на единицу логарифма концентрации составляли 6 мВ, 0,2 Ом·м² соответственно (рис.1). Наоборот, параметры клеток, φ_M которых находились в диапазоне активации наружу выпрямляющих K⁺-каналов оказались очень чувствительными на увеличение внешней концентрации K⁺. Наклоны зависимостей φ_M , R_M на единицу логарифма внешней концентрации K⁺ в диапазоне 30-100 мМ составляли 58 мВ, 1,7 Ом·м² соответственно (рис.1).

У клеток, φ_M которых находились в диапазоне активации наружу выпрямляющих K⁺-каналов, первичный эффект добавления в состав питательной среды 10⁻⁶ М Co²⁺ в виде соли CoCl₂ было уменьшение электрической ёмкости плазмалеммы в пределах 20%. Следом за уменьшением электрической ёмкости плазмалеммы происходило увеличение её электрогенной активности на 20-25 мВ (рис.2). Отмеченные изменения C_M и φ_M происходили при постоянстве мембранного сопротивления плазмалеммы R_M , т.е. уменьшение шунта протонных насосов не причастно к изменению названных параметров. Следовательно, увеличение абсолютного значения φ_M отражает усиление электрогенной активности плазмалеммы за счёт изменения физического состояния липидной фазы, о чём свидетельствует заметное изменение её электрической ёмкости (рис. 2, 3) под влиянием катионов Co²⁺.

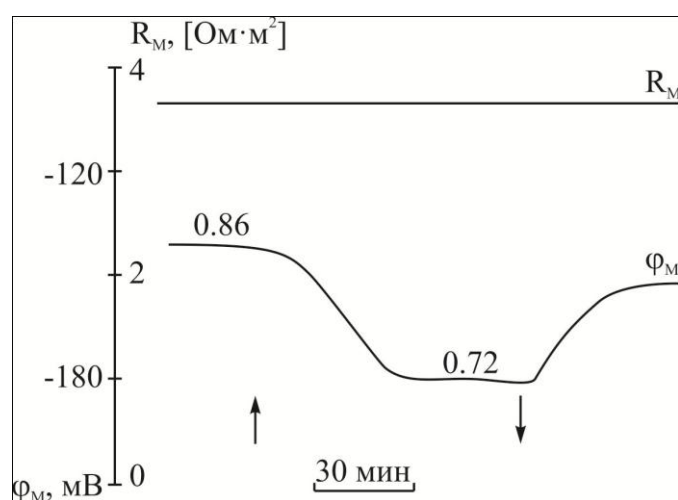


Рис. 2. Кинетика изменения потенциала (φ_M), сопротивления (R_M) плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при действии 10⁻⁶ М CoCl₂. Цифрами на кинетической кривой φ_M указаны значения электрической ёмкости C_M (в мкФ·см⁻²) в соответствующие моменты времени. Стрелкой вверх указан момент введения CoCl₂ в состав питательной среды, а стрелкой вниз – момент исключения его из состава питательной среды.

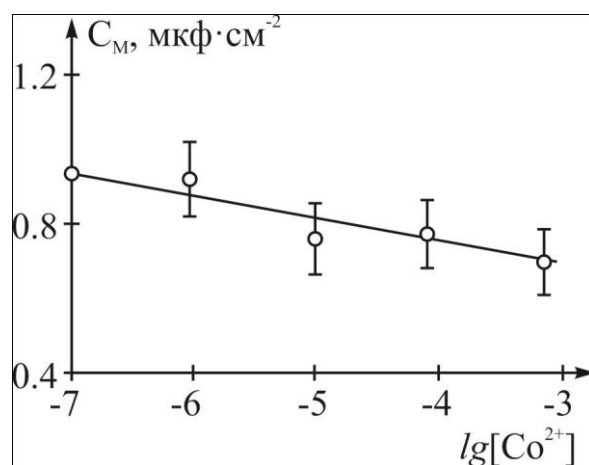


Рис. 3. Корреляционная зависимость электрической ёмкости плазмалеммы от десятичного логарифма концентрации CoCl_2 в составе питательной среды. Коэффициент линейной корреляции $r = 0,7$, линейная зависимость установлена как $C_M = 0,93 - 0,065 \lg[Co]$.

В наших экспериментах при включении в состав питательной среды 10^{-5} , 10^{-4} М концентрации Co^{2+} также происходило увеличение абсолютного значения φ_M на 20-25% при постоянстве R_M . Но величина убыли электрической ёмкости возрастало до 32%. Электрическая ёмкость плазмалеммы отражает структурно-поляризационные состояния её липидной фазы [2, 3, 10]. Уменьшение электрической ёмкости может произойти за счёт увеличения толщины плазмалеммы и за счёт экранирования поверхностного заряда, приводящего к уменьшению поляризуемости липидной фазы плазмалеммы. Активация протонной помпы может произойти также за счёт электроактивации помпы внутримембранным электрическим полем [1, 6], индуцированным адсорбированными зарядами катионов Co^{2+} .

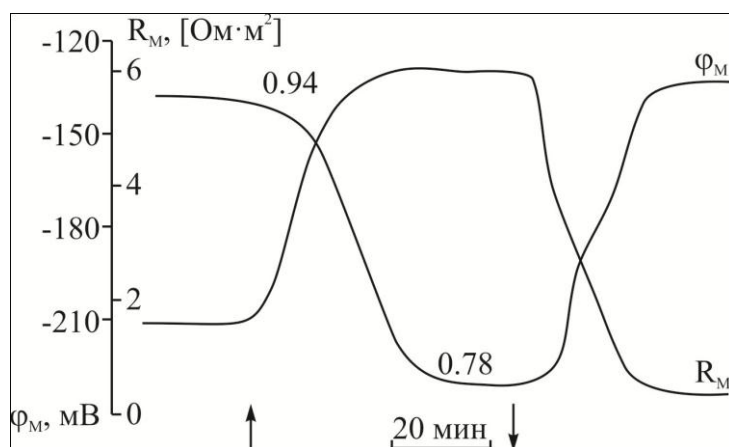


Рис. 4. Протокол записи мембранного потенциала φ_M и сопротивления R_M плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при действии 10^{-3} М CoCl_2 . Цифрами на кинетической кривой φ_M указаны значения электрической ёмкости C_M (в мкФ·см $^{-2}$) в соответствующие моменты времени. Стрелкой вверх указан момент времени включения CoCl_2 в состав питательной среды, а стрелкой вниз отмечен момент удаления его из состава питательной среды.

Особенно примечательный электрофизиологический эффект катионов Co^{2+} проявился при его концентрации 10^{-3} М. Появление 10^{-3} М Co^{2+} в среде вызывало гиперполяризацию плазмалеммы на 80-100 мВ в течение 40-50 мин. (рис. 4). Значительная гиперполяризация плазмалеммы под влиянием Co^{2+} обнаружена также в междоузловых клетках *Chara gymnohylla* [14] и корневых волосках *Trianea bogotensis* [5]. Гиперполяризация плазмалеммы в наших опытах сопровождалась увеличением мембранного сопротивления в 4-5 раз. Этот эффект Co^{2+} мы обнаружили только у клеток, мембранный потенциал которых находился в диапазоне активации наружу выпрямляющих K^+ -каналов. Следовательно, обнаруженное нами многократное увеличение R_M , сопровождаемое гиперполяризацией плазмалеммы, отражает блокирование наружу выпрямляющих K^+ -каналов. А значительная гиперполяризация плазмалеммы в присутствии 10^{-3} М Co^{2+} несомненно, является следствием уменьшения шунтирующей нагрузки протонной помпы в результате блокирования наружу выпрямляющих K^+ -каналов плазмалеммы. Но значительной гиперполяризации плазмалеммы всегда предшествовало также уменьшение электрической ёмкости плазмалеммы (рис. 4). Поэтому вполне вероятно, что в значительную гиперполяризацию плазмалеммы вносит свой вклад также изменение физического состояния природного окружения мембранных помп – липидной фазы. Подтверждением такого предположения может явиться тот факт, что небольшая гиперполяризация (18-20 мВ) плазмалеммы в сопровождении уменьшения её электрической ёмкости на 20% мы выявили даже у клеток, φ_M которых находились в диапазоне активации внутрь выпрямляющих K^+ -каналов, когда изменение R_M отсутствовало. Изменение R_M у таких клеток отсутствовало, даже в присутствии в наружной среде 10^{-3} М Co^{2+} . Отсюда следует, что гиперполяризация плазмалеммы на 20-25 мВ под влиянием Co^{2+} , сопровождаемая изменением электрической ёмкости липидной фазы, характерна для всех клеток *Nitellopsis obtusa*. А отсутствие изменения R_M клеток, φ_M которых находились в диапазоне активации K^+ -каналов внутреннего направления даже в присутствии 10^{-3} М Co^{2+} показывает, что катион способен блокировать только K^+ -канала наружного выпрямления.

Подводя итоги анализам изменения электрофизиологических параметров плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* под влиянием катионов Co^{2+} , мы пришли к следующим выводам:

- (i) всякие изменения структурно-поляризационных состояний липидной фазы плазмалеммы отражаются в изменениях её электрогенной активности;
- (ii) катионы Co^{2+} удачно инактивируют наружу выпрямляющие K^+ -каналы, не затрагивая при этом K^+ -каналы внутреннего выпрямления.

Литература

1. Высоцкая Ж.В., Соколик А.И., Юрин В.М., (2005) Взаимодействие механизмов ионного транспорта на плазматической мембране растительных клеток: калиевые каналы и электрогенная водородная помпа, *Вестник Белорус. Гос. Ун-та, Сер. 2, Химия, Биология, География*, 2, 50-54
2. Махмудова Ш.С., Мусаев Н.А., (2017) Влияние грамицидина и валиномицина на транспортные свойства плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtuse*, *Вестн Бакинского*

- Государственного Университета. Серия биологических наук, 1 (в печати).
3. Мусаев Н.А., (2009) Изменение структурно-поляризационного состояния плазматической мембраны клетки *Nitellopsis obtusa* при действии ксенобиотиков, Труды Ин-та Ботаники НАНА, Элм, 630-637.
 4. Мусаев Н.А., Воробьев Л.Н., (1981) Электрогенная активность и структурная лабильность плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при повышенных температурах, Физиол. раст., 28(1), 86-93.
 5. Мусаев Н.А., Набиев М.А., Али-заде В.М., (2001) Мембранный потенциал и сопротивление корневых волосков *Trianea bogotensis* в присутствии Co^{2+} , Известия НАНА, серия биологические науки, 1-3, 3-11.
 6. Мусаев Н.А., Юрин В.М., Соколик А.И., Исмаилов Э.Р., (2008) Электрогенная активность плазматической мембраны клеток *Chara gymnohylla* при блокировании K^+ -каналов тетраэтиламмонием, Вестник Белорусск. Государст. Университета, серия 2, 46-49.
 7. Наточин В.Ю., (1985) Активация Co^{2+} и угнетение Д-600 транспорта натрия через апикальную мембрану клеток эпителия кожи лягушки, Докл. АН СССР, 231(5), 1273-1276.
 8. Плеханов С.Е., Чемерис Ю.К., (2003) Ранние эффекты токсичного действия цинка, кобальта, кадмия на фотосинтетическую активность водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chik S-39, Известия АН России, Серия биологическая, 5, 610-616.
 9. Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П., (1991) Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток, Минск, Наука и техника, 272с.
 10. Almers W., Adrian R.H., Levinson S.R., (1975) Some dielectric properties of muscle membrane and their possible importance for excitation-contraction coupling, Annual N. Y. Acad. Sci., 264, 278-292.
 11. Blinks L., (1930) The direct current resistance of *Nitella*, Journal of Gen. Physiol., 13, 495-508.
 12. Cole K.S., (1969) Zeta potential and discrete vs. uniform surface charges, J. of Biophys., 9(3), 465-469.
 13. Liu J., Reid R.J., Smith F.A. (1998) Mechanisms of cobalt uptake in plants: ^{60}Co uptake and distribution in *Chara*, J. Physiol. Plant., 104, 351-356.
 14. Musaev N.A., Ismailov E.R., (2007) Bioelectrical properties of *Chara gymnohylla* plasmamembrana during interaction with cobalt (Co^{2+}), Ecology, 63, 1-6.