

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОЙ ОБОЛОЧКИ И ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *CHARA FRAGILIS*

А.Э. Гасанова¹, Ш.А. Наджафалиева², П.Ф. Алиева², Н.А. Мусаев²

¹Институт Ботаники Национальной АН Азербайджана, Баку, Азербайджан

²Кафедра биофизики и молекулярной биологии, Бакинский Государственный
Университет, Баку, Азербайджан

ELECTROPHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF CELLULAR WALL AND PLASMATIC MEMBRANE OF *CHARA FRAGILIS* CELLS

A.A. Hasanova, Sh.A. Najafaliyeva, P.F. Aliyeva, N.A. Musayev (Institute of Botany, National Academy of Science of Azerbaijan; Department of Biophysics and Molecular Biology, Baku State University, Baku, Azerbaijan)

Резюме. В работе впервые представлены результаты анализа распределения потенциала (φ_m), сопротивления (R_m) плазматической мембраны и клеточной оболочки (R_0) по числам клеток *Chara fragilis* в стандартных условиях. С применением стандартных модификаторов транспортных свойств клеточных мембран проведена дифференциация электрогенной активности клеток на K^+ -каналы двух типов и H^+ -помпы мембран. Клетки *Chara fragilis* рекомендованы для установления механизмов модификации транспортных свойств плазматической мембраны под влиянием экзогенных стимулов, стресс факторов, в качестве тест-объекта.

Abstract. The results of the analysis of the potential distribution (φ_m), resistance (R_m) of the plasma membrane and cell wall (R_0) by the number of cells of *Chara fragilis* under the standard conditions is being presented for the first time. The differentiation of electrogenic activity of cells on two types of K^+ -channels and H^+ -membrane pumps has been carried out by application of standard modifiers of the transport characteristics of cell membranes. *Chara fragilis* cells are recommended for establishing mechanisms for modifying the transport characteristics of the plasma membrane under the influence of exogenous stimuli, stress factors, as a test-object.

Ключевые слова: *Chara fragilis*, плазмалемма, потенциал, сопротивление мембраны, ванадат, TEA^+ -йодид.

Keywords: *Chara fragilis*, plasmalemma, membrane potential, membrane resistance, vanadate, TEA^+ -iodide.

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

Поступила в редакцию: 16 января 2018

1. Введение

Экспериментальные исследования на харовых водорослях способствовали установлению кинетических характеристик компонентов первичного активного транспорта плазматической мембраны растительных клеток (Yurin *et al.*, 1991; Volkov, 2006; Véry & Sentenac, 2003), клеточных механизмов действия на

плазматическую мембрану ряда ксенобиологических, фармакологических агентов и других модификаторов транспортных свойств мембраны растительных клеток (Musayev, 2012; Musaev *et al.*, 2009). Возможности использования харовых водорослей в качестве тест объекта не ограничиваются изучением клеточных механизмов действия выше названных экзогенных стимулов. Очень перспективным выглядит применение изолированных клеток харовых водорослей для распознавания адаптивных ответов при модификации транспортных свойств плазматической мембраны стрессовыми факторами (Demidchik, 2012). С этой целью привлечение новых объектов, отличающихся электрохимическими и кинетическими характеристиками, могло бы стимулировать установление механизмов адекватных ответов изолированных клеток и растений в целом на экзогенные раздражители. В настоящей работе дано описание биоэлектрических параметров клеток *Chara fragilis*, введенных впервые в практику электрофизиологических исследований нами. Проведена дифференциация электрогенной активности клеток *Chara fragilis* на компоненты первичного активного транспорта с использованием специфических модификаторов транспортных свойств плазматической мембраны.

2. Объект и методика исследований

В поисках нового объекта электрофизиологических исследований нами организован ряд экспедиций на территории Азербайджанской Республики. В Товузском районе, на территории «Катиб булагы» в небольшом водоеме, являющимся коллектором стоков ряда горных родников, нами обнаружено растение *Chara fragilis*. Растение *Chara fragilis* является одним из видов семейства *Characeae* Ag. *Emand Hollerb* и относится к классу харовых водорослей *Charophyceae*. Семейства, вид и класс растения установили по их анатомическим и морфологическим характеристикам с использованием определителя пресноводных водорослей СССР (Gollerbakh & Krasavina, 1983), при любезной поддержке алгологов Института Ботаники НАН Азербайджана.

Длина зрелых интернодальных клеток *Chara fragilis* достигала 5-8 см, а диаметр - 0,4-1 мм. Крупные размеры междоузловых клеток *Chara fragilis* позволяют их применить для многосуточных микроэлектродных исследований. Минеральный состав воды «Катиб булагы», определяемый атомно-абсорбционной спектроскопией, соответствовал минеральному составу искусственной прудовой воды (ИПВ), с содержанием катионов (мМ) 0,1 - K^+ , 1,0 - Na^+ , 0,4 - Ca^{2+} , 0,3 - Mg^{2+} и анионов 0,4 - Cl^- , 0,1 - HCO_3^- , 0,3 - NO_3^- , 0,2 - SO_4^{2-} , pH - 6,9÷7,2. Поэтому растения выращивали на ИПВ, в аквариумах размерами 0,3 x 0,4 x 0,5 м при естественном освещении на подоконнике лабораторной комнаты (освещенность 6 Вт/м²). Оптимальный температурный диапазон для выращивания *Chara fragilis* оказался 18-23⁰С. Повышение температуры среды выращивания до 30⁰С и выше приводило к 100%-ой гибели растений.

Растения, собранные из водоема «Катиб булагы» хорошо адаптировались к лабораторным условиям. Повышение температуры среды выращивания в летний период сократило интенсивность размножения и роста растений. Вновь проросшие растения оказались мелкими, со слабым тургором. Однако растения, собранные осенью, хорошо адаптировались к лабораторным условиям, интенсивно развивались и размножались. Способность клеток генерировать

мембранный потенциал громадной величины (до -300 мВ), значительные размеры, из-за которых интактность клеток практически не нарушается во время измерения с применением стеклянных микроэлектродов, являются уникальными свойствами этих растений. Правильная цилиндрическая форма облегчает точную оценку мембранного сопротивления. В доступной нам литературе, а также на интернет-сайтах мы не обнаружили данных об электрофизиологических характеристиках междоузловых клеток *Chara fragilis*. Очевидно, междоузловые клетки *Chara fragilis* могут получить статус «нового объекта электрофизиологических исследований».

Для обеспечения высокой точности измерения мембранного сопротивления в экспериментах использовали клетки длиной не более 20 мм. Эта величина соответствовала длине второй клетки с верхушки растений *Chara fragilis*. За сутки до экспериментов вторую с верхушки интернодальную клетку *Chara fragilis* отделили от соседних интернодов и поместили в чашки Петри со стандартной питательной средой. Это было необходимо для точной оценки направления потоков и градиентов электрохимических потенциалов. С другой стороны предварительное выдерживание клеток в чашке Петри необходимо для стабилизации внутриклеточных процессов клеток после их разъединения от соседних.

Для измерения основных электрофизиологических параметров - мембранного сопротивления R_m и потенциала ϕ_m плазматической и вакуолярной мембраны пользовались двухэлектродным методом Хогга (Hogg *et al.*, 1968), разработанным для клеток имеющих цилиндрическую форму. Для статистической обработки результатов применили компьютерные программы “Excel-2016” и “SigmaPlot12.0”. Распределение ϕ_m , R_m по числам клеток тестировано на основе законов вариационной статистики.

3. Результаты и их обсуждения

Соприкосновение кончика измерительного микроэлектрода с клеточной оболочкой в стандартных условиях среды вызывало появление сигнала, величина которого составляла $\phi_0 = -30 \pm 2,5$ мВ. Она отражает потенциал клеточной оболочки относительно среды и эту величину принято называть потенциалом клеточной оболочки (Volkov, 2006; Musayev, 2012). В ряду исследований она являлась показателем ионообменных свойств клеточной оболочки (Musaev & Ismailov, 2005; Yurin *et al.*, 1977).

Пропусканием тока через клетку с помощью токового микроэлектрода, было зарегистрировано падение напряжения на клеточной оболочке ΔU_0 , по которому вычислено значение её сопротивления $R_0 = 3,8 \pm 0,7$ Ом·м².

Продвижение кончика измерительного микроэлектрода из фазы клеточной оболочки в вакуоль значительно увеличивало разность потенциалов между измерительным и вспомогательным микроэлектродами. Одновременно происходило и увеличение электротонического потенциала ΔU , по которому вычисляли мембранное сопротивление. Величина мембранного сопротивления, которая отсчитана от уровня сопротивления клеточной оболочки, составляла $9 \pm 1,2$ Ом·м².

Отсутствие значительного вклада сопротивления тонопласта между вакуолью клеток и наружной средой выявлено с применением методических

подходов, описанных в работах (Musayev, 2012; Musaev & Ismailov, 2005). Следовательно, φ_m , R_m в наших измерениях отражали функциональные состояния ион-транспортной системы плазматической мембраны *Chara fragilis*.

Стационарные значения φ_m и R_m имели разброс в довольно широких интервалах: $-90 \div -300$ мВ и $1 \div 32,6$ Ом·м², соответственно. Среднее значение φ_m составляло $-183 \pm 4,9$ мВ.

Для построения вариационных рядов совокупность значений мембранного потенциала делили на классы. Число классов определяли по формуле, предложенной Бруксом и Карузерсом (Lakin, 1990), что составило 10. Классовый промежуток (интервал) определяли по стандартной формуле вариационной статистики. Объем выборки n экспериментального материала составил 106, классовый интервал $i=21$ мВ.

При построении интервального вариационного ряда добивались того, чтобы минимальная варианта φ_{\min} попадала в середину первого классового интервала. Это условие гарантирует построение вариационного ряда, наиболее полно отвечающего природе распределения изучаемой величины (Lakin, 1990). Поэтому вариационный ряд φ_m мы представили как распределение общего объема между 11 классами (Рис.1). Вариационный ряд φ_m , представленный в виде гистограммы, имел максимум при -174 мВ. Для выравнивания эмпирического распределения вычисляли теоретическую частоту классов по формуле (Lakin, 1990):

$$P' = \frac{ni}{S_x} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{t^2}{2}}$$

где, $t = \frac{\varphi_i - \bar{\varphi}}{S_x}$, $\bar{\varphi}$ – среднее значение φ_m , S_x – среднее квадратическое отклонение мембранного потенциала.

Нормальное распределение характерно для большинства показателей биологических величин в условиях отсутствия влияния на ее варианты (Lakin, 1990). Это свидетельствует о достоверности и высокой степени достоверной вероятности полученных вариантов измеренной величины.

По вычисленным частотам строили нормальное распределение числа клеток (Рис.1). Для сопоставления совокупностей эмпирических и теоретических частот φ_m пользовались критерием χ^2 Пирсона (Lakin, 1990), представляющим сумму квадратов отклонения эмпирических частот (P) от теоретических частот (P'), отнесенную к теоретическим частотам, т.е.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(P_i - P'_i)^2}{P'_i}$$

Оценка этой величины, по нашим эмпирическим данным, дала $\chi^2=16,75$. А теоретическое значение критической величины $\chi_{кр}^2$ для 0,5%-ного уровня значимости составило 16,75, т.е. $\chi^2 = \chi_{кр}^2$. Это означает, что распределение φ_m по классам соответствует нормальному распределению.

Аналогичные вычисления проведены для мембранного сопротивления. Распределения эмпирических и теоретических частот резко различались между собой. Распределения совокупности значений R_m не подчинялось закону нормального распределения. Отсутствовала корреляция между φ_m и R_m .

Коэффициент корреляции между этими величинами составлял $r = -0,019878$. В общей совокупности клеток преобладала доля клеток с увеличенной проводимостью.

Достигнутые стационарные уровни φ_m , R_m в стандартных условиях оказались устойчивыми в течение нескольких часов. Спонтанные переходы φ_m , R_m на другие уровни нами не обнаружены.

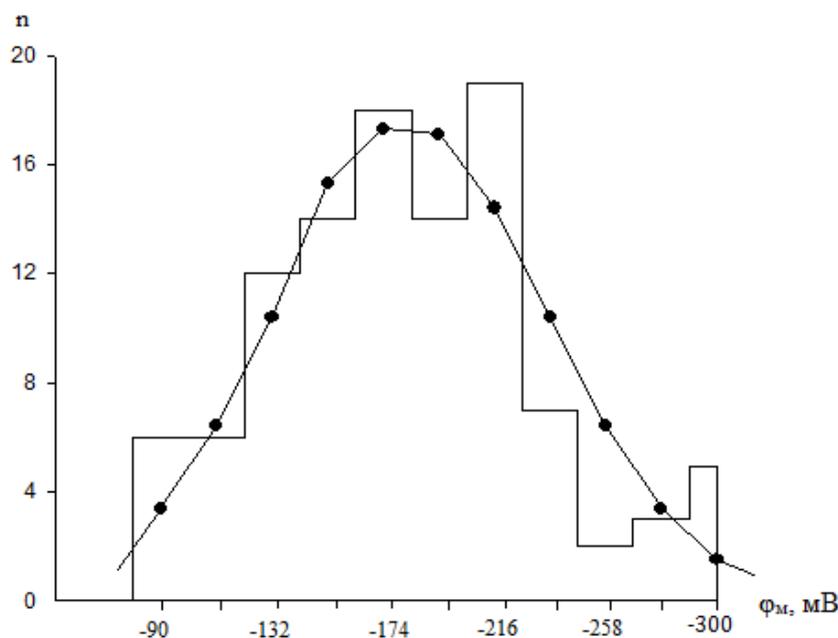


Рис.1. Гистограмма распределения мембранного потенциала φ_m *Chara fragilis* по числам клеток n . Непрерывной линией проведен ход теоретической зависимости нормального распределения.

Для определения пределов мембранного потенциала, в рамках которых функционируют K^+ -каналы различного типа, использовали повышение “ K^+ -нагрузки” плазматической мембраны. Зависимости φ_m и R_m от концентрации K^+ в среде отражались трехфазными кривыми (Рис.2). 1-ая фаза зависимости в диапазоне φ_m $-300 \div -145$ мВ вероятно отражала активацию K^+ -каналов внутреннего выпрямления, а 3-ая в диапазоне φ_m $-120 \div -50$ мВ - K^+ -каналов наружного выпрямления. Вторую фазу наверно можно называть переходной, т.к. вероятно именно в этой фазе происходит инактивация K^+ -каналов внутреннего и активация K^+ -каналов наружного выпрямления. Установленные диапазоны φ_m , отражающие состояния проводимости K^+ -каналов двух типов удовлетворительно согласуются с аналогичными параметрами других видов *Chara-Nitella flexilis* (Musayev, 2012; Musaev *et al.*, 2008), *Chara gymnophylla* (Musaev & Ismailov, 2007; Sokolik & Yurin, 1986), *Nitellopsis obtusa* (Musayev, 2012). Для названных клеток измеренный K^+ -равновесный потенциал в среде с 10^{-4} М K^+ соответствовал границе диапазонов активации двух видов K^+ -каналов. Согласно этому положению φ_k для *Chara fragilis* составит -162 мВ (Рис.2.). С учетом этой величины по формуле Нернста можно вычислить внутриклеточную активность ионов a_k , что составляла $61,6$ мМ. Полученная величина a_k значительно ниже, чем у клеток *Nitellopsis optusa* (Musayev, 2012). Однако она сопоставима с величиной

a_K , установленной для другого вида харовых – *Chara gymnophylla* (70 мМ) (Musayev, 2012).

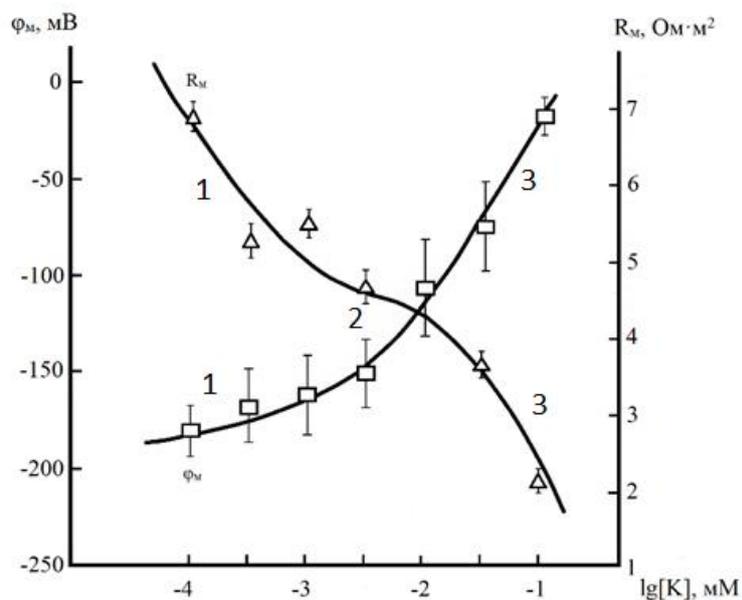


Рис.2. Зависимость стационарных значений потенциала ϕ_M и сопротивления R_M плазмалеммы клеток *Chara fragilis* от концентрации KCl в среде. Цифрами на кривых указаны отдельные фазы изменения соответствующих величин.

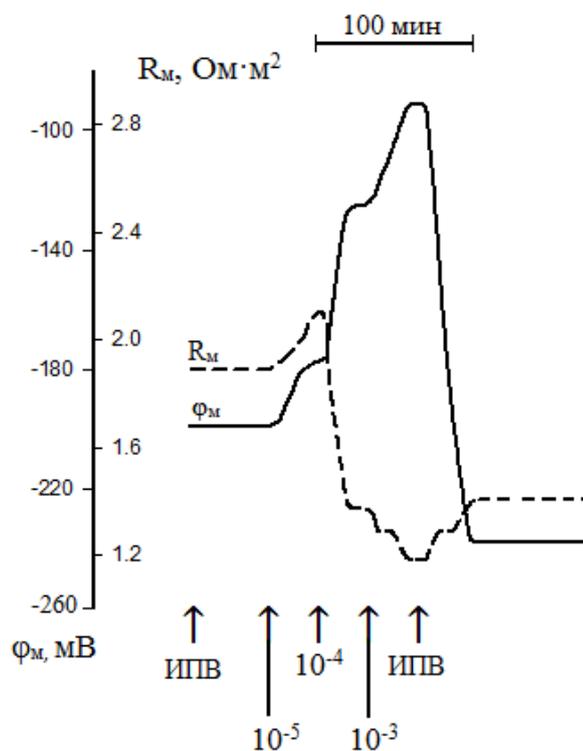


Рис.3. Потенциал ϕ_M и сопротивление R_M плазматической мембраны клеток *Chara fragilis* при действии ванадата. Стрелками указаны моменты включения соответствующих концентраций ингибитора в состав питательной среды (ИПВ). Размеры клетки: длина 7,1 мм, диаметр 0,325 мм.

Электрогенную составляющую мембранного потенциала определяли с использованием ванадата – типичного ингибитора H^+ - насосов плазмалеммы. Наиболее эффективная концентрация ингибитора оказалась 10^{-3} М. Добавление этой концентрации ингибитора в стандартную среду у клеток с исходным $\varphi_m = -250$ мВ вызывало деполяризацию плазматической мембраны на $-170 \div -180$ мВ (Рис.3). Это свидетельствует о значительном вкладе H^+ - насосов в электрогенную активность плазматической мембраны клеток *Chara fragilis*. Уменьшение R_m на фоне прогрессивной деполяризации плазматической мембраны отражает массивную активацию K^+ - каналов наружного выпрямления, что было обнаружено также в клетках *Chara gymnohylla* (Musaev *et al.*, 2008).

Для тестирования электрогенной активности клеток *Chara fragilis* при уменьшении шунтирующей нагрузки H^+ - насосов плазматической мембраны, в наших измерениях была использована йодовая соль тетраэтиламмония (TEA^+) – блокатора всех типов K^+ - каналов (Yurin *et al.*, 1991). Минимальная концентрация блокатора, которая вызывала первичную биоэлектрическую реакцию исследуемых клеток, была 10^{-7} М в среде. Электрофизиологическая реакция плазматической мембраны *Chara fragilis* на повышение в среде концентрации блокатора носила довольно сложный характер (Рис.4). При анализе кинетики электрофизиологической реакции необходимо учитывать многогранность блокирующего действия TEA^+ . Так на клетках *Nitella flexilis* (Vysotskaya *et al.*, 2005) и *Chara gymnohylla* (Musaev & Vorobiev, 1983) блокирование K^+ - каналов с использованием TEA^+ приводило к стимулированию H^+ - помпы плазматической мембраны и уменьшению её интегрального сопротивления. А на клетках *Nitellopsis obtusa* при воздействии блокатора на мембрану обнаружено также изменение её структурно-поляризационного состояния (Musaev & Vorobiev, 1983).

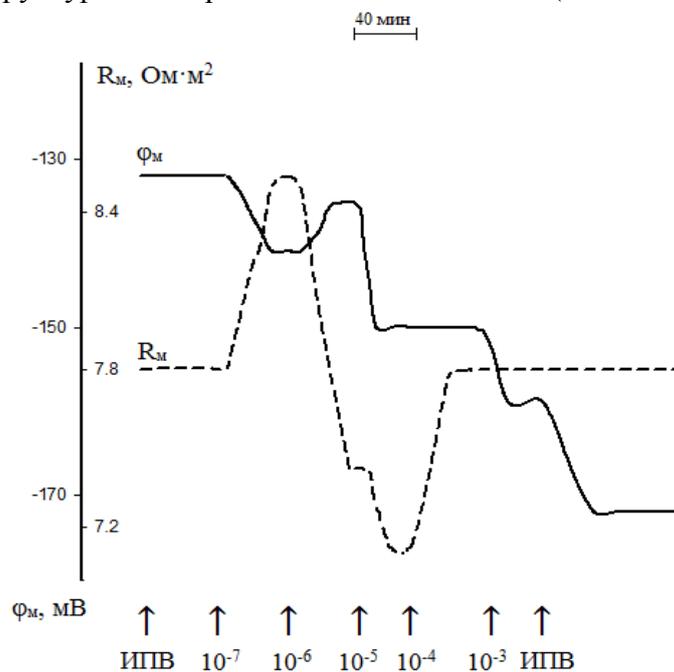


Рис.4. Изменения потенциала φ_m и сопротивления R_m плазматической мембраны клетки *Chara fragilis* при последовательном повышении концентрации TEA^+ - йодид в составе питательной среды от 10^{-7} до 10^{-3} М. Стрелками обозначены моменты добавления соответствующих концентраций блокатора в среду. Размеры клетки: длина 10,6 мм, диаметр 0,45 мм.

Подводя итоги вышеизложенному можно видеть, что междуузловые клетки *Chara fragilis* с устойчивыми электрофизиологическими параметрами могут служить в качестве нового удачного объекта для исследования мембранотропных действий ксенобиотиков, в том числе наночастиц, фитопротекторов, фармакологических агентов и других экзогенных стимулов. Установленные зависимости сопротивления и потенциала плазматической мембраны от концентрации K^+ в среде позволили выделить диапазоны мембранного потенциала, в пределах которых в проводящем состоянии находятся K^+ - каналы внутреннего или наружного направления. Ингибиторный анализ позволил определить долю электрогенной составляющей в суммарном мембранном потенциале. Таким образом осуществлена дифференциация мембранного потенциала на K^+ - каналы и H^+ - помпы. Значительные величины потенциала и сопротивления клеточной оболочки позволяют применить изолированные клетки *Chara fragilis* для исследований ионообменных свойств клеточной оболочки растений. Распределение потенциала и сопротивления по числам клеток в естественных условиях указывает на то, что значительную часть от общего числа составляет клетки с высокой электрогенной активностью.

Литература

- Demidchik, V.V. (2012). Membrane mechanisms for the regulation of the activity of calcium ions in the cytoplasm of cells of higher plants. Proceedings of the Belarus State University, series "Physiological, biochemical and molecular basis of biosystems", 7(1), 99-105 (in Russian).
- Gollerbakh, V.I., Krasavina, L.K. (1983). *The determinant of the freshwater algae of USSR*. Leningrad: Nauka, 185p. (in Russian).
- Hogg, J., Williams, E.J., Jhonston, R.I. (1968). A simplified method for measuring membrane resistances *Nitella translucens*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 150, 518.
- Lakin, G.F. (1990). *Biometrics*, Moscow, Visshaya Shkola, 352p. (in Russian).
- Musaev, N.A., Ismailov, E.R. (2005). Bioelectric characteristics of *Chara gymnophylla* cells. *Izv. NAS of Azerbaijan, Biological Sciences Series*, 3-4, 196-214 (in Russian).
- Musaev, N.A., Ismailov, E.R. (2007). Bioelectrical properties of *Chara gymnophylla* plasmamembrana during interaction with cobalt (Co^{2+}). *Ecology*, 63, 1-6.
- Musaev, N.A., Vorobiev, L.N. (1983). The state of K^+ -channels of plant cell membranes and regulation of their photoelectric activity. *Proc. of AS of Azerbaijan*, 3, 91-101 (in Russian).
- Musaev, N.A., Yurin, V.M., Sokolik, A.I. (2009). Potential, resistance and electrical capacitance of the plasma membrane of *Nitellopsis obtusa* cells under the action of diethylstilbestrol. Proceedings of the Belarus State University, series "Physiological, biochemical and molecular basis of functioning of biosystems", 4(1), Minsk, 74-78 (in Russian).
- Musaev, N.A., Yurin, V.M., Sokolik, A.I., Ismailov, E.R. (2008). Electrogenic activity of the plasma membrane of *Chara gymnophylla* cells at the blocking of K^+ -channels by tetraethylammonium. *News of Belarus State University*, 2, 46-49 (in Russian).
- Musayev, N.A. (2012). Biophysical mechanisms of modification of transport properties of the plasma membrane of plant cells. Doctoral dissertation. Baku, Institute of Botany, 336p. (in Russian)
- Sokolik, A.I., Yurin, V.M. (1986). Potassium channels in plasmalemma of *Nitella* cells at rest. *J. Membr. Biol.*, 89(1), 9-22.
- Véry, A.A., Sentenac, H. (2003). Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants. *J. of Annual Review of Plant Biology*, 54, 575-603.

- Volkov, G.A. (2006). *Plant Electrophysiology: "Theory and methods"*. Springer-Verlag-New-York, 264.
- Vysotskaya, Zh.V., Sokolik, A.I., Yurin, V.M. (2005). Interaction of the mechanisms of ion transport on the plasma membrane of plant cells: potassium channels and an electrogenic hydrogen pump. *News of Belarus State University Chemistry*, 2, 50-54 (in Russian).
- Yurin, V.M., Goncharik, M.N., Gallaktionov, S.G. (1977). *Ion transfer through the membranes of plant cells*. The Science and Technology Publishing House, 160p.
- Yurin, V.M., Sokolik, A.I., Kudryashov, A.P. (1991). *Regulation of the ion transport through plant cell membranes*. Minsk: Science and Technology, 272 (in Russian).

Published online: 16.04.2018