

ЭЛЕКТРОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *Chara gymnohylla* ПРИ БЛОКИРОВАНИИ K⁺-КАНАЛОВ ТЕТРАЭТИЛАММОНИЕМ

There is shown activation of proton pumps in the plasma membrane by blocking of potassium channels with tetraethylammonium of the freshwater algae cells of *Chara gymnohylla*. Increased blocker concentration inhibited proton pumps of these cells, membrane potential of which were on the range of activation of inward rectifying potassium channels. Blocking effect is discussed with the point of view of interaction tetraethylammonium with K⁺-channels and lipid phase of plasmalemma.

Тетраэтиламмоний (ТЕА) в качестве блокатора K⁺-каналов мембран растительных клеток применяется в течение последних 25 лет [1–4]. Однако незначительное количество исследований было посвящено изучению механизмов модификации транспортных свойств мембран растительных клеток в присутствии ТЕА. В частности, взаимодействие отдельных функциональных элементов ионтранспортирующей системы плазмалеммы в присутствии ТЕА было исследовано в работах, проведенных только на клетках *Nitella flexilis* [5, 6]. Данное взаимодействие может сказаться на функциональном состоянии H⁺-насосов плазмалеммы, а также проводимости K⁺-каналов. Причем изменение функционального состояния протонных насосов и K⁺-каналов плазмалеммы в присутствии ТЕА должно отразиться на электрических параметрах мембраны. Поэтому задачей настоящей работы был сравнительный анализ закономерностей изменения мембранного потенциала и сопротивления нового объекта электрофизиологических исследований – клеток *Chara gymnohylla* при действии ТЕА.

Материал и методика

Растения *Chara gymnohylla* семейства *Characeae* Ag. *Emand Hollerb* класса харовых водорослей, обнаруженные в горных водоемах Гей-гель и Айна-гель, выращены в лабораторных условиях в среде (ммоль/л): KН₂РO₄ – 0,1; СаСl₂ – 0,4; NaHCO₃ – 1; Mg(НО₃)₂ – 0,1; MgSO₄ – 0,1; рН – 7,2÷7,4 при освещении 6 Вт/м² и температуре 18±23 °С.

Клетки *Chara gymnohylla* имели диаметр в пределах 0,5÷0,8 мм, длину до 5 см.

Для одновременного измерения мембранного сопротивления (R_m) и потенциала (E_m) использовали двухэлектродный метод Хогга [7]. При этом с помощью одного внутриклеточного микроэлектрода (токового), введенного в середину клетки, и наружного металлического электрода (Ag – AgCl), расположенного вдоль клетки в измерительной камере, через клетку пропускали прямоугольные импульсы постоянного тока плотностью 10⁻⁴ А/м² и длительностью 2–3 с. С помощью второго внутриклеточного микроэлектрода (измерительного), введенного на фиксированном расстоянии от токового микроэлектрода, регистрировали E_m и его сдвиг (электротонический потенциал U) при пропускании тока через клетку. Сила тока контролировалась по падению напряжения на эталонном сопротивлении. Мембранное сопротивление клеток вычисляли по формуле $R_m = \frac{U}{I_0} \pi dL$, где I_0 – сила тока, пропускаемого через середину

клетки; d , L – диаметр и длина исследуемой клетки соответственно.

Измерения проводили в 6–7 повторностях, обобщение данных и их статическую обработку – на компьютере с помощью программы MS Excel-97.

Результаты и их обсуждение

Детальное описание стационарных значений мембранного потенциала и сопротивления *Chara gymnohylla*, а также разграничение отдельных функциональных состояний ионтранспортирующей системы плазмалеммы представлены в работе [8]. В частности, было показано, что диапазон мембранного потенциала для активации K⁺-каналов наружного выпрямления *Chara gymnohylla* составляет 165±50 мВ, а внутрь выпрямляющие K⁺-каналы активируются при $|E_m| > 165$ мВ. Установлен относительно низкий уровень активности K⁺ во внутриклеточной среде, равный 70 ммоль/л. Распределение E_m по числу клеток подчинялось закону нормального распределения со средним значением – 165 мВ. Величина R_m имела разброс в широком интервале от 1 до 12 Ом·м² со средним значением 4,51±1,55 Ом·м², а ее распределение не подчинялось закону нормального распределения.

Биоэлектрические реакции клеток *Chara gymnohylla* на добавление в среду тетраэтиламмония количественно и качественно определялись концентрацией блокатора и исходным уровнем E_m . Минимальная концентрация (пороговая), которая вызывала изменение E_m (на несколько милливольт) и R_m (в пределах 10 %), оказалась 10^{-7} моль/л. Существенные изменения мембранного потенциала и сопротивления были выявлены при концентрациях блокатора в среде 10^{-6} – 10^{-3} моль/л.

Для клеток, E_m которых находился в диапазоне активации наружу выпрямляющих K^+ -каналов, при увеличении концентрации TEA⁺ в среде с 10^{-7} до 10^{-3} моль/л плазмалемма гиперполяризовалась на 10–50 мВ в течение 40–60 мин (рис. 1). Изменение R_m при этом носило немонокотный характер. Однако общая тенденция изменения этого параметра состояла в уменьшении, и его конечный стационарный уровень в среде с добавлением 10^{-5} – 10^{-4} моль/л TEA оказался на 30–35 % ниже исходного значения.

По ходу зависимости отношения мембранных потенциалов клеток от концентрации блокатора в диапазоне 10^{-7} – 10^{-3} моль/л (рис. 2) резких изменений не обнаружено. Абсолютное значение E_m клеток в гиперполяризованном состоянии оказалось в 1,26 раза больше исходного уровня. Однако основное уменьшение R_m происходило в диапазоне концентрации блокатора 10^{-7} – 10^{-5} моль/л (см. рис. 2). Зависимость R_m от концентрации блокатора вышла на плато при 10^{-5} моль/л и далее оставалась на постоянном уровне в диапазоне 10^{-5} – 10^{-3} моль/л.

Гиперполяризация плазмалеммы *Chara gymnohylla* в пределах 25 мВ выявлена также у клеток, E_m которых находится в диапазоне активации K^+ -каналов внутреннего выпрямления (см. рис. 1). Это происходило только под влиянием низких концентраций блокатора 10^{-7} – 10^{-6} моль/л. Повышенные концентрации блокатора 10^{-5} – 10^{-3} моль/л у этих клеток вызвали деполяризацию плазмалеммы (рис. 1, 3), глубина которой в отдельных случаях достигала 50 мВ (см. рис. 3). Деполяризация плазмалеммы, следующая за первоначальной гиперполяризацией, происходила при постоянной величине R_m , а под действием 10^{-3} моль/л TEA выявилось даже увеличение R_m , сопровождаемое синхронным уменьшением E_m (см. рис. 3).

Анализируя разнообразие эффектов блокатора K^+ -каналов TEA на биоэлектрические характеристики *Chara gymnohylla*, можно выделить в основном две характерные особенности его действия:

1) гиперполяризацию плазмалеммы, сопровождаемую увеличением ее проводимости, на всех уровнях E_m при действии относительно низких концентраций (10^{-7} – 10^{-6} моль/л) блокатора (см. рис. 1);

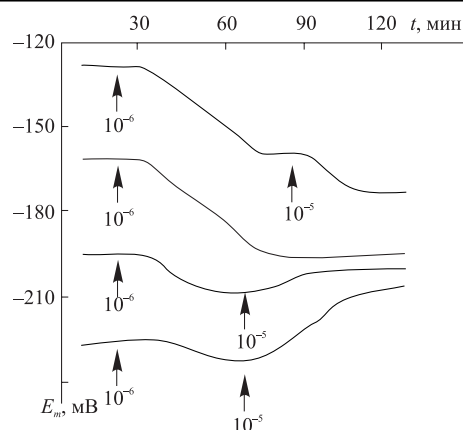


Рис. 1. Изменение мембранного потенциала клеток *Chara gymnohylla* под влиянием тетраэтиламмония.

Стрелками обозначены моменты добавления в среду соответствующих концентраций блокатора

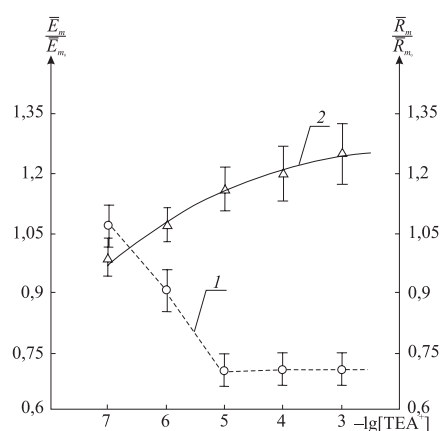


Рис. 2. Зависимость отношения сопротивлений $\bar{R}_m / \bar{R}_{m_0}$ и потенциалов $\bar{E}_m / \bar{E}_{m_0}$ плазмалеммы клетки *Chara gymnohylla* от концентраций TEA⁺ в среде.

1 – средние значения сопротивлений, 2 – мембранных потенциалов клеток в ИПВ и ИПВ + TEA⁺ соответственно

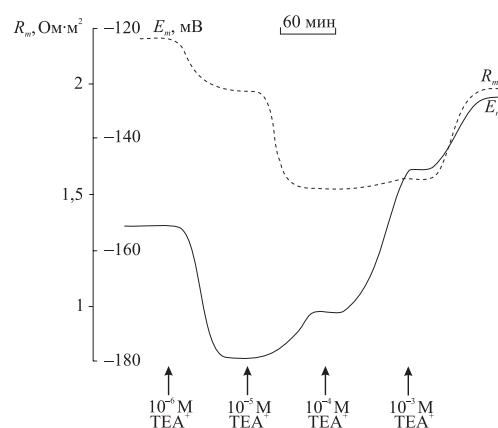


Рис. 3. Кинетика изменения мембранного сопротивления (R_m) и потенциала (E_m) клетки *Chara gymnohylla* при введении в среду тетраэтиламмоний иодида.

Стрелками указаны моменты добавления в состав питательной среды соответствующих концентраций TEA⁺

2) деполяризацию плазмалеммы при постоянном уровне R_m в диапазоне активации K^+ -каналов внутреннего выпрямления под влиянием относительно высоких концентраций блокатора (10^{-5} – 10^{-3} моль/л) (см. рис. 3).

Мембранный потенциал растительных клеток генерируется ионотранспортирующей системой, состоящей в основном из протонного насоса и K^+ -каналов. В результате анализа закономерностей изменения E_m и R_m под влиянием как модификаторов K^+ -каналов, так и ингибитора H^+ -насосов плазматической мембраны растительных клеток было установлено, что H^+ -насос работает в режиме генератора напряжения с низким внутренним сопротивлением [8]. Следовательно, K^+ -каналы плазмалеммы в нормальных условиях среды зашунтированы малым сопротивлением протонных насосов. Очевидно, что уменьшение общего R_m при гиперполяризации плазмалеммы нельзя отнести к эффекту K^+ -каналов. Участие неселективных путей переноса в уменьшении R_m под влиянием блокатора также исключается, так как их доля в общей проводимости в нормальных условиях не превышает 2–3 % [9]. Поэтому уменьшение R_m клеток *Chara gymnophylla* под влиянием TEA⁺ необходимо признать следствием снижения внутреннего сопротивления протонных насосов плазмалеммы. Отсюда следует, что обнаруженная нами гиперполяризация клеток *Chara gymnophylla* (см. рис. 1–3), сопровождаемая уменьшением R_m , является признаком усиления работы протонных насосов плазмалеммы в присутствии блокатора.

Относительно механизмов действия TEA⁺ на проводимость селективных путей транспорта растительных клеток и функциональную активность H^+ -насосов сведений в литературе немного. Усиление электрогенной активности плазмалеммы клеток *Nitellopsis*, сопровождаемое многократным увеличением ее мембранного сопротивления при действии 10^{-7} – 10^{-6} моль/л TEA, обсуждалось с точки зрения уменьшения шунтирующей нагрузки протонного насоса под влиянием блокатора [2, 10]. В случае *Chara gymnophylla* такая вероятность исключается из-за малого внутреннего сопротивления протонного насоса [8], которое снижалось дополнительно при воздействии блокатора. Однако усиление функциональной активности протонного насоса при блокировании K^+ -каналов – это достоверно установленный факт, обнаруженный также на клетках *Nitella flexilis* [5, 6]. В этих исследованиях [5, 6] четко продемонстрировано взаимовлияние протонного насоса и K^+ -каналов наружного и внутреннего выпрямления при их блокировании. Мы полагаем, что обнаруженное нами усиление функциональной активности протонных насосов плазматической мембраны *Chara gymnophylla*, сопровождаемое снижением их внутреннего сопротивления в присутствии TEA, также является результатом взаимовлияния этих двух функциональных элементов ионотранспортирующей системы плазматической мембраны.

Весьма примечательно, что стимулирующий эффект низких концентраций TEA качественно не зависел от исходного уровня E_m . Наоборот, подавление электрогенной активности под влиянием высоких концентраций блокатора (10^{-5} – 10^{-3} моль/л) наблюдалось у клеток, E_m которых находился в диапазоне активации внутрь выпрямляющих K^+ -каналов, что указывает на различную природу этих двух эффектов блокатора. Причиной подавления электрогенной активности под влиянием больших концентраций TEA может служить модификация физического состояния липидной фазы плазмалеммы, выражающаяся в изменении ее электрической емкости [10]. По всей вероятности, при больших концентрациях блокатора взаимодействие между молекулами мембранных липидов и TEA доминирует над взаимодействием между K^+ -каналами и H^+ -насосами плазмалеммы, что отражается в ослаблении функционального состояния протонных насосов, о котором свидетельствует также увеличение R_m при действии 10^{-3} моль/л TEA (см. рис. 3). Такое предположение подтверждается еще и тем, что при воздействии на клетки *Chara gymnophylla* органическим растворителем диметилсульфоксидом кинетика подавления E_m и изменения R_m точно совпадает с временным ходом этих параметров при действии 10^{-5} – 10^{-3} моль/л TEA в диапазоне активации K^+ -каналов внутреннего выпрямления [11].

Особенно значимыми выступают факты, свидетельствующие о высокой чувствительности плазмалеммы к низким концентрациям TEA (см. рис. 1, 2). Вероятно, это является характерной особенностью некоторых видов харовых, так как высокая чувствительность плазмалеммы к TEA выявлена также у клеток *Nitellopsis* [2, 10] и их протопластов [11], причем протопласты оказались чувствительными не только к 10^{-8} – 10^{-7} моль/л TEA, но также и к другому блокатору K^+ -каналов – Ba²⁺: эффект наблюдали при концентрации блокатора 10^{-8} моль/л [12].

Таким образом, модифицирующая способность блокатора K^+ -каналов тетраэтиламмония не ограничивается инактивацией проводимости K^+ -каналов на мембране; электростатическое взаимодействие K^+ -каналов с H^+ -насосами в присутствии блокатора может стимулировать работу протонного насоса, повышенные концентрации блокатора – оказывать ингибирующее влияние путем взаимодействия с мембранными липидами.

1. Соколик А.И., Юрин В.М. // Физиология растений. 1981. Т. 28. Вып. 2. С. 284.
2. Мусаев Н.А., Воробьев А.Н. // Известия АН АзССР. Сер. биол. наук. 1983. Вып. 3. С. 91.
3. Beilby M. // J. Membrane biol. 1986. Vol. 89. № 3. P. 241.
4. Tester M. // Ibid. 1988. Vol. 103. № 2. P. 159.
5. Sokolik A.I., Visotskaya Z.H., Krytynskaya E., Yurin V.M. // Developments in Plant And Soil Sciences. Vol. 92. Plant Nutrient. Food security and sustainability of agra ecosystems through basic and applied research. Hannover, 2001. P. 200.
6. Высоцкая Ж.В., Соколик А.И., Юрин В.М. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2005. № 2. С. 50.
7. Hogg J., Williams E.J., Jonston R.I. // Biochem. et Biophys. Acta. 1968. Vol. 150. P. 518.
8. Мусаев Н.А., Исмаилов Э.Р. // Изв. НАН Азербайджана. Сер. биол. наук. 2005. Вып. 3-4. С. 197.
9. Соколик А.И. // Докл. НАН Беларуси. 1999. Т. 43. Вып. 1. С. 77.
10. Мусаев Н.А. // Ксенобиотики и живые системы: Материалы II Междунар. науч. конф., Минск, 11–15 нояб. 2003 г. Мн., 2003. С. 214.
11. Исмаилов Э.Р., Мусаев Н.А. // Там же. С. 103.
12. Азимов Р.Р. // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ташкент, 1988. С. 15.

Поступила в редакцию 12.11 07.

Наги Мусаев – кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики и молекулярной биологии Бакинского государственного университета.

Владимир Михайлович Юрин – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, заведующий НИЛ физиологии растительной клетки.

Эльданиз Исмаилов – кандидат биологических наук, ассистент кафедры биофизики и молекулярной биологии Бакинского государственного университета.