УДК 581.352.3.04

ЭЛЕКТРОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ И ПРОВОДИМОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *Chara gymnophylla* ПРИ ДЕЙСТВИИ ВАНАДАТА АММОНИЯ

Н.А. Мусаев[1], А.И. Соколик[2], Г. Х. Бабаева[3]

[1]Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

[2]Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь

[3]Институт ботаники НАН Азербайджана, Баку, Азербайджан

Применение ванадата, ингибитора H^+ - насосов [1, 2] могло бы дать ценную информацию о возможном взаимодействии двух компонент ион–транспортной системы плазматической мембраны растительных клеток – H^+- насосов и K^+- каналов. Такие исследования особенно важны для нового объекта электрофизиологических исследований – клеток пресноводных водорослей *Chara gymnophylla*, так как сведения о транспортных свойствах плазматической мембраны этих клеток немногочисленны [3-4]. В связи с этим данная работа посвящена изучению электрогенных и диффузионных свойств плазматической мембраны *Chara gymnophylla* при действии различных концентрации ванадата аммония. Целью работы является мониторинг состояния K^+-каналов при ингибировании электрогенного транспорта, осуществляемого H^+- насосами плазмалеммы. Показателем электрогенной активности плазматической мембраны исследуемых клеток в наших исследованиях служил мембранный потенциал φ_M , а показателем интегральной проводимости – мембранное сопротивление R_M.

Объект и методы исследования

Описание условий выращивания клеток *Chara gymnophylla* и измерения их биоэлектрических параметров даны в работах [3, 4]. Питательной средой была искусственная прудовая вода (ИПВ), содержащая (mM): KH_2PO_4 – 0,1; $CaCl_2$ – 0,4; $NaHCO_3$ – 1,0; $Mg(NO_3)_2$ – 0,1; $MgSO_4$ – 0,1; pH = 7-7,5.

Величины φ_M и R_M измеряли по двухэлектродной методике Хогга [5, 6]. При этом с помощью одного из микроэлектродов (токовый) и наружного металлического электрода (Ag – AgCl-электрод) через исследуемую клетку пропускались импульсы постоянного тока длительностью 2 -3 с, плотностью 10^{-4} А/м^2. φ_M и его сдвиг (электротонический потенциал) измеряли с помощью второго микроэлектрода. Мембранное сопротивление вычисляли по значениям электротонического потенциала и силе пропускаемого через клетку тока, который контролировался с помощью специального канала усиления. Измерения проводились при температуре 21± 2^{o}C.

Результаты и их обсуждение

Мембранный потенциал φ_M исследуемых нами клеток находился в пределах -118÷-220 мВ со средним значением -169±6 мВ. Электрическое сопротивление R_M клеток в нормальных условиях среды также варьировало в широком диапазоне- 2-7,8 Ом м^2, со средним значением 3,6±0,4 Ом м^2 (число клеток 28). Минимальная концентрация

ингибитора, которая вызывала заметную деполяризацию плазмалеммы, составляла 5×10^{-5} М. Увеличение концентрации ингибитора в среде до 10^{-4} М приводило к деполяризации плазмалеммы на 50÷90 мВ в течение 15÷35 мин (рис. 1).

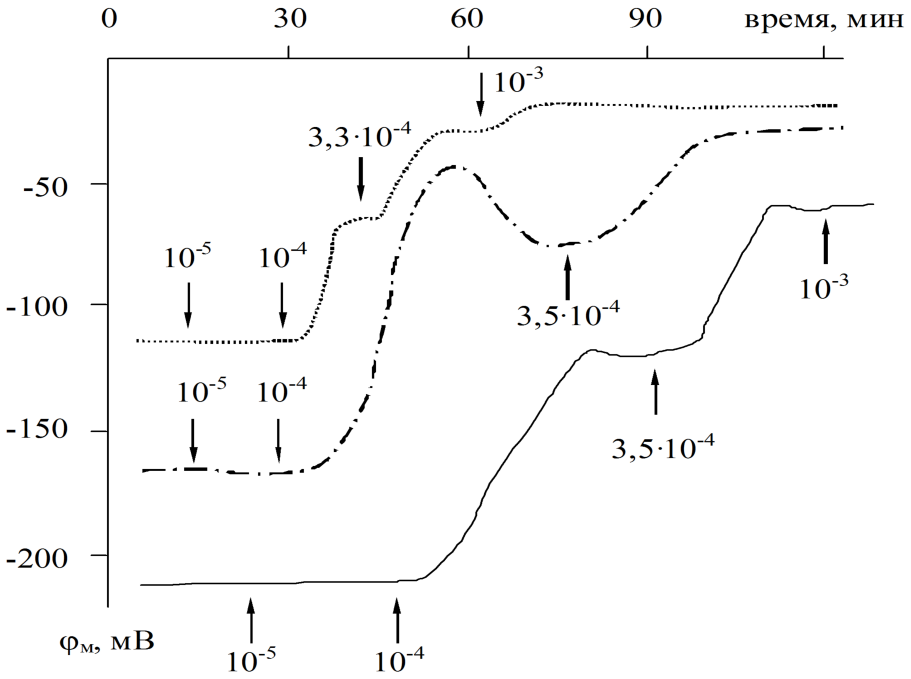

Рисунок 1 – Кинетика изменения мембранного потенциала φ_M клеток *Chara gymnophylla*, при действии различных концентраций (моль/л) ингибитора протонных насосов плазматической мембраны ванадата аммония. Разные кривые отвечают разным исходным уровням мембранного потенциала. Стрелками указаны моменты добавления соответствующих концентраций ингибиторов в среду

При увеличении концентрации ингибитора в среде до $3{,}3\times10^{-4}$ М (рис. 1), глубина деполяризации плазматической мембраны клеток увеличивалась еще на 15÷40 мВ в течение 15-20 мин. Величина деполяризации плазмалеммы под влиянием наиболее эффективной концентрации 10^{-3} М зависела от исходного уровня φ_M и находилась в пределах – 90 – 160 мВ. Большую величину деполяризации наблюдали для клеток с большим исходным мембранным потенциалом (рис. 1). При концентрации VO_3 питательной среде равной 10^{-3} М мембранный потенциал φ_M клеток снижался практически до уровня потенциала клеточной оболочки (рис. 1). Деполяризующие эффекты повышенных концентраций по величине оказались одинаковыми для необработанных и предварительно обработанных малыми концентрациями ингибитора клеток. Конечные уровни мембранных потенциалов исследуемых клеток в среде с концентрацией ванадата 10^{-3}М расположились в интервале шириной 40 мВ (рис. 1).

Деполяризация плазматической мембраны под влиянием VO_3^- для 89 % клеток из общей совокупности сопровождалась монотонным снижением R_M. Относительное уменьшение R_M для этих клеток под влиянием 10^{-4} М ингибитора в течение 40-50 мин

составляло 15-20 %. С ростом концентрации ингибитора в среде до $3{,}3\times10^{-4}$ М R_M клеток уменьшалось еще на 10-20 % в течение 50-60 мин. Относительное уменьшение R_M клеток под влиянием наиболее эффективной концентрации ингибитора 10^{-3} М находилось в пределах 15-50 %. Величина R_M для 11 % от общей совокупности клеток при введение в среду ванадата не изменялась. Распределение этих клеток по величине мембранного потенциала не имело каких либо отличающихся признаков от распределения φ_M остальных клеток.

Удаление ингибитора из раствора искусственной прудовой воды сопровождалось восстановлением величин φ_M, и R_M исследуемых клеток. Однако φ_M исследуемых клеток восстанавливался, как правило, до уровней, превышающих исходный на 10-15 мВ. Наоборот, конечные уровни R_M исследуемых клеток в нормальных условиях среды после ингибиторной обработки оказались на 10-15 % ниже исходных значений. Таким образом, при отмывании клеток от ингибитора восстановление биоэлектрических параметров точно до исходных уровней не происходило. С другой стороны, эффекты ингибитора количественно зависели от его концентрации в среде (рис. 2).

Очевидно, что действие ингибитора на биоэлектрические параметры связаны с его влиянием на ионтранспортную систему плазматической мембраны исследуемых клеток. В существующей литературе мало сведений об ионтранспортной системе клеток *Chara gymnophylla*, так как они недавно внедрены в исследовательскую практику [1, 2]. Тем не менее, установленные нами данные по влиянию специфического ингибитора протонных насосов на биоэлектрические параметры клеток *Chara gymnophylla* (рис. 1) свидетельствуют о высокой чувствительности их ионтранспортной системы к внешним воздействиям. С другой стороны, деполяризация плазмалеммы клеток практически до уровня потенциала клеточной оболочки (рис. 1) свидетельствует о значительном вкладе протонных насосов в мембранный потенциал. Об этом могут свидетельствовать недавно изученные K^+-характеристики мембранного потенциала клеток *Chara gymnophylla* [3], которые показывают, что в широком диапазоне мембранного потенциала проводимость насосов доминирует над проводимостью K^+-каналов плазматической мембраны.

Согласно модели электрогенного транспорта «насос утечка» [7], мембранный потенциал может быть представлен следующим уравнением:

,

где φ_H, R_H и φ_g, R_g – величины электрического потенциала и сопротивления протонных насосов и утечки (пассивной проводимости мембраны) соответственно.

Из приведенной формулы следует, что при $R_H/R_g \ll 1$ мембранный потенциал задается, в основном, электрогенной активностью протонных насосов т.е.

Полученные нами данные полностью согласуются с этим положением модели «насос – утечка», которая может служить критерием для разграничения отдельных функциональных состояний протонных насосов растительных клеток. Весьма примечательным в этой связи является уменьшение мембранного сопротивления во время деполяризации клеток, тогда как

инактивация H^+– насосов плазмалеммы под влиянием ингибитора должна была привести к увеличению R_M. Следовательно, установленный нами факт уменьшения R_M при действии ванадата выглядит аномальным. Однако если учесть потенциал-зависимость проводящего состояния K^+- каналов, обнаруженный факт находит свое объяснение. Так, при рассмотрении K^+- характеристик мембранного потенциала и сопротивления клеток *Chara gymnophylla,* было установлено, что в промежутке φ_M от -160 до -50 мВ, происходит потенциалзависимая активация наружу выпрямляющих K^+- каналов [1]. Поэтому можно предположить, что уменьшения φ_M и R_M при действии ванадата (рис. 2) является результатом потенциалзависимой активации наружу выпрямляющих K^+- каналов. Для тех клеток, у которых R_M не реагировало на введение в среду ванадата (11 % от общей совокупности), по-видимому, потенциалозависимая активация наружу выпрямляющих K^+- каналов компенсируется инактивацией проводимости протонных насосов плазматической мембраны клеток.

Установленные факты свидетельствуют о тесной взаимосвязи двух основных компонент ионтранспортной системы плазматической мембраны, могут быть использованы при построении общей теории взаимодействия ксенобиотиков с биологическими мембранами. Проявленная высокая чувствительность клеток *Chara gymnophylla* к малым концентрациям

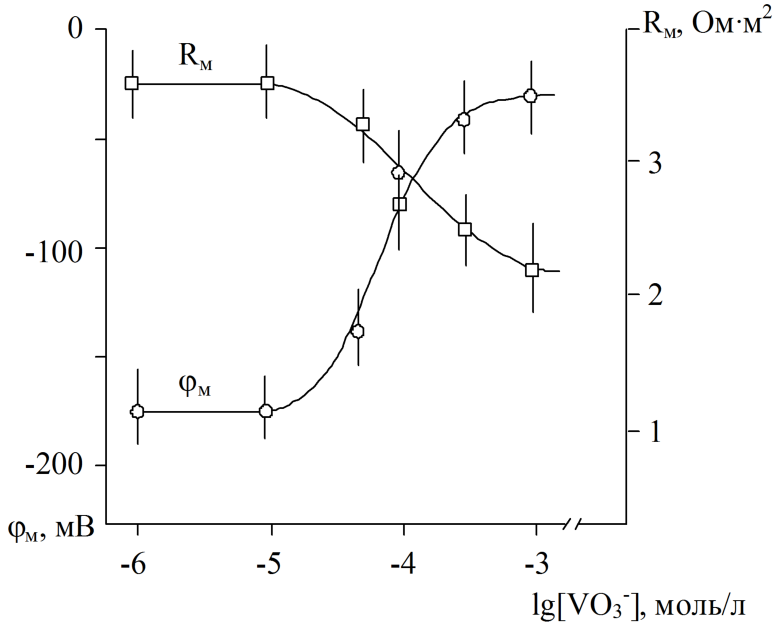

Рисунок 2 – Зависимость мембранного потенциала $_м$ и сопротивления R_M клеток *Chara gymnophylla* от логарифмы концентрации ингибитора протонных насосов плазматической мембраны – ванадата аммония

ингибитора может быть привлечена для экспресс - диагностики ионтранспортной системы растительных клеток.

Литература

1. Ларская И. А., Заботин А. И. Исследование изменения активности протонной помпы плазмалеммы при низкотемпературном закаливании проростков озимый пшеницы. // Вестник Башкирского Университета, 2001, №2, с.87-90.
2. Опритов В. А. Н+-АТФ фаза плазматической мембраны – основная электрогенная система высших растений. // Биология 2000, т.6., № 3, с.28-32
3. Мусаев Н. А., Исмайлов Э. Р. Биоэлектрические характеристики клеток Chara gymnophylla. Известие НАН Азербайджана, Серия биологические науки, 2005, №3-4, с.196-214.
4. Musayev N. A., Ismailov E. R. Bioelectrical properties of Chara gymnophylla Plazmamembrane during interaction with cobalt (Co2+). // Ecology, 2007, № 63, p. 1-6.
5. Hogg J., Williams E. J., Johston R. I. A simplified method for measuring membrane resistances Nitella transluenens. // Biochim et Biophys. Acta, 1968, v. 150, p. 518-521.
6. Volkov G. A. General cable Theory for cells of Algae Characeae. // Biochim et Biophys. Acta, 1972., v. 255, p. 709-719.
7. Юрин В. М., Соколик А. И., Кудряшов А. П. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. 1981, Минск, Наука и техника, 1991, 272.

ELECTROGENIC ACTIVITY AND CONDUCTIBILITY PLASMA MEMBRANE *CHARA GYMNOPHYLLA* CELLS UNDER VANADATE INFLUENCE

N.A. Musaev[1], A.I. Sokolik[2], G.H. Babaeva[3]

[1]Baku State University, Baku, Azerbaijan. [2]Belarusian State University, Minsk, Belarus
[3]Institute of Botany Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan

Changes of membrane potential (φ_M) and resistance (R_M) of plasma membrane of *Chara gymnophylla* cells under ammonium vanadate influence were investigated.

With increase of inhibitor`s concentration in the medium in range 5×10^{-5}-10^{-3} M plasmalemma of cells was depolarized up to level of cell wall potential. Depth of depolarization varied in limits 90-160 mV. Depolarization of plasmalemma was accompanied by decreasing of membrane resistance for 89 % of cells within the limits of 15-50 % .

Effects of inhibitor is discussed from the point of view of interaction of membrane ion-transport systems, when suppression H^+-pumps of plasma membrane is accompanied by potential-dependence activation of outside-rectified K^+ -channels.