

**ПОТЕНЦИАЛ, СОПРОТИВЛЕНИЕ И ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ЕМКОСТЬ
ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *NITELLOPSIS OBTUSA* ПРИ
ДЕЙСТВИИ ДИЭТИЛСТИЛБЕСТРОЛА**

Н.А. Мусаев*, В.М. Юрин, А.И. Соколик****

*Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджанская Республика

**Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Дифференциация вклада отдельных компонентов в мембранный транспорт, в большинстве случаев, осуществляется ингибиторами отдельных транспортных систем, среди которых часто употребляются липофильные ксенобиотики — ингибиторы H^+ -АТФазы [1-3]. Липофильность этого класса веществ может привести к проникновению их молекул в углеводную часть плазматической мембраны, что должно отразиться в изменениях физического состояния липидной фазы. Следовательно, кроме прямого взаимодействия этих ингибиторов с молекулами H^+ -АТФаз возможно их опосредованное влияние на функциональную активность H^+ -АТФазного комплекса через липидную фазу.

Одним из показателей физического состояния липидной фазы плазматической мембраны является ее электрическая ёмкость [4, 5]. Поэтому изменение физического состояния липидной фазы под влиянием названных ингибиторов должно отразиться в изменениях ёмкости плазматической мембраны.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы была обнаружение возможных изменений электрической ёмкости (C_m) при воздействии на плазматическую мембрану диэтилстильбестрола (ДЕС), ингибитора протонных насосов плазматической мембраны растительных клеток. Показателем функциональной активности H^+ -насосов плазматической мембраны в этой работе служил мембранный потенциал (ϕ_m). Измерялись мембранный потенциал ϕ_m и импеданс. Для определения ёмкости, C_m , выделяли ёмкостное сопротивление, путем дополнительного измерения активной составляющей импеданса плазматической мембраны – мембранного сопротивления постоянному току, R_m .

Методы исследования

Для измерения указанных параметров плазматической мембраны пользовались клетками водорослей *Nitellopsis obtusa*. Условие выращивания клеток и измерения комплекса их биоэлектрических параметров даны в работах [6, 7].

Питательной средой была искусственная прудовая вода (ИПВ), содержащая (10^{-3} моль/л): $KH_2PO_4 - 0,1$; $CaCl_2 - 0,4$; $NaHCO_3 - 1,0$; $Mg(NO_3)_2 - 0,1$; $MgSO_4 - 0,1$; $pH=7-7,5$.

Для измерения C_m , ϕ_m , R_m с помощью одного внутриклеточного микроэлектрода, введённого в середину клетки и наружного металлического электрода ($Ag-AgCl$) через исследуемую клетку пропускались прямоугольные импульсы постоянного тока длительностью 2-3 с, плотностью 10^{-4} А/м² и переменный ток частотой $18 \div 1000$ Гц; ϕ_m , его сдвиг (электротонический потенциал) и переменное падение напряжения измеряли с помощью второго микроэлектрода.

Разделение сигналов переменной частоты и прямоугольных импульсов осуществляли с помощью операционных усилителей. Мембранное сопротивление вычисляли по значениям электротонического потенциала и силе тока пропускаемого через клетку. Выделение ёмкостного сопротивления X_c из общего импеданса осуществили по данным амплитудно-частотных характеристик. Измерение проводились при температуре $21 \pm 2^{\circ}C$.

Результаты и обсуждение

Значения мембранного потенциала клеток в нормальных условиях среды находились в диапазоне $-238 \div -118$ мВ, со средним значением $\varphi_M = -168 \pm 11$ мВ (число клеток 17). Мембранное сопротивление этих клеток находилось в пределах $3,3,2 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$; среднее значение $R_M = 4,8 \pm 0,6 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$. Среднее значение электрической емкости мембраны составляло $C_M = 0,93 \pm 0,1 \text{ мкФ} \cdot \text{см}^2$.

Пороговая концентрация ингибитора в среде, которая вызывала изменение электрических параметров плазматической мембраны, оказалась 10^{-5} моль/л. Десятикратное увеличение концентрации ингибитора в среде вызывало необратимое уменьшение величины φ_M в течение 40-50 мин. Мембранное сопротивление при этом сначала возрастало на 30-40%, а затем уменьшалось до уровня сопротивления клеточной оболочки. Уменьшение мембранного сопротивления сопровождалось также необратимым уменьшением до уровня клеточной оболочки суммарного импеданса плазматической мембраны. Оптимальная концентрация ингибитора в среде, максимально подавляющая помпу, но не вызывающая гибель клеток, оказалась равной 4×10^{-5} моль/л. Таким образом, рабочие концентрации ингибитора оказались в узком диапазоне, что затрудняло установление зависимостей величины изменения φ_M , R_M , C_M от концентрации ДЭС.

Добавление в среду пороговой концентрации ингибитора вызывало у клеток с исходным значением потенциала $|\varphi_M| > 140$ мВ деполяризацию плазматической мембраны на $20 \div 30$ мВ в течение 30 мин (Рис. 1).

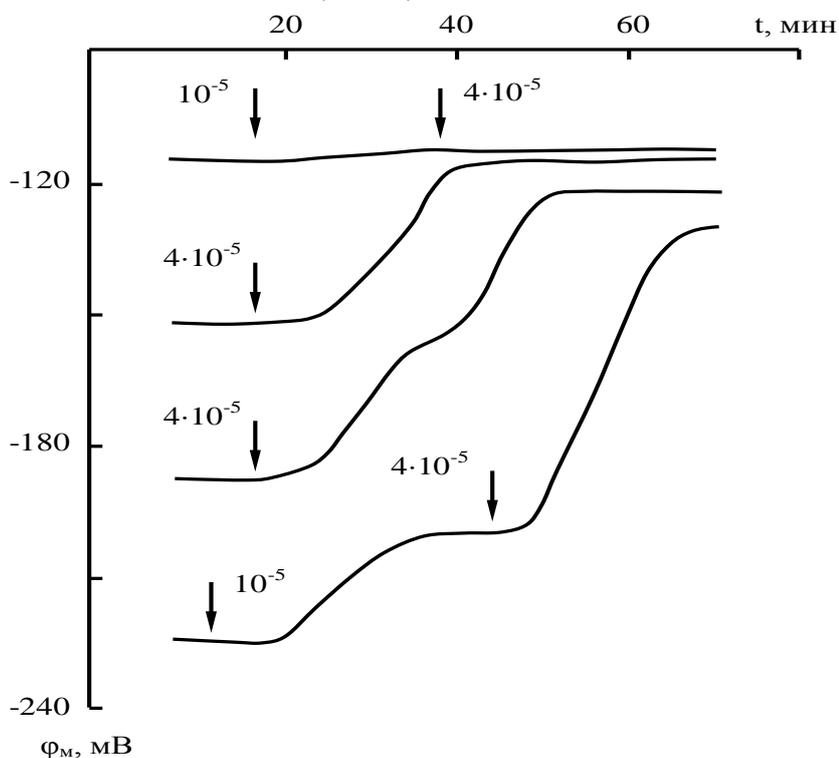


Рисунок 1 – Деполяризация плазматической мембраны *Nitellopsis obtusa* под влиянием диэтилстилбестрола. Стрелками указаны моменты добавления соответствующих концентраций (моль/л) ингибитора в среду.

Независимо от исходного уровня мембранного потенциала, при действии оптимальной концентрации ингибитора 4×10^{-5} моль/л, значения φ_M оказались в диапазоне активации наружу выпрямляющих K^+ -каналов. Конечные уровни мембранных потенциалов исследуемых клеток в среде с 4×10^{-5} моль/л ДЭС расположились в диапазоне шириной 20 мВ (рис. 1).

Деполяризация клеток под влиянием ингибитора сопровождалась увеличением мембранного сопротивления до нового стационарного уровня (рис. 2).

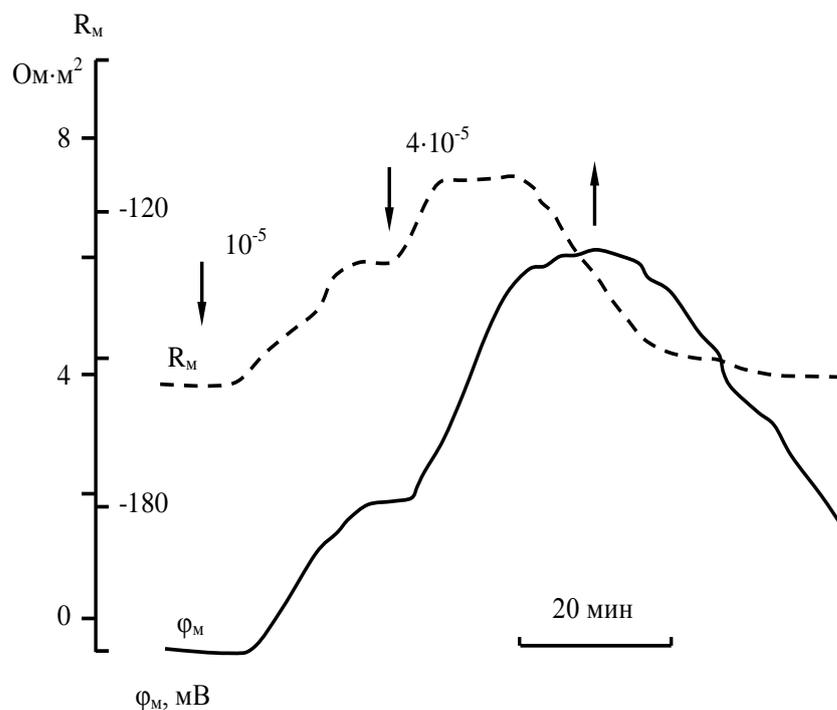


Рисунок 2 – Изменения потенциала ϕ_M и сопротивления R_M плазматической мембраны клетки *Nitellopsis obtusa* при действии диэтилстилбестрола. Стрелками вниз указаны моменты введения соответствующих концентраций (моль/л) в среду. Стрелкой вверх указаны момент исключения ингибитора из состава питательной среды.

Стационарный уровень R_M в среде с 10^{-5} моль/л ДЭС оказался на 40-50%, выше исходного уровня в ИПВ. При дальнейшем, 4-х кратном увеличении концентрации ингибитора в среде R_M сначала возрастало еще на 25-30%, а затем следовало фаза спада R_M на фоне прогрессирующей деполяризации плазматической мембраны (Рис. 2). Максимальный уровень R_M зафиксирован при $\phi_M \approx -165$ мВ, что соответствовало границе диапазонов активации двух типов K^+ -каналов для клеток *Nitellopsis obtusa*.

Изменения электрогенной активности плазматической мембраны под влиянием ДЭС сопровождалось также изменением ее электрической емкости. Анализ амплитудно-частотной характеристики импеданса плазматической мембраны показал уменьшение электрической емкости плазмалеммы: при действии 10^{-5} моль/л ДЭС на $14,6 \pm 1,8\%$, а при 4×10^{-5} моль/л – на $27,3 \pm 3,1\%$.

При удалении ингибитора из состава питательной среды происходило постепенное восстановление параметров мембраны. Быстрее всего (в течение 30 мин) до исходного уровня восстанавливалось мембранное сопротивление. Восстановление параметров ϕ_M и C_M до исходных значений (после удаления ингибитора из состава питательной среды) происходило значительно дольше, в течение 50-60 мин.

Резюмируя выявленные закономерности изменения электрических параметров плазматической мембраны *Nitellopsis obtusa* под влиянием ДЭС можно заметить следующие три особенности действия ингибитора:

I. Значительная деполяризация мембраны (рис.1, 2);

II. Двухфазное характер (первоначальное увеличение и последующее уменьшение) изменения мембранного сопротивления (рис. 2);

III. Уменьшение мембранной емкости, отражающее изменение физического состояния липидной фазы мембраны.

Деполяризация плазматической мембраны под влиянием ДЭС до уровня, который оказался на 30-105 мВ ниже исходного значения ϕ_M явно свидетельствует об

ингибировании протонных насосов. Ингибирование фермента, т.е. H^+ -АТФазы плазматической мембраны происходит путем блокирования H^+ -канального домена молекулой ингибитора [1, 2]. С другой стороны, привлекает внимание существенное уменьшение мембранной емкости под влиянием ингибитора. Это свидетельствует об изменении физического состояния липидной фазы плазматической мембраны. Липидная фаза является стерическим регулятором функциональной активности мембранных белков [8, 9]. Поэтому ингибирование протонных насосов могло бы произойти также в результате изменения физического состояния мембранных липидов, приводящего к изменению функциональной активности белка. Поскольку H^+ -канальный домен молекулы H^+ -АТФазы целиком погружен в липидную фазу плазматической мембраны [10, 11], можно предположить, что блокирование H^+ -канального домена H^+ -АТФазы молекулой ДЭС является результатом разрушения пространственно активной конформации канала в результате изменения физического состояния липидного окружения.

С точки зрения электростатики, уменьшение мембранной емкости возможно за счет уменьшения диэлектрической проницаемости или увеличения толщины плазматической мембраны. В наших измерениях, в некоторых опытах под влиянием 4×10^{-5} моль/л ДЭС выявлено уменьшение мембранной емкости более чем на 40%. Это равносильно увеличению толщины или уменьшению диэлектрической проницаемости плазматической мембраны в 1,4 раза. Такое увеличение толщины мембраны могло бы привести к разрушению мембранной структуры и серьезной модификации ее ионтранспортных свойств. В наших экспериментах оптимальная концентрация ДЭС - 4×10^{-5} моль/л обратимо действовала на биоэлектрические параметры плеток *Nitellopsis obtusa*, что свидетельствует о полном восстановлении структурно-функционального состояния плазматической мембраны после удалении ингибитора из питательной среды. Отсюда более вероятным является уменьшение диэлектрической проницаемости за счет включения липофильных молекул ДЭС в липидную фазу плазмалеммы путем вытеснения молекул воды. Такое замещение молекулы воды на молекулу ингибитора могло бы привести к уменьшению диэлектрической проницаемости плазматической мембраны, т.к. диэлектрическая проницаемость большинства органических соединений на один порядок меньше диэлектрической проницаемости воды. Уменьшение диэлектрической проницаемости плазмалеммы должно отразиться в уменьшении мембранной емкости, что и происходило в наших опытах под влиянием ингибитора протонных АТФаз плазматической мембраны.

Предполагаемое увеличение диэлектрической проницаемости плазматической мембраны за счет вытеснения молекул воды из состава липидной фазы не исключает вероятность увеличения толщины мембраны. Такая вероятность оправдана тем, что молекулы ДЭС по размерам во много раз превышают размеры молекулы воды. Поэтому замещение воды в липидной фазе плазматической мембраны на ДЭС должна отразиться также в размерах мембраны. Можно полагать, что в уменьшение мембранной емкости плазматической мембраны под влиянием ДЭС вносит вклад также увеличение толщины мембраны.

Весьма примечательным является двухфазное изменение мембранного сопротивления во время инактивации H^+ -АТФаз при действии ДЭС (Рис. 2). В диапазоне активации внутрь выпрямляющих K^+ -каналов действие ингибитора вызывало увеличение мембранного сопротивления (Рис. 2). Вероятно в этом диапазоне проводимость H^+ -насосов доминирует над проводимостью K^+ -каналов внутреннего выпрямления плазматической мембраны. Поэтому подавление H^+ -насосов приводит к уменьшению насосного тока и увеличению мембранного сопротивления. Последующий спад мембранного сопротивления, после фазы его увеличения, несомненно, отражает активацию K^+ -каналов выходящего выпрямления, которая происходит в диапазоне мембранного потенциала $-170 \div -60$ мВ.

Таким образом исследование закономерностей изменения комплекса электрических параметров при действии диэтилстилбестрола показало, что ингибирование H^+ -АТФазы плазматической мембраны может сопровождаться изменением структурно-поляризационного состояния липидной фазы. Это может служить одной из причин инактивации фермента под влиянием ингибитора. Помимо этого, можно видеть, что мембранная ёмкость может выступать весьма чувствительным показателем структурной лабильности при модификации транспортных свойств плазматической мембраны растительных клеток. Совокупность установленных фактов свидетельствует об эффективном взаимодействии двух основных компонентов ион-транспортной системы плазматической мембраны – H^+ -АТФазы и K^+ -каналов.

Список литературы

1. McEnery M.W., Pederson P.L. Diethylstilbestrol. A Novel Fo – Directed Probe of the Mitochondrial Proton ATPase.// *Yourn.Biol. Chem.*1986,V.261.P. 1745-1752
2. Луньков Р.В., Андреев И.М., Мясоєдов Н.А., Хайлова Г.Ф., Куркова Е.Б., Балконин Ю.Б. Функциональная идентификация H^+ -АТФазы и Na^+/H^+ - антипортера в плазматической мембране , выделенной из клеток корня соленокопчивающего галофита *Snaeda altissim*// *физиология растений* , 2005,Т.52., N5, с.715-725.
3. Мусаев Н.А. Лабильность электрической ёмкости плазматической мембраны клеток *Nitellopsis* при модификации транспортных свойств ксенобиотиками. // *Ксенобиотики и живые системы*. 2008, Мат. III Межд. Научной конф. 22-24 окт. 2008, Минск. С. 101-103.
4. Алмерс В. Воротные токи и движение зарядов в возбудимых мембранах. Мембраны: Ионные каналы, сборник статей , Изд. «Мир» , М., 1981, с. 129-236.
5. Chin-Chin Lu, Kabakov A., Markin V.S.,Mager S.,Fravier G., Hilgemann W. Membrane transport mechahisms probed dy capacitance measuvements with megahertz voltage clamp.// *Proced. Natl. Acad. Sci USA*. 1995, Vol 92, P: 11220-11224.
6. Воробьёв Л.Н., Мусаев Н.А. Электрические характеристики плазмалеммы и клеточной оболочки клеток *Nitellopsis obtusa* . Низкочастотный импеданс.// *Физиология растений*, 1979, т. 26, N. 4, с. 711-720.
7. Мусаев Н.А., Воробьёв Л.Н. Электрогенная активность и структурная лабильность плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при повышенных температурах. // *Физиология растений* , 1981, N.1, с. 86-93.
8. Болдырев А.А Введение в биомембранологию , 1990, М., изд. МГУ, 206 с.
9. Соколов В.С., Павлов К.В., Джанджугазян К.Н., Бамберг Е. Изменение ёмкости и проводимости модельной мембраны при функционировании Na^+ , K^+ -АТФазы. // *Биологические мембраны* , 1992, Т.9., N.9., 961-969.
10. Morsomme P., Bontry M. The plant plasma membrane H^+ -ATPase. Structure, function and Regulation.// *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, V.1465., p.1-16.
11. Блюменфельд Л.А. Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики, 2002, М., Едиториал УРСС, 160 с.