

УДК 581.17;581.192.7
AGRIS F30

<https://doi.org/10.33619/2414-2948/87/02>

**ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕАКЦИЙ ПЛАЗМАЛЕММЫ
КЛЕТОК *Nitellopsis obtusa* ПРИ СЕЛЕКТИВНОЙ МОДИФИКАЦИИ
ЕЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ**

©*Махмудова Ш. С., Институт ботаники НАН Азербайджана,
г. Баку, Азербайджан, mayhmudovashirin656@gmail.com*

**ELECTROPHYSIOLOGICAL ANALYSES OF THE PLASMALEMMA REACTIONS
OF *Nitellopsis obtusa* CELLS AGAINST SELECTIVE MODIFICATION
OF ITS STRUCTURAL AND FUNCTIONAL COMPONENTS**

©*Makhmudova Sh., Institute of Botany Azerbaijan National Academy of Sciences,
Baku, Azerbaijan, mayhmudovashirin656@gmail.com*

Аннотация. Проведено сопоставление кинетики изменения мембранного потенциала (φ), сопротивления (R_m) и мембранной емкости (C_m) при модификации структурно-функциональных компонентов плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa*. Для электрогенной помпы плазмалеммы установлены: ток короткого замыкания $0,09 \text{ A/m}^2$, внутреннее сопротивление $4 \text{ Ом} \times \text{м}^2$, электродвижущей силы — 360 мВ . Анализом кинетики изменения φ , R_m , C_m при модификации структурно-функциональных компонентов плазмалеммы выявлено, что электроемкость является показателем ее липидной фазы. Совокупность установленных фактов о влиянии стандартных модификаторов на основные электрофизиологические параметры плазмалеммы свидетельствует о наличии органической связи между функциональной активностью и фазовым состоянием липидного окружения функциональных групп плазмалеммы.

Abstract. The kinetics of changes in the membrane potential (φ), resistance (R_m) and membrane capacity (C_m) were compared with the modification of the structural and functional components of the plasmalemma of *Nitellopsis obtusa* cells. For the plasmalemma electrogenic pump, the following are established: short-circuit current 0.09 A/m^2 , internal resistance $4 \text{ Ohm} \times \text{m}^2$, electromotive force — 360 mV . The analyses of the kinetics of measuring φ , R_m , C_m during the modification of the structural and functional components of the plasmalemma revealed that the electrical capacity is an indicator of its lipid phase. The totality of established facts about the effect of standard modifiers on the main electrophysiological parameters of the plasmalemma indicates the presence of an organic relationship between the functional activity and the phase state of the lipid environment of the functional groups of the plasmalemma.

Ключевые слова: водоросли, клеточные мембраны.

Keywords: Algae, cell membranes.

Идентификация транспортной функции плазмалеммы растительных клеток обычно осуществляется путем анализа электрофизиологических эффектов экзогенного воздействия на

отдельные компоненты ее ион транспортной системы [1, 2]. При этом совершенно необоснованно не учитывается возможное влияние модификаторов на фазовое состояние мембранных липидов, что также может отразиться на их модифицирующих свойствах. Этому способствовало отсутствие изменения основного показателя фазового состояния мембраны - ее электрической емкости при различных воздействиях, в первичных исследованиях на мембранах животных тканей [3].

Длительное время такие исследования на растительных объектах практически не проводились. С другой стороны, не проведена дифференциация электроемкости на отдельные структурные фазы мембраны, т. е. на функциональные белки и липидную фазу, в которой они локализованы. Это могло бы стимулировать объективную интерпретацию электрофизиологических эффектов модификаторов транспортных процессов, а также их возможного влияния на липидную фазу мембраны, которая является стерическим регулятором активности мембранных белков.

На основе вышеизложенного, основная цель настоящей работы была установление дифференциации электроемкости на отдельные структурные фазы плазмалеммы и дальнейший анализ электрофизиологических эффектов используемых модификаторов. Достижение поставленной цели осуществлено путем непрерывной регистрации комплекса электрических параметров плазмалеммы: мембранного потенциала (ϕ), сопротивления (R_m), емкостного сопротивления (X_c).

Объект и методы исследований

Объектами наших исследований служили междоузловые клетки харовых водорослей *Nitellopsis obtusa*. Растения выращивали в лабораторных условиях в искусственной прудовой воде (ИПВ) при освещении 20 Вт/м^2 и температуре $20\text{--}22^\circ\text{C}$. Ионный состав ИПВ был близок к составу озерной воды, в которой содержались (мМ/л): KH_2PO_4 — 0,1, CaCl_2 — 0,4, NaHCO_3 — 1, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ — 0,1, MgSO_4 — 0,1, $\text{pH}=7,0\text{--}7,2$.

Для обеспечения точности измерения применяемой электрофизиологической методики пользовались клетками длиной не более $l=20 \text{ мм}$ [4]. Диаметр таких клеток не превышал $d=0,5 \text{ мм}$. Комплекс электрофизиологических параметров измеряли с применением импедансной спектроскопии, разработанной для клеток цилиндрической формы [1, 2, 4]. Она обеспечивала непрерывную и длительную запись трех электрофизиологических параметров опытной клетки: емкостного сопротивления (X_c), мембранного потенциала (ϕ) и сопротивления (R_m) [4]. Из-за малого сопротивления тонопласта [5, 6] при введении измерительного микроэлектрода в вакуоль клеток, измеренные нами величины ϕ , R_m , X_c отражали состояния плазматической мембраны. Сущность применяемой методики состоит в том, что с помощью одного внутриклеточного микроэлектрода (токового микроэлектрода) и наружного *Ag-AgCl*-электрода через середину цилиндрической клетки пропускают прямоугольные импульсы постоянного тока плотностью 1 мА/м^2 , длительностью 1–2 сек и переменный ток с частотой 1–1000 Гц. Падение напряжения по постоянному и переменному токам снимаются с помощью второго микроэлектрода (измерительного микроэлектрода), введенного в клетку на фиксированном расстоянии от токового микроэлектрода. Емкостное сопротивление выделялось от общего импеданса с помощью векторной диаграммы [6]. Электроемкость единицы площади плазматической мембраны вычислена по формуле:

$$C_m = \frac{1}{2\pi f X_c}.$$

R_m вычисляли по величине электронического потенциала $\Delta\phi$ (сдвиг ϕ_m при пропускании тока) и силе тока I , пропускаемого через середину клетки:

$$R_M = \frac{\Delta\varphi}{I} \cdot \pi dl$$

Мембранный потенциал измеряли как разность потенциалов между измерительным электродом, введенного в вакуоль клеток и электродом сравнения, расположенного в измерительной камере.

Результаты и обсуждение

Разброс значений φ_M в стандартных условиях находился в пределах $-125 \div -245$ мВ средним значением 168 ± 4 мВ. Распределение φ по числам клеток не подчинялось закону нормального распределения, но значительная часть опытных клеток обладали повышенной электрогенной активностью. Мембранное сопротивление опытных клеток варьировало в пределах $1,5-9 \text{ Ом} \times \text{м}^2$, а их электрические емкости — в пределах $0,44-1,33 \text{ мкф} \times \text{см}^{-2}$. Средние значения этих величин для 42 клеток в стандартных условиях среды составляли $R_M=4,1 \pm 1,0 \text{ Ом} \times \text{м}^2$, $C_M=0,9 \pm 0,05 \text{ мкф} \times \text{см}^{-2}$, соответственно. С применением законов вариационной статистики между величинами R_M и φ установлена линейная зависимость $R_M=0,032-0,03 \varphi$.

Для установления основных показателей ионтранспортной системы плазмалеммы проведен анализ ее K^+ — характеристик, т. е. анализ зависимостей φ и R_M от концентрации K^+ в составе наружной среды (ИПВ). На основе проведенного анализа, в транспортной системе плазмалеммы выявлены два типа «долгоживущих» K^+ -каналов. K^+ -каналы наружного выпрямления (ККНВ), которые в активном (проводящем) состоянии находятся в диапазоне мембранного потенциала $-120 \div -170$ мВ и K^+ -каналы внутреннего выпрямления (ККВВ), которые в активном состоянии находятся в диапазоне мембранного потенциала $-170 \div -270$ мВ.

Если обратить внимание на ионный состав среды, то можно видеть, что в диапазоне активации ККВВ плазмалемма испытывает градиент электрохимического потенциала величиной $ZF\Delta\varphi=9,6 \text{ кДж/моль}$. Следовательно, для поддержания градиента электрохимического потенциала такой громадной величиной плазмалемма должна обладать высокой электрогенной активностью.

Электрогенная активность плазмалеммы в первую очередь определяется электродвижущей силой (ЭДС) ее электрогенных насосов. Для определения ЭДС электрогенных помп плазмалеммы применили графический способ Градман-Слаймана [7]. Метод основывается на сопоставлении вольтамперных характеристик нативной и модифицированной ингибитором мембраны (Рисунок 1).

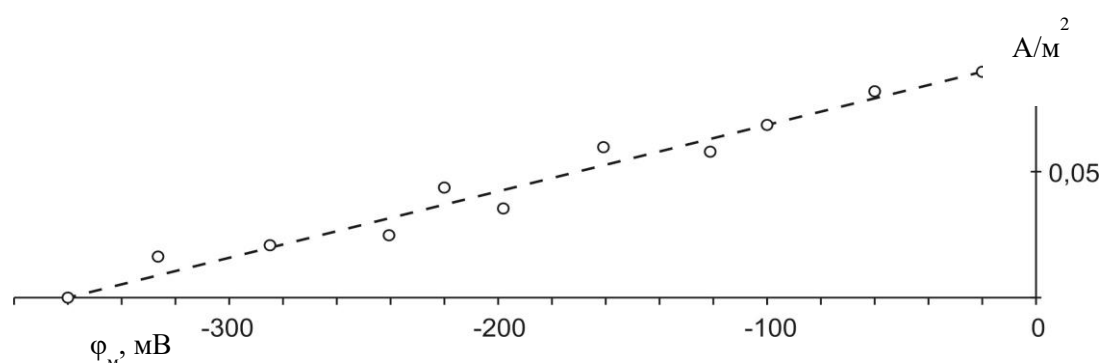


Рисунок 1. Вольт-амперная характеристика плазмалеммы клетки *Nitellopsis obtusa*. Длина $l=18,2$ мм, диаметр $d=0,46$ мм, $C_M=1,12 \text{ мкф} \times \text{см}^{-2}$, $R_M=6,2 \text{ Ом} \times \text{м}^2$, $I_{K3}=0,09 \text{ А/м}^2$, ЭДС=360 мВ, $R_{BH}=4 \text{ Ом} \times \text{м}^2$

На Рисунке 1 представлена вольт-амперная характеристика электрогенной системы плазмалеммы *Nitellopsis obtusa*. Точки, проставленные на графике получены вычитанием от ординат нативной (не обработанной ингибитором) мембраны соответствующих точек мембраны, обработанной специфическим ингибитором транспротонных H^+ -АТФазы дициклогексилкарбодиимидом (ДЦКД) в концентрации 5×10^{-6} М.

По данным литературы ингибирование H^+ -АТФазы под влиянием ДЦКД происходит за счет блокирования H^+ -канала фермента молекулой ингибитора [2]. Однако по нашим данным эффект ингибирования помпы под влиянием ДЦКД сопровождался также существенным изменением электроемкости плазмалеммы (Рисунок 2). Следовательно, в присутствие ингибитора возможно также структурные изменения плазмалеммы.

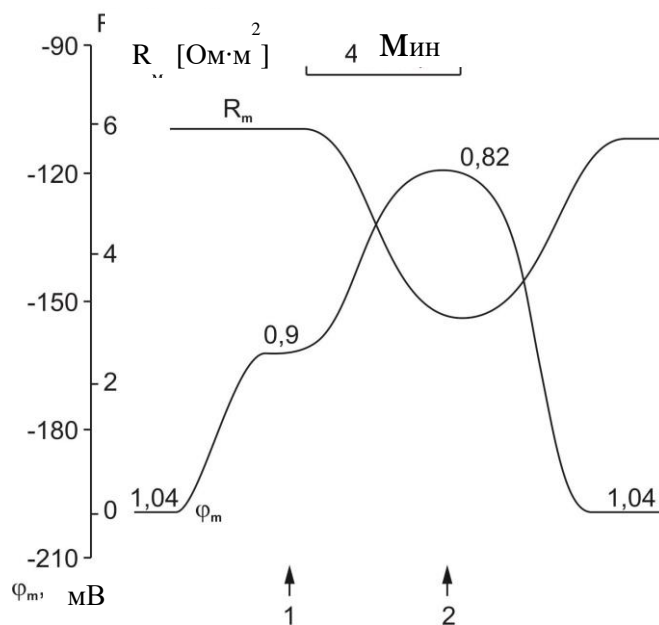


Рисунок 2. Кинетика изменения C_m , R_m , C_m плазмалеммы клетки *Nitellopsis obtusa* под влиянием 10^{-6} и 5×10^{-6} М концентраций ДЦКД. Цифры на кинетической кривой C_m отражают значения электроемкости плазмалеммы (в единицах $\mu F \times cm^{-2}$) в соответствующих моментах времени

ДЦКД хорошо растворяется в органических растворителях, что свидетельствует о липофильности его молекул. Поэтому вполне вероятно его включение в состав липидной фазы плазмалеммы, тем самым разрушение его F_o домена H^+ -АТФазы. Однозначный ответ по этому поводу можно получить дифференциацией мембранной емкости на липидную и белковую фазу плазмалеммы. С этой целью нами предпринята селективная модификация состава липидной и белковой фаз плазмалеммы с применением соответствующих средств.

Для тестирования поведения электроемкости плазмалеммы при модификации ее белковой фазы мы применяли два типа модификаторов проводимости биомембран белковой природы. Валиномицин, антибиотик белковой природы с циклической конформацией молекулы известен как подвижный переносчик одновалентных катионов, осуществляющий селективный перенос через клеточную и билипидную мембрану. Включение в состав питательной среды 10^{-6} М валиномицина деполаризовало плазмалемму клеток, C_m которых находились в диапазоне активации ККВВ, в течение 30 мин на 25–30 мВ (Рисунок 3). Деполаризация плазмалеммы клеток под влиянием антибиотика сопровождалась уменьшением мембранного сопротивления на 25–30% (Рисунок 3), что свидетельствует о включении переносчика в состав плазмалеммы. Десятикратное увеличение концентрации антибиотика в составе наружной среды не вызывало существенных изменений величин C_m , R_m .

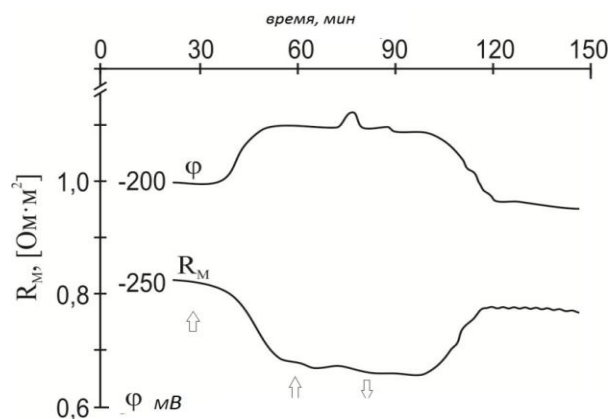


Рисунок 3. Кинетика изменения мембранного потенциала (φ) и сопротивления (R_m) клетки *Nitellopsis obtusa* при последовательном включении в состав питательной среды 10^{-6} и 10^{-5} М валиномицина. Стрелками вверх указаны моменты добавления антибиотика в состав питательной среды. Стрелкой вниз указан момент исключения антибиотика из состава питательной среды.

При исключении антибиотика из состава питательной среды происходило полное восстановление φ , R_m на своих первоначальных уровнях в стандартных условиях. Однако на фоне этих событий электроемкость плазмалеммы осталась неизменной (Рисунок 3). Иными словами, модуляция состава белковой фазы плазмалеммы не приводило к заметному изменению ее электроемкости. Аналогичная ситуация обнаруживалась при модификации белкового состава плазмалеммы пептидным антибиотиком — грамицидином А.

Хорошо известно, что линейная конформация антибиотика, состоящая из 15 гидрофобных аминокислот, при взаимодействии с мембранной структурой сворачиваясь в спираль, в ней формирует ионную пору, т. е. ионный канал, транспортирующий преимущественно одновалентные катионы [8].

О формировании ионных каналов в плазмалемме в наших измерениях свидетельствует уменьшение R_m мембраны на 30% при введении в состав наружной среды 10 нМ грамицидина А. Уменьшение R_m происходило на фоне деполяризации плазмалеммы, когда исходные φ клеток находились в диапазоне активации ККВВ. О формировании антибиотиком ионного канала свидетельствует также факт пролонгирования (45 мин) его отмыывание от состава плазмалеммы. Отмеченные электрофизиологические реакции клеток происходили при постоянстве электроемкости плазмалеммы. А совокупность установленных данных по нечувствительности электроемкости плазмалеммы при модуляции ее белкового состава свидетельствует о том, что электроемкость мембраны, в основном, является характеристикой ее липидной фазы. Об этом можно убедиться также путем модификации состава липидной фазы мембраны. В этом плане привлекательным в наших исследованиях явилась электрофизиологическая реакция клеток *Nitellopsis obtusa* на введение в состав наружной среды микромолярной дозы ионов Co^{2+} . Для Co^{2+} характерно жесткое связывание с поверхностью липидных мембран [9]. Такое обстоятельство должно привести к изменению итоговой электроемкости плазмалеммы, что обнаружено в наших экспериментах, проведенных на интактных клетках *Nitellopsis obtusa* (Рисунок 4).

Постоянство R_m на фоне электрофизиологической реакции под влиянием 10^{-6} $CoCl_2$ указывает на то, что появление в среде окружения исследуемых клеток катиона не затрагивает белковую фазу плазмалеммы, которая обеспечивает ее проводимость. А электрогенная активность плазмалеммы, происходящая на фоне изменения электроемкости, является результатом изменения фазового состояния гидрофобного окружения H^+ -АТФаз.

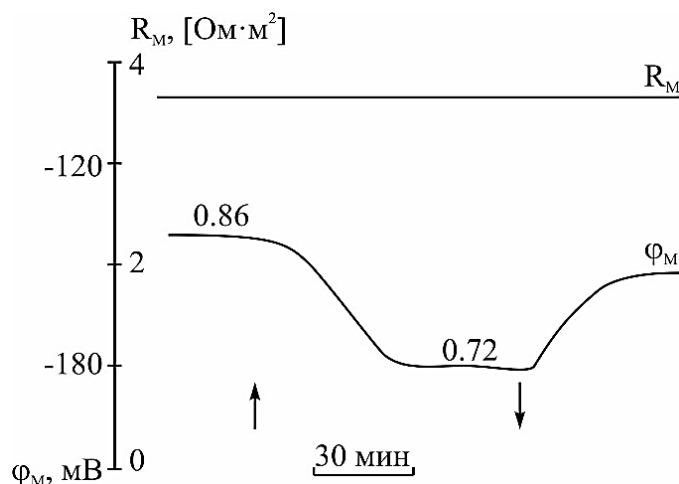


Рисунок 4. Протокол записи изменения потенциала (φ) и сопротивления (R_m) плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* под влиянием катионов Co^{2+} . Цифрами на кривой φ указаны значения емкости (в единицах $\mu F \times cm^2$) в соответствующих моментах времени регистрации потенциала плазмалеммы. Стрелкой вверх указан момент включения, стрелкой вниз момент исключения из состава питательной среды $10^{-6} CoCl_2$

Доказательством такого предположения могут служить результаты наших исследований по воздействию органического растворителя 1% ($8 \times 10^{-4} M$) диметилсульфоксида (ДМСО) [10]. Так же как в случае Co^{2+} усиление электрогенной активности плазмалеммы происходило на фоне изменения C_m при постоянстве мембранного сопротивления. Эти данные также свидетельствуют о том, что регулятором электрогенной активности мембраны, в данной серии опытов, является липидная фаза плазмалеммы, показателем фазового состояния которой служит ее емкость.

Выводы:

В результате исследований установлены следующие положения функционирования плазматической мембраны растительных клеток:

- модуляция перестраиванием белкового содержания или внесением полипептидов в структуру плазматической мембраны не изменяют ее электрическую емкость;

- электрическая емкость биологических мембран есть показатель структурно поляризационного состояния их липидной фазы.

- совокупность установленных данных о влиянии модификаторов на электрофизиологические параметры указывает на наличие органической связи между функциональной активностью и фазовым состоянием липидного окружения функциональных групп плазмалеммы.

Список литературы:

1. Mahmudova S. S., Ojaqverdiyeva S. Y., Najafaliyeva S. A., Musayev N. A. The lability and insensitivity capacity plasma membrane of nitellopsis cells during the modification of their transport characteristics // *Advances in Biology & Earth Sciences*. 2021. V. 6. №2. P.146-157.

2. Махмудова Ш. С., Мусаев Н. А. Функциональная активность и структурная лабильность плазматической мембраны клеток *Nitellopsis obtusa* // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2020. Т. 5. №1. С. 35-42.

3. Cole K. S. Membranes, ions and impulses: a chapter of classical biophysics. Univ of California Press, 1972. V. 1.
4. Мусаев Н. А., Воробьев Л. Н. Электрогенная активность и структурная лабильность плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при повышенных температурах // Физиология растений. 1981. Т. 28. №1. С. 86-93.
5. Musayev N., Ismailov E. Bioelectrical Properties of Chara gymnophylla Plasmamembrane during Interaction with Cobalt, (Co²⁺) // Ekoloji Dergisi. 2007. V. 16. №63.
6. Воробьев Л. Н., Мусаев Н. А. Электрические характеристики плазмалеммы и клеточной оболочки клеток *Nitellopsis obtusa*. Низкочастотный импеданс // Физиология растений. 1979. Т. 26. №4. С. 711-720.
7. Slayman C. L., Gradmann D. Electrogenic proton transport in the plasma membrane of Neurospora // Biophysical Journal. 1975. V. 15. №9. P. 968. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(75\)85877-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(75)85877-2)
8. Касумов Х. М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука; Баку: ЭЛМ, 2009. 511 с.
9. Godin D. V., Garnett M. Perturbational effects of inorganic cations on human erythrocyte membranes // The Journal of Membrane Biology. 1976. V. 28. №1. P. 143-168.
10. Musayev N. A., Ojaqverdiyeva S. Y., Mahmudova S. S. The changes of structure-functional state of plasma membrane in *Nitellopsis obtusa* under the influence of dimethylsulfoxide // Advances in Biology and Earth Sciences. 2018. V. 3. №3. P. 241.

References:

1. Mahmudova, S. S., Ojaqverdiyeva, S. Y., Najafaliyeva, S. A., & Musayev, N. A. (2021). The lability and insensitivity capacity plasma membrane of nitellopsis cells during the modification of their transport characteristics. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 6(2), 146-157.
2. Махмудова, Ш. С., & Мусаев, Н. А. (2020). Functional activity and structural lability of plasma membrane in nitellopsis *Obtusa* cells. *Modern Trends in Biological Physics and Chemistry*, 5(1), 35-42.
3. Cole, K. S. (1972). *Membranes, ions and impulses: a chapter of classical biophysics* (Vol. 1). Univ of California Press.
4. Мусаев Н. А., Воробьев Л. Н. Электрогенная активность и структурная лабильность плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при повышенных температурах // Физиология растений. 1981. Т. 28. №1. С. 86-93. (in Russian).
5. Musayev, N., & Ismailov, E. (2007). Bioelectrical Properties of Chara gymnophylla Plasmamembrane during Interaction with Cobalt, (Co²⁺). *Ekoloji Dergisi*, 16(63).
6. Vorobev, L. N., & Musaev, N. A. (1979). Elektricheskie kharakteristiki plazmalemmy i kletochnoi obolochki kletok *Nitellopsis obtusa*. *Nizkochastotnyi impedans. Fiziologiya rastenii*, 26(4), 711-720. (in Russian).
7. Slayman, C. L., & Gradmann, D. (1975). Electrogenic proton transport in the plasma membrane of Neurospora. *Biophysical Journal*, 15(9), 968. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(75\)85877-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(75)85877-2)
8. Kasumov, Kh. M. (2009). *Struktura i membrannaya funktsiya polienovykh makrolidnykh antibiotikov*. Moscow, Baku. (In Russian).
9. Godin, D. V., & Garnett, M. (1976). Perturbational effects of inorganic cations on human erythrocyte membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 28(1), 143-168.

10. Musayev, N. A., Ojaqverdiyeva, S. Y., & Mahmudova, S. S. (2018). The changes of structure-functional state of plasma membrane in *Nitellopsis obtusa* under the influence of dimethylsulfoxide. *Advances in Biology and Earth Sciences*, 3(3), 241.

Работа поступила
в редакцию 17.01.2023 г.

Принята к публикации
25.01.2023 г.

Ссылка для цитирования:

Махмудова Ш. С. Электрофизиологический анализ реакций плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при селективной модификации ее структурно-функциональных компонентов // Бюллетень науки и практики. 2023. Т. 9. №2. С. 17-24. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/87/02>

Cite as (APA):

Makhmudova, Sh. (2023). Electrophysiological Analyses of the Plasmalemma Reactions of *Nitellopsis obtusa* Cells Against Selective Modification of Its Structural and Functional Components. *Bulletin of Science and Practice*, 9(2), 17-24. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/87/02>