

ПОД- СЕКЦИЯ 3. Биофизика.

Г. Х. Бабаева, М.А. Набиев, В.М. Ализаде, С. Я. Оджагвердиева^{*}, Н.А. Мусаев^{*}

Институт Ботаники НАН Азербайджана

^{*}Бакинский Государственный Университет, Азербайджан

ПОТЕНЦИАЛ И СОПРОТИВЛЕНИЕ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *CHARA GYMNOPHYLLA* ПРИ ДЕЙСТВИИ Cu^{2+}

Среди тяжелых металлов по важности для жизненных процессов медь занимает особое положение. Катионы этого металла являются составной частью определенных ферментов дыхательной и фотосинтетической цепи. Медь является незаменимым компонентом многих питательных сред растений и играет роль ключевого элемента в обеспечении нормального протекания многих метаболических процессов [1, 2]. Однако, совсем мало сведений о взаимодействии Cu^{2+} с плазматической мембраной растительных клеток [1-3]. Причем исследования, проведенные в этом аспекте, в основном, были посвящены анализу токсического, повреждающего действия катиона на плазматической мембране. Возможное стимулирующее влияние катиона на уровне плазматической мембраны рассматривалось только в одной работе, проведенной на клетках *Nitella flexilis* [3]. Возможность стимулирующего влияния Cu^{2+} оправдана результатами исследований, проведенных на других видах водорослей в присутствии тяжелых металлов Co^{2+} и Ni^{2+} . Но, вопрос о механизмах действия Cu^{2+} на транспортные процессы через плазматическую мембрану остается открытым. Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы было исследование закономерностей изменения транспортных свойств плазматической мембраны интернодальных клеток *Chara gymnophylla* под влиянием Cu^{2+} . Для достижения поставленной цели нами проведен электрофизиологический анализ закономерностей изменения мембранного сопротивления R_m и потенциала E_m . Измерение электрофизиологических параметров исследуемых клеток проведено с применением стандартной микроэлектродной техники на основе двухэлектродного метода Хогга.

Ионы Cu^{2+} в состав питательной среды были включены в виде соли CuSO_4 . Клетки *Chara gymnophylla* оказались очень чувствительными на появление в среде Cu^{2+} . Заметные сдвиги мембранного сопротивления и потенциала мы обнаружили под влиянием весьма малой концентрации катиона в среде $-5 \cdot 10^{-9}$ М. Значительную гиперполяризацию плазматической мембраны клеток *Chara gymnophylla* выявили под влиянием концентрации катиона 10^{-8} М (рис. 1).

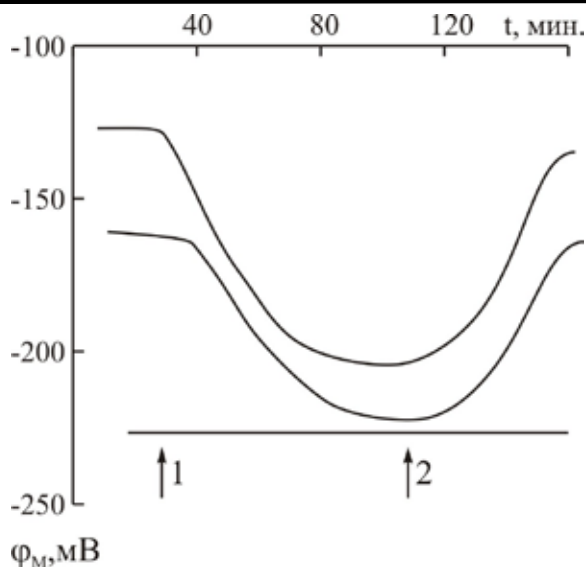


Рис. 1. Кинетика установления мембранного потенциала клеток *Chara gymnorhyla* на новом стационарном уровне при введении в среду 10^{-8} М Cu^{2+} . Стрелкой 1 обозначен момент введения в среду 10^{-8} М Cu^{2+} , а стрелкой 2 - момент исключения катиона из состава питательной среды.

Величина гиперполяризации зависела от исходного уровня мембранного потенциала исследуемых клеток и варьировала в пределах $20 \div 60$ мВ. Средняя величина гиперполяризации клеток под влиянием 10^{-8} М Cu^{2+} составляла 26 ± 2 мВ (число клеток 12). Гиперполяризацию плазматической мембраны обнаружили у клеток, мембранный потенциал которых находился в диапазоне активации K^+ -каналов наружного выпрямления ($-50 \div -160$ мВ). С увеличением исходного уровня мембранного потенциала клеток, величина гиперполяризации клеток уменьшалась (**рис. 1**). Гиперполяризацию клеток, мембранный потенциал которых находился в диапазоне активации внутрь выпрямляющих K^+ -каналов ($-160 \div -300$ мВ), под влиянием 10^{-8} М Cu^{2+} не обнаружили (**рис. 1**). При гиперполяризации клеток под влиянием 10^{-8} М Cu^{2+} установление мембранного потенциала на новом стационарном уровне длилось в течение 60-80 мин (**рис. 1**).

Гиперполяризация плазматической мембраны клеток *Chara gymnorhyla* под влиянием 10^{-8} М Cu^{2+} сопровождалась увеличением их мембранного сопротивления (**рис. 2**).

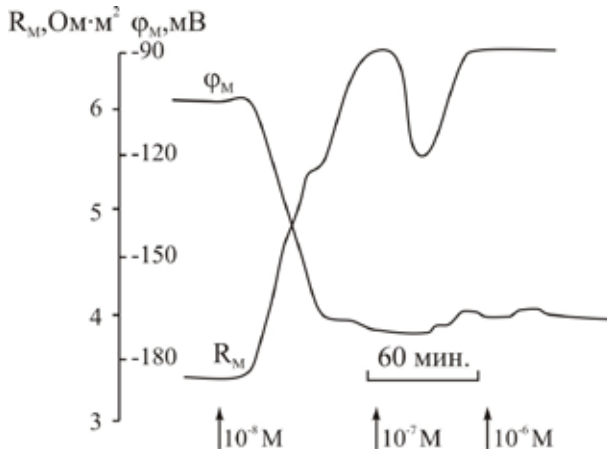


Рис. 2. Кинетика изменения мембранного потенциала φ_m и сопротивления R_m клеток *Chara guptophylla* при ступенчатом увеличении концентрации Cu^{2+} в среде. Стрелками обозначены моменты введения в состав питательной среды соответствующих концентраций катиона.

Так, если среднее значение мембранного сопротивления 12-и испытанных клеток в ИПВ было $3,94 \pm 0,21 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$, то эта величина после обработки клеток с 10^{-8} М Cu^{2+} увеличилась до $5,3 \pm 0,43 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$ (рис. 2).

Включение в состав питательной среды 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М концентраций Cu^{2+}

в течении 70-80 мин вызывало такие же сдвиги φ_i , что и 10^{-8} М . Причем, эффекты указанных концентраций катиона по величине не зависели от того, что испытуемые клетки подвергались или не подвергались предварительной обработке относительно малыми концентрациями Cu^{2+} . Средние величины гиперполяризации плазматической мембраны под влиянием вышеуказанных концентраций катиона

у клеток, φ_i которых находились в диапазоне активации K^+ -каналов наружного выпрямления, практически не различались.

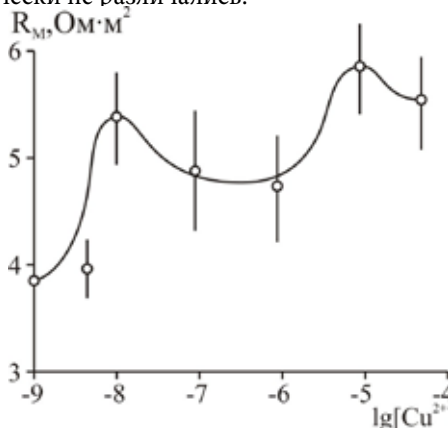


Рис. 3. Зависимость мембранного сопротивления R_i клеток *Chara guptophylla* от десятичного логарифма концентрации Cu^{2+} в среде.

Однако, уровни мембранных сопротивлений испытуемых клеток в среде с 10^{-7} и 10^{-6} М Cu^{2+} оказались несколько заниженными относительно их уровня в среде с 10^{-8} М Cu^{2+} . Наибольшее значение мембранного сопротивления клеток *Chara gymnophylla* в среде с Cu^{2+} мы обнаружили при концентрации катиона 10^{-5} М (рис. 3). Таким образом, зависимость мембранного сопротивления клеток *Chara gymnophylla* от десятичного логарифма концентраций Cu^{2+} в среде характеризовалась двухвершинной кривой с максимумами при концентрациях 10^{-8} и 10^{-5} М (рис. 3).

Увеличение концентрации катиона в среде до 10^{-4} М приводило к ингибированию H^{+} -насосов плазматической мембраны, что отражалось в уменьшении мембранного потенциала. Однако, мембранное сопротивление плазматической мембраны испытуемых клеток оказалось устойчивым даже при подавлении электрогенной активности клеток под влиянием этой концентрации катиона. Уменьшение мембранного сопротивления плазматической мембраны до уровня сопротивления клеточной оболочки мы выявили под влиянием концентрации катиона в среде 10^{-3} М.

Стимулирующие эффекты относительно низких концентраций катиона в среде (10^{-8} - 10^{-6} М) были полностью обратимыми. Удаление этих концентраций катиона из состава питательной среды в течение 40-50 мин приводило к полному восстановлению мембранного потенциала (рис. 1) и сопротивления исследуемых клеток на исходных уровнях. Однако, ингибирующие эффекты катиона оказались необратимыми. Мембранное сопротивление при отмывании клеток от 10^{-4} М CuSO_4 оказалось на 20% выше уровня мембранного сопротивления клеток, не обработанных ингибирующими концентрациями катиона.

Таким образом, установленные нами данные по влиянию Cu^{2+} на мембранный потенциал и мембранное сопротивление свидетельствуют о том, что субмикромольные или микромольные концентрации катиона стимулируют ион-транспортные процессы в плазматической мембране клеток *Chara gymnophylla*. Введение в среду миллимольных концентраций катиона подавляет ион-транспортную систему плазматической мембраны клеток *Chara gymnophylla*.

В ряде работ [2,3,6] токсическое, повреждающее действие Cu^{2+} подвергалось тщательному анализу. Было выявлено увеличение проводимости неселективных путей транспорта ионов, ингибирование проводимости Cl^{-} -каналов и H^{+} -насосов плазматической мембраны [2,3] под влиянием 3-5 мкмоль/л концентрации катиона. Более подробному анализу подвергалось увеличение проводимости неселективных путей переноса плазматической мембраны интернодальных клеток *Nitella flexilis*, *Nicotina plumbaginifolia*, *Arabidopsis thaliana* [3,6,7]. Установлено, что токсические

эффекты Cu^{2+} связаны с увеличением свободного кальция в цитоплазме, что приводит к разрушению липидов плазматической мембраны и увеличение её неспецифической ионной проницаемости [7].

По поводу усиления электрогенной активности клеток *Chara gymnophylla* под влиянием субмикромольных концентраций Cu^{2+} в доступной нам литературе мы нашли одну работу [3], выполненную с использованием модельного объекта *Nitella flexilis*. В этой работе авторы ограничились описанием самого явления без обсуждения его возможных механизмов. С другой стороны, обнаруженное нами усиление электрогенной активности плазматической мембраны, сопровождаемое уменьшением её интегральной проводимости под влиянием 10^{-9} , 10^{-8} М Cu^{2+} (рис. 1,2) выглядит несколько парадоксальным. Однако справедливость установленного факта может быть подтверждена тем, что в суспензии протопластов табака CuSO_4 уже в концентрации 10^{-10} М вызвал заметный рост цитозольной концентрации Ca^{2+} [2], что могло бы запустить Ca-активируемые гидролазы, приводящие к разрушению плазматической мембраны. Тем не менее, стимулирующий эффект Cu^{2+} на ион-транспортные процессы в плазматической мембране клеток *Chara gymnophylla* четко зарегистрирован.

Гиперполяризация плазматической мембраны выявлена в диапазоне активации наружу выпрямляющих K^+ -каналов (рис. 1, 2), когда проводимость неселективных путей переноса незначительна. Она сопровождалась увеличением мембранного сопротивления клеток *Chara gymnophylla*. При рассмотрении K^+ -характеристик клеток *Chara gymnophylla* выявлено, что H^+ -насосы плазматической мембраны в широком диапазоне мембранного потенциала функционируют в режиме генератора напряжения. Увеличение мембранного сопротивления на фоне усиления H^+ -насосов под влиянием Cu^{2+} указывает на изменение рабочего режима электрогенной системы. В режиме генератора тока, уменьшение шунтирующей нагрузки должно привести к увеличению ЭДС H^+ -насосов. Действительно, гиперполяризация плазматической мембраны свидетельствует об уменьшении шунтирующей нагрузки H^+ -насосов в результате блокирования наружу выпрямляющих K^+ -каналов. Аналогичные эффекты мы обнаружили при блокировании K^+ -каналов плазматической мембраны клеток *Nitellopsis* [8], корневых волосков *Trianea bogotensis* [4].

Ингибирование ион-транспортной системы плазматической мембраны мы обнаружили в присутствии довольно высоких концентраций катиона 10^{-4} - 10^3 М. Отмеченные концентрации Cu^{2+} во много раз выше концентрации катиона, вызывающей ингибирование Cl^- -каналов, H^+ -АТФазы плазматической мембраны

[2,3] нарушение Ca^{2+} гомеостаз между цитозолью и средой [7], а также окисление мембранных липидов. Все перечисленные явления могут привести к подавлению ион-транспортной системы плазматической мембраны.

Таким образом, установленные факты по влиянию Cu^{2+} на мембранный потенциал и мембранное сопротивление убедительно доказывают, что несмотря на свою токсичность, катион может быть применен как модификатор проводимости и электрогенной активности клеточных мембран.

Использованная литература

1. Chiarandini D.J., Stefani E., Gereschenfeld H.M. -Nature, 1967, v. 213, p.97-99.
2. Demidchik V.V., Sokolik A.I. Yurin V.V. –Planta, v.212, p. 583-590.
3. Демидчик В.В., Соколик А.И., Юрин В.М. –Доклады АН Белоруси, 1996, т.40, № 2, с. 84-87.
4. Musayev N.A., Ismailov E.R. – Ecology, 2007, No 63, p. N.1-6
5. Nebiyev M.A., Musayev N.A. XIV Ulusal bioloji kongresi, 7-10 eylul, c.2 s.415-424.
6. Li H., Tang S., Lheng J. – Nonhcum Shengtai Yuanying. 2003, v. 19, p. 53- 55.
7. Демидчик В.В. –Материал. III Междунар. Конф. «Ксенобиотики и живые системы», 22-24 октября 2008 г., с. 34-36.
8. Мусаев Н. А., Воробьев Л. Н. – Изв. АН Аз.ССР, Сер биол. Наук. 1983, №3, с. 91- 101.