

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ОТМЫВАНИЯ КЛЕТОК *CHARA FRAGILIS* ОТ РАСТВОРОВ ФИТОКОМПОЗИЦИИ ОДУВАНЧИК-ЗВЕРОБОЙ-КАЛЕНДУЛЫ**Гасанова А.Э.^{1,2}, Мусаев Н.А.¹, Оджажвердиева С.Я.¹**¹ Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ-1148, Азербайджан; e-mail: ahasanova89@gmail.com

² Институт ботаники НАН Азербайджана

Бадамдарское ш., 40, г. Баку, AZ1004, Азербайджан

Поступила в редакцию 09.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0479

Аннотация. С помощью микроэлектродной техники изучали закономерности изменения потенциала (ϕ_m) и сопротивления (R_m) плазматической мембраны (ПМ) клеток *Chara fragilis* в присутствии растворов фитокомпозиции Одуванчик – Зверобой – Календулы (ОЗК). Значения ϕ_m и R_m в стандартных условиях среды разбросаны в широких пределах: $-90 \div -300$ мВ и $1 \div 32,6$ Ом·м² соответственно. Среднее значение ϕ_m составило $-183 \pm 4,9$ мВ, $R_m = 9,2 \pm 1,2$ Ом·м². Используя зависимости ϕ_m , R_m от концентрации K^+ в наружной среде, определяли диапазоны активации K^+ -каналов наружного (ККНВ) и внутреннего (ККВВ) выпрямления. При действии фитокомпозиции ОЗК, пока клетка находилась в среде с концентрацией композита 10^{-1} или 1 мг/мл, в течение 25 мин изменения ϕ_m и R_m нами не были выявлены. Стимуляция или подавление транспортных процессов под влиянием композитов происходили только при исключении ОЗК из состава питательной среды и при ступенчатом увеличении концентрации композиции в среде. Электрофизиологические эффекты действия композиции ОЗК обсуждаются с точки зрения его действия на липидную фазу плазматической мембраны опытной клетки.

Ключевые слова: *Chara fragilis*, мембранный потенциал, мембранное сопротивление, фитопротекторы, H^+ -помпа, K^+ -каналы.

Поиск эффективных способов повышения радиорезистентности биообъектов, в большинстве случаев основан на тестировании натуральных продуктов растительного происхождения, благодаря их способности длительно действовать без каких-либо токсических и побочных эффектов. С другой стороны, они широко распространены в природе. К таким растениям можно отнести *Taraxacum officinale* (одуванчик обыкновенный), *Hypericum* (зверобой) и *Caléndula* (календула). Все три отмеченных растения обладают радиопротекторным свойством и удачно применяются на практике фитотерапии [1,3,7-9,13-16]. Целью настоящей работы было выявление возможных механизмов модификации компонентов транспортной системы плазматической мембраны клеток *Chara fragilis* при экзогенном воздействии композиции экстрактов ОЗК.

Первичной мишенью любого экзогенного фактора при воздействии на клетки растений является их плазматическая мембрана. Компонентами системы первичного активного транспорта ПМ, являются H^+ -помпа с высокой электрогенной активностью и два типа K^+ -каналов: K^+ -каналы внутреннего выпрямления (ККВВ), K^+ -каналы наружного выпрямления (ККНВ). Выявленные закономерности действия ОЗК на эти компоненты мембранного транспорта могут быть использованы для осуществления детализации клеточных механизмов действия радиопротекторной способности названных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились с использованием междоузловых клеток водоросли *Chara fragilis*. Водоросли отбирались из пруда «Катиб Булагы», образованного из сточных вод нескольких горных родников в Товузском районе. *Chara fragilis* принадлежит к семейству *Characeae* Ag. *Emand Hollerb* из класса *Charaphyceae*. Междоузловые клетки *Chara fragilis* в качестве объекта электрофизиологических исследований впервые были использованы нами [10]. Длина зрелых междоузловых клеток *Chara fragilis* достигала 5-8 см, диаметр 0,4-1 мм. Большие размеры междоузловых клеток *Chara fragilis* позволяют использовать их в длительных (многочасовых, многосуточных) экспериментах с применением стеклянных микроэлектродов. Минеральный состав воды «Катиб Булагы» определялся методом атомно-абсорбционной спектроскопии с применением спектрофотометра ААС-1, фирмы Bruker (Германия), что соответствовал минеральному составу искусственной прудовой воды (ИПВ), содержащей катионов (в М/л) $0,1 K^+$, $1 Na^+$, $0,4 Ca^{2+}$, $0,3 Mg^{2+}$ и анионов $1,0 Cl^-$, $0,1 HCO_3^-$, $0,1 NO_3^-$, $0,1 PO_4^{3-}$, $0,2 SO_4^{2-}$ при рН - $6,9 \div 7,2$ [10].

Для обеспечения высокой точности измерения сопротивления мембран использовали клетки длиной не более 20 мм [10]. Эта величина соответствовала длине второй мутовки от верхушки растений *Chara fragilis*. Измерения основных электрофизиологических параметров проводились с помощью двухэлектродной методики Хогга, разработанной для клеток цилиндрической формы [11,12]. Метод Хогга позволял одновременно и непрерывно регистрировать мембранный потенциал ϕ_m и сопротивление R_m экспериментальных клеток.

Для получения фитокомпозиции в качестве исходного препарата брали сухой порошок экстракта корня одуванчика, зверобоя и лепестков календулы. Порошковый экстракт был изготовлен из трав фармацевтической компании «Herba-Flora», Азербайджан. Композиционная смесь этих растений экстрагировалась из порошков в

равной пропорции 70%-ным этанолом. Сырье и экстрагент в соотношении 1:15 перемешивали 10 минут на магнитной мешалке при комнатной температуре, затем фильтровали. Экстракцию с последующей фильтрацией повторяли трижды. Затем фильтраты упаривали на роторном испарителе в вакууме досуха [5]. Рабочие растворы сухого экстракта готовили на ИПВ. Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась по законам вариационной статистики [2]. Графики кинетических зависимостей построены с использованием компьютерной программы SigmaPlot12.0, на основе данных 7-8 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку клетки *Chara fragilis* впервые были внедрены нами в практику электрофизиологических исследований, на начальном этапе экспериментальной работы проведён статистический анализ распределения электрофизиологических показателей по числам клеток в стандартных условиях. Оказалось, что стационарные значения φ_m и R_m разбросаны в довольно широких пределах: $-90 \div -300$ мВ и $1 \div 32,6$ Ом \cdot м² соответственно. Среднее значение φ_m составило $-183 \pm 4,9$ мВ. Объем выборки экспериментального материала n составил 106. Распределение φ_m по числам клеток подчинялось закону нормального распределения Гаусса–Муавра–Лапласа. Значение сопротивления мембраны, рассчитанное от уровня сопротивления клеточной оболочки, составило $9 \pm 1,2$ Ом \cdot м² ($n = 45$). Распределение значений R_m не подчинялось закону нормального распределения.

Ярко выраженные биоэлектрические эффекты фитокомпозиции ОЗК обнаружили в присутствии 10^{-1} или 1 мг /мл концентраций фитопротектора. Однако пока клетки находились в среде с 10^{-1} или 1 мг/мл концентрации композита, изменения φ_m и R_m в течение 25 мин нами не выявлены (рис. 1, 2). Стимуляция или подавление транспортных процессов, индуцированные под влиянием композита происходили только на фоне постепенного исключения ОЗК из состава питательной среды (рис. 1, 2). Такой «аномальный» эффект фитокомпозиции нами был назван «эффектом отмывания». Здесь употребление прилагательного «аномальный» совершенно логично по той причине, что обычно эффект модификатора проявляется накануне его воздействия. Однако в анализируемом случае биоэлектрический эффект фитопротектора проявился при его исключении из состава питательной среды.

Изменения φ_m и R_m накануне «эффекта отмывания» качественно и количественно определялись исходным уровнем φ_m и концентрацией фитопротектора. Причем, если φ_m находился в диапазоне активации ККНВ, то обнаружили стимуляцию транспортных процессов через плазматическую мембрану (рис. 1, а). Абсолютное значение φ_m при этом возрастало на 16-20 мВ. Гиперполяризация ПМ сопровождалась уменьшением R_m . Однако, если φ_m находился в диапазоне активации ККВВ, то обнаружили подавление транспортных процессов через ПМ. При этом ПМ деполяризовалась на 30-35 мВ, а R_m оставалось на постоянном уровне (рис.1, б).

Увеличение R_m на фоне гиперполяризации ПМ мы обнаружили у клеток, φ_m которых находились в диапазоне активации ККНВ, при введении в среду увеличенной концентрации фитокомпозиции 1 мг / мл (рис. 2а). Однако у клеток, φ_m которых находились в диапазоне активации ККВВ, увеличение R_m сопровождалось деполяризацией ПМ в пределах 10 мВ (рис. 2б).

Совершенно иное качество приобрела биоэлектрическая реакция клетки *Chara fragilis* при ступенчатом увеличении концентрации фитопротектора в составе ИПВ (рис. 3). Появление 10^{-1} мг / мл ОЗК в среде, как и прежде не вызвало ответную биоэлектрическую реакцию ПМ исследуемых клеток. Однако при последующем 10-ти кратном увеличении концентрации фитокомпозиции в среде выявили существенные изменения φ_m и R_m . Причём, характер изменения параметров зависел от типа K^+ - каналов ПМ, которые находились в активном состоянии (рис. 3).

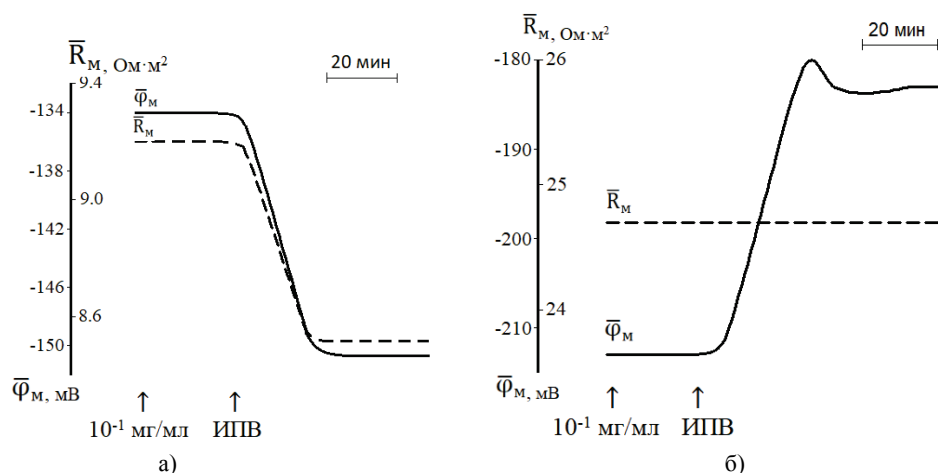


Рисунок 1. Кинетика изменения электрических параметров ПМ клеток *Chara fragilis*, φ_m которых находились в диапазоне активации ККНВ (а) и ККВВ (б) под влиянием 10^{-1} мг / мл концентрации композита ОЗК. Стрелками на рисунке указаны моменты введения в среду соответствующих концентраций композиции и ИПВ. Длина (l) и диаметр (d) опытных клеток составляли: при а) 20,2 мм, 0,45 мм; при б) 19,0 мм, 0,48 мм

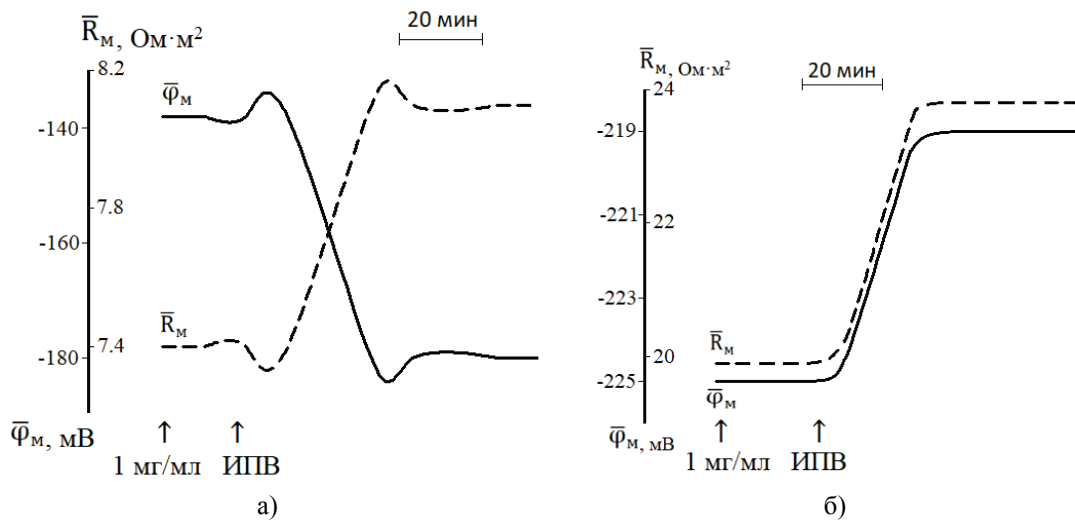


Рисунок 2. Протокол изменения средних значений потенциала $\bar{\varphi}_m$ и сопротивления \bar{R}_m ПМ клеток *Chara fragilis* в диапазоне активации ККНВ (а) и ККВВ (б) под действием 1 мг/мл композита ОЗК. На рисунке стрелками указаны моменты включения в состав среды 1 мг/мл композита и момент подачи чистой ИПВ. Длина (l) и диаметр (d) опытных клеток составляли: при а) 20 мм, и 0,45 мм; при б) 19,2 мм и 0,44 мм

Если мембранный потенциал клеток находился в диапазоне активации ККВВ, то заметное уменьшение R под действием 1 мг/мл композиции ОЗК выявлено на фоне постоянного φ_m (рис. 3, а). Отмывание клетки от фитокомпозиции ОЗК приводило к деполяризации ПМ на 55 мВ, после чего φ_m установился на стационарном уровне. Мембранное сопротивление R_m при этом переходя через минимум (на четверть меньше исходной величины) также установился на стационарном уровне. Таким образом, конечные стационарные уровни φ_m и R_m в ИПВ не совпадали с их уровнями в стандартных условиях среды (рис. 3). Если мембранный потенциал клеток находился в диапазоне активации ККНВ, то введение в среду 10^{-1} мг/мл ОЗК в среде не вызвало достоверного изменения параметров φ_m и R_m . Однако увеличение концентрации композиции до 1 мг/мл вызывало существенное изменение средних величин параметров φ_m и R_m (рис. 3, б). Таким образом средняя величина мембранного сопротивления установилась на 2,4 Ом m^2 меньше исходного уровня, а абсолютное значение средней величины мембранного потенциала уменьшилось на 30 мВ. Исключение из состава питательной среды не приводило к восстановлению параметров ПМ на своих исходных уровнях (рис. 3, б). Среднее значение φ_m установилось на уровне, превышающем его исходный уровень на 30 мВ, а R_m установился на уровне ниже, чем 10% от исходного уровня. Это свидетельствует о стимуляции электрогенной системы ПМ. А совокупность установленных данных свидетельствует о том, что действие фитокомпозиции ОЗК на компоненты первичного ионного транспорта происходит необратимо. Вероятно, протекторное действие этого класса веществ осуществляется через модификацию транспортных свойств ПМ клеток объекта, который подвергается облучению. На фоне такого предположения необходимо задуматься о факте усиления электрогенной активности ПМ клеток, φ_m которых

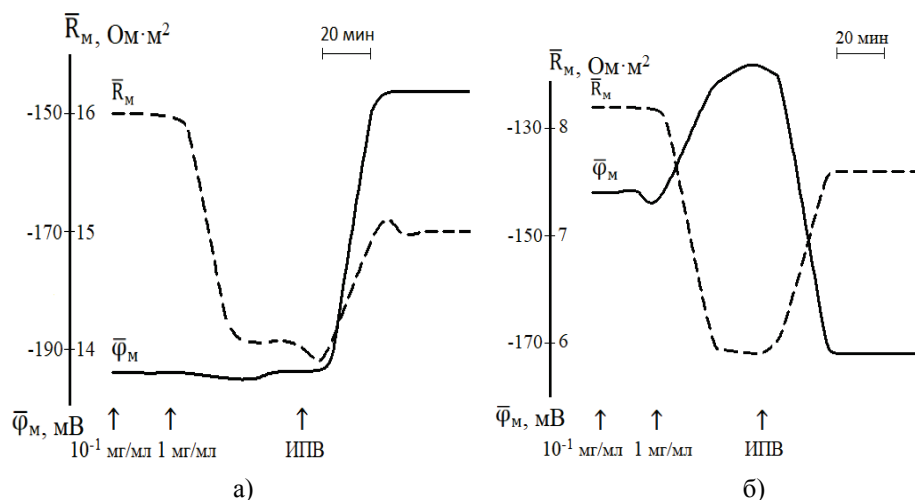


Рисунок 3. Кинетика изменения $\bar{\varphi}_m$ и \bar{R}_m клеток *Chara fragilis* мембранный потенциал которых находился в диапазоне активации ККВВ (а) и ККНВ (б) при последовательном введении в среду 10^{-1} и 1 мг/мл композиции ОЗК. Длина (l) и диаметр (d) опытных клеток составляли: при а) 18,6 мм и 0,45 мм; при б) 18,2 мм и 0,42 мм

находились в диапазоне активации ККНВ (рис. 1 а; 2 а) после обработки композитом протекторов. А когда речь идёт о модификации транспортной системы, следует учесть, что её основными компонентами являются 2 типа K^+ -каналов и H^+ -помпа. Оба компонента проявляют функциональную активность только при наличии специального липидного окружения. Многочисленными данными [2,4,6] подтверждены, что липидная фаза биомембран является стерическим регулятором активности мембранных белков. Исходя из такой логики можно предположить, что воздействие фитокомпозиита возможно на оба компонента ионтранспортной системы: на функционально активную конформацию двух типов K^+ -каналов и H^+ -помпы, а также на физическое состояние липидной фазы ПМ. Однако установленные факты показывают, что компоненты системы первичного активного транспорта при действии композиита не только сохраняют функциональную активность, но даже при определённых условиях усиливают её. Поэтому мы предполагаем, что регуляция функциональной активности компонентов системы первичного транспорта ионов ПМ осуществляется её липидной фазой. Такое предположение оправдано тем, что фитокомпозиит ОЗК обладает органической природой [1,7,8] и удачно может адсорбироваться поверхностью липидной фазы ПМ. Вероятно, по этой причине все эффекты фитокомпозиита проявляются накануне его отмывания из клеток на ИПВ.

Список литературы / References:

1. Горьков В.А. и др. Фитотерапия умеренных депрессий препаратами зверобоя (аналитический обзор). *Психиатрия и психофармакотерапия*, 2000, т. 2, № 6. [Gorkov V.A. et al. Herbal medicine for moderate depression with St. John's wort (analytical review). *Psychiatry and psychopharmacotherapy*, 2000, vol. 2, no. 6. (In Russ.)]
2. Демидчик В.В. Мембранные механизмы регуляции активности ионов кальция в цитоплазме клеток высших растений. *Труды БГУ*, 2012, т. 7, № 1, с. 99-105. [Demidchik V.V. Membrane mechanisms of regulation of the activity of calcium ions in the cytoplasm of cells of higher plants. *Proceedings of BSU*, 2012, vol. 7, no. 1, pp. 99-105. (In Russ.)]
3. Дробижев М.Ю. и др. Гелариум гиперикум при лечении депрессий в общесоматической сети. *Consilium Medicum., Медиа Медика*, 2002, т. 4, № 5. [Drobizhev M.Yu. et al. Gelarium Hypericum in the treatment of depression in the general somatic network. *Consilium Medicum., Media Medica*, 2002, vol. 4, no. 5. (In Russ.)]
4. Мусаев Н.А. *Биофизические механизмы модификации транспортных свойств плазматической мембраны растительных клеток*. Докторская диссертация, Баку, 2012, 336 с. [Musaev N.A. *Biophysical mechanisms of modification of the transport properties of the plasma membrane of plant cells*. Doctoral dissertation, Baku, 2012, 336 p. (In Russ.)]
5. Перельман Я.М. *Анализ лекарственных форм. Практическое руководство*. Л. Медгиз, 1961, 616 с. [Perelman Ya.M. *Analysis of dosage forms. Practical Guide*. L. Medgiz, 1961, 616 p. (In Russ.)]
6. Hasanova A.E., Musayev N.A. Bioelectric characteristics of *Chara fragilis* (Characeae) cells. *Ukrainian Botanical Journal, M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine*, 2020, vol. 77, no. 5, pp. 398-404.
7. Ahmad V., Yasmeen S., Ali Z., Khan M., Choudhary M., Akhtar F., Miana G., Zahid M. Taraxacin, a new guaianolide from *Taraxacum wallichii*. *J. Nat. Prod.*, 2000, vol. 63, pp. 1010–1011.
8. Shivasharan B., Nagakannan P., Thippeswamy B., Veerapur V. Protective Effect of *Calendula officinalis* L. Flowers Against Monosodium Glutamate Induced Oxidative Stress and Excitotoxic Brain Damage in Rats. *Indian J. ClinBiochem.*, 2013, pp.292-298.
9. Choi J.H., Shin K.M., Kim N.Y., Lee Y.S., Kim H.J., Park H.J., Lee K.T. Taraxinic acid, a hydrolysate of sesquiterpene lactone glycoside from the *Taraxacum coreanum Nakai*, induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2002, vol. 25, pp. 1446-1450.
10. Hasanova A., Najafaliyeva Sh., Aliyeva P., Musayev N. *Chara Fragilis* cells – a new object for electrophysiology research. *Journ. of Baku Engineering University, – Chemistry and Biology*, 2017, vol. 1, no. 2, pp. 176-182.
11. Hogg J., Williams E.J., Jhonston R.I. A simplified method for measuring membrane resistances *Nitellatranslucens*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1968, vol. 150, p. 518.
12. Hogg J., Williams E.J., Jhonston R.I. Light intensity and the membrane parameters of *Nitellatranslucens*. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1969, vol. 173, pp. 564-566.
13. Fonseca Y., Catini C., Vicentini F., Nomizo A. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, no. 127, pp.596-601.
14. Yang D., Whang W., Kim I. The constituents of *Taraxacum hallaisanensis* roots. *Arch. Pharmacol. Res.*, 1996, vol. 19, pp. 507-513.
15. Yun S., Cho H., Choi H. Anticoagulant from *Taraxacum platycarpum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, vol. 66, pp. 1859-1864.
16. Prylutsky Y.I., Vereshchaka I.V., Maznychenko A.V., Bulgakova N.V., Gonchar O.O., Kyzyma O.A., Ritter U., Scharff P., Tomiak T., Nozdrenko D.M., Mishchenko I.V., Kostyukov A.I. C⁶⁰ fullerene as promising therapeutic agent for correcting and preventing skeletal muscle fatigue. *Journal of Nanobiotechnology*, 2017, vol. 15, no. 8, doi: 10.1186/s12951-016-0246-1.

BIOELECTRIC EFFECTS OF WASHING OF THE *CHARA FRAGILIS* CELLS FROM SOLUTIONS OF PHYTOCOMPOSITION OF DANDELION- HYPERICUM-CALENDULA**Hasanova A.E.^{1,2}, Musaev N.A.¹, Ojagverdiyeva S.Y.¹**¹Baku State University*Z. Khalilov Str. 23, Baku, AZ-1148, Azerbaijan; e-mail: ahasanova89@gmail.com*²Institute of Botany ANAS*Badamdar highway 40, AZ1004, Baku, Azerbaijan*

Received 09.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0479

Abstract. By using of microelectrode techniques, patterns of change in the potential (φ_m) and resistance (R_m) of the plasma membrane (PM) of *Chara fragilis* cells under the influence of Dandelion–Hypericum–Calendula (DHC) phytocomposition solutions were studied. The values of φ_m and R_m are widely scattered: $-90 \div -300$ mV and $1 \div 32.6$ Ohm·m², respectively under the standard conditions. The average value of φ_m was -183 ± 4.9 mV, $R_m = 9.2 \pm 1.2$ Ohm·m². Using the dependences of φ_m , R_m on the concentration of K⁺ in the external environment, the ranges of activation of the K⁺ - channels to the inward (KCIR) and outward rectification (KCOR) were determined. Under the action of the DHC phytocomposition, while the cell was in the medium with the concentration of the composite 10⁻¹ or 1 mg/ml, we did not detect changes in φ_m and R_m for 25 min. Stimulation or suppression of transport processes under the influence of composites occurred only with the exclusion of DHC from the composition of the nutrient medium and with a stepwise increase in the concentration of the composition in the medium. The electrophysiological effects of the action of the DHC composition are discussed from the point of view of its action on the lipid phase of the plasma membrane of the experimental cells.

Key words: *Chara fragilis*, membrane potential, membrane resistance, phytoprotectors, H⁺ - pumps, K⁺ - channels.