

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРНАЯ ЛАБИЛЬНОСТЬ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *NITELLOPSIS OBTUSA*

Махмудова Ш.С.<sup>1</sup>, Мусаев Н.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт ботаники НАНА,

просп. Метбуат, 2А, г. Баку, AZ1073, Азербайджан; e-mail: mahmudovashirin656@gmail.com

<sup>2</sup> Бакинский государственный университет

ул. З. Халилова, 23, г. Баку, AZ1148, Азербайджан; e-mail: nagi.musayev@hotmail.com

Поступила в редакцию: 17.06.2020

**Аннотация.** Методом импедансной спектроскопии изучали закономерности изменения трёх электрических характеристик клеток *Nitellopsis obtusa*: потенциала  $\varphi_m$ , сопротивления  $R_m$ , ёмкости  $C_m$  при модификации транспортных свойств плазматической мембраны (ПМ). Средние значения названных величин для 100 клеток в стандартных условиях составляли  $\varphi_m = -171 \pm 0,4$  мВ,  $R_m = 3,8 \pm 0,15$  Ом·м<sup>2</sup>,  $C_m = 0,9 \pm 0,05$  мкФ·см<sup>-2</sup> соответственно. Между  $R_m$  и  $\varphi_m$  установлена линейная зависимость  $R_m = 0,032 - 0,03 \varphi_m$  с коэффициентом корреляции  $r = 0,67$ . Активность ионов  $K^+$  в цитоплазме клеток, измеренная с помощью  $K^+$ -чувствительных микроэлектродов составляла  $a_{K^+} = 104 \pm 6$  мМ. У клеток с  $|\varphi_m| > 170$  мВ в проводящем состоянии находились  $K^+$ -каналы внутреннего выпрямления, а у клеток с  $|\varphi_m| < 170$  мВ -  $K^+$ -каналы наружного выпрямления. При 10 и 100-кратном увеличении содержания  $K^+$  в среде, и модуляции содержания белковой фазы ПМ изменения  $C_m$  отсутствовали. Следовательно, вклад белковой фазы ПМ в  $C_m$  незначителен. Экзогенное воздействие малых концентраций липофильных модификаторов диметилсульоксида, дициклогексилкарбодиимида и блокатора  $K^+$ -каналов  $Co^{2+}$  вызывало изменение  $C_m$  на 20-30%, увеличение  $\varphi_m$  в пределах 30 мВ при постоянстве  $R_m$ , что свидетельствовало о взаимосвязи электрогенной активности и лабильности структурно - поляризационных свойств ПМ.

**Ключевые слова:** лабильность, функциональная активность.

Объективная идентификация функциональной активности плазматической мембраны растительных клеток стала возможной только после разработки точных электрофизиологических методов [1, 2] в исследовательской практике. Благодаря применению названных методов, исследованиями установлена классификация модификаторов проводимости (блокаторов, индукторов), ингибиторов и стимуляторов транспортных процессов через плазматическую мембрану (ПМ). На фоне этих событий совсем малое внимание было уделено изменению структурно-поляризационных свойств ПМ растительных клеток, при их функциональной активности.

Показателями функциональной активности ПМ являются, в основном потенциал  $\varphi_m$  и сопротивление единицы площади  $R_m$ , а показателем её структурно-функциональных свойств – электроёмкость её единицы площади  $C_m$  [3, 4]. Однако исследованию лабильности этой величины при функциональной активности биомембран было посвящено ограниченное число работ. Это было связано с сформированной Коулом догмой о постоянстве  $C_m$  [2,3] при действии различных экзогенных факторов и трудностями адаптации интактных клеток ко входу измерительных приборов.

Проявление лабильности электроёмкости было зарегистрировано после усовершенствования измерительной техники [5, 6]. Выявлена зависимость ёмкости мембран от частоты применяемого переменного электрического поля [3, 6], температуры среды [7], действия разобщителей окислительного фосфорилирования [5]. Однако было бы логичным следить за лабильностью электроёмкости мембраны при действии стандартных модификаторов с известными молекулярными составами. Исследования такого плана могли бы установить взаимосвязь между функциональной активностью и лабильностью ПМ, а также клеточные механизмы действия применённых модификаторов проводимости, ингибиторов и стимуляторов транспортных процессов. Поэтому целью настоящей работы было установление возможной взаимосвязи между функциональной активностью и изменениями структурно-поляризационных свойств ПМ при экзогенным воздействием стандартных модификаторов проводимости, электрогенной активности биомембран. Исследования такого плана обычно осуществляют на крупных клетках харовых, для обеспечения интактности исследуемого объекта. Для обеспечения высокой точности определения изменения параметров  $\varphi_m$ ,  $R_m$ ,  $C_m$  в исследованиях применены клетки *Nitellopsis obtusa*, отличающихся высокой электрогенной активностью, что гарантирует регуляцию электрогенной активности в широких пределах.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Измерение комплекса электрофизиологических параметров ПМ  $\varphi_m$ ,  $R_m$ ,  $C_m$  *Nitellopsis obtusa* проводилось методом импедансной спектроскопии с использованием прецизионной микроэлектродной техники [6,7]. Измерительная установка, позволила осуществить многочасовую, непрерывную запись одновременно трёх основных электрофизиологических характеристик исследуемой клетки  $\varphi_m$ ,  $R_m$ ,  $X_c$ , где  $X_c$  ёмкостное сопротивление плазматической мембраны.  $C_m$  исследуемых клеток вычисляли на основе формулы ёмкостного сопротивления  $C_m = 1/2 \pi f X_c$ , где  $f$  – линейная частота переменного тока. В ходе измерений

электрофизиологических параметров обеспечена полная интактность опытной клетки. Средой выращивания опытных растений служила искусственная прудовая вода (ИПВ) [11], состава: (мМ)  $\text{NaHCO}_3$ - 1,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - 0,1,  $\text{CaCl}_2$ - 0,4,  $\text{MgSO}_4$ - 0,1,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ - 0,2, pH- 7,0÷7,5. Температура ИПВ накануне измерений электрофизиологических параметров составляла  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ . Чистоту используемых реактивов тестировали ЯМР-спектрографом «Bruker-300» (Германия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Excel-2010.

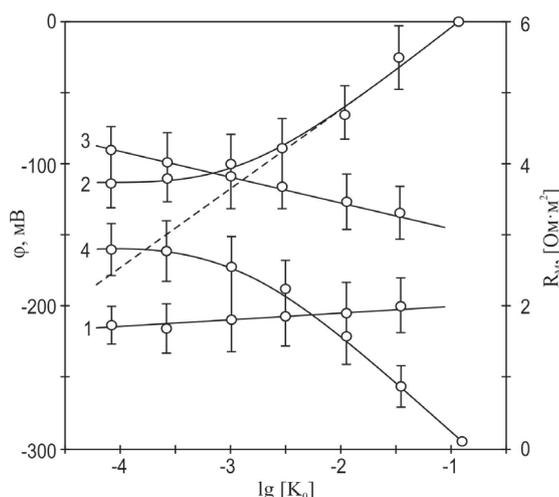
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Разброс значений  $\varphi_m$  опытных клеток в стандартных условиях находился в пределах  $-125 \div -245$  мВ со средним значением  $\varphi_m = -171 \pm 0,4$  мВ. Распределение  $\varphi_m$  по числам клеток не подчинялось закону нормального распределения. Мембранное сопротивление опытных клеток варьировало в пределах 1,5-9 Ом·м<sup>2</sup>, а их электрические ёмкости – в пределах 0,44-1,33 мкФ·см<sup>2</sup>. Средние значения этих величин для 100 клеток в стандартных условиях среды составляли  $R_m = 3,8 \pm 0,15$  Ом·м<sup>2</sup>,  $C_m = 0,9 \pm 0,05$  мкФ·см<sup>2</sup> соответственно. Между  $R_m$  и  $\varphi_m$  установлена линейная зависимость  $R_m = 0,032 - 0,03 \varphi_m$  с коэффициентом корреляции  $r = 0,67$ . Активность ионов  $\text{K}^+$  в цитоплазме клеток, измеренной с помощью  $\text{K}^+$ -чувствительных микроэлектродов составляла  $a_{\text{K}^+} = 104 \pm 6$  мМ.

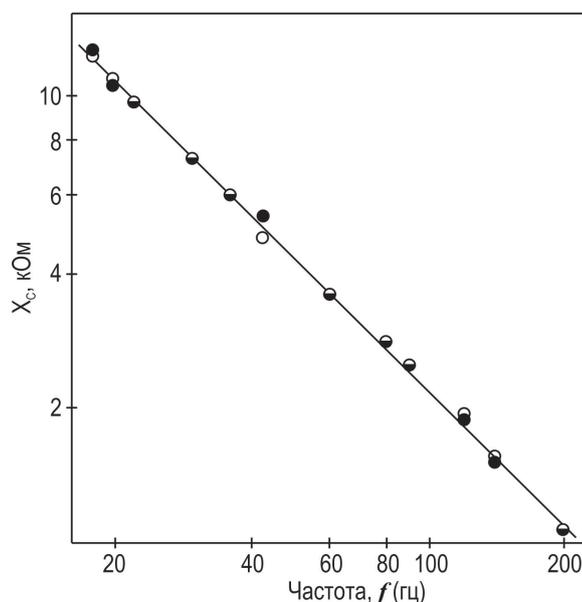
На первом этапе наших исследований для мониторинга функционального состояния системы первичного активного транспорта, нами установлены зависимости электрофизиологических характеристик от содержания  $\text{K}^+$  в среде. При ступенчатом увеличении содержания  $\text{K}^+$  в среде выявлена деполяризация ПМ. Величина и кинетика деполяризации мембраны зависела от уровня их мембранного потенциала в стандартных условиях и концентрации  $\text{K}^+$  в среде (рис. 1).

В этом плане различались два типа клеток. Клетки с  $|\varphi_m| > 170$  мВ на увеличение концентрации  $\text{K}^+$  в среде реагировали очень слабо. Наклоны зависимостей  $\varphi_m$ ,  $R_m$  на единицу логарифма концентрации составляли 6 мВ, 0,2 Ом·м<sup>2</sup> соответственно (рис. 1). А клетки с  $|\varphi_m| < 170$  мВ оказались очень чувствительными на увеличение внешней концентрации  $\text{K}^+$ . Наклоны зависимостей  $\varphi_m$ ,  $R_m$  на единицу логарифма внешней концентрации  $\text{K}^+$  в диапазоне 30-100 мМ составляли 58 мВ, 1,7 Ом·м<sup>2</sup> соответственно (рис. 1). Величина  $\varphi_m = -170$  мВ соответствует границам диапазонов активации двух типов  $\text{K}^+$ -каналов. Причем она для разных видов харовых значительно не различается [8,9]. У клеток с  $|\varphi_m| > 170$  мВ в проводящем состоянии находятся  $\text{K}^+$ -каналы внутреннего выпрямления (ККВВ), а у клеток с  $|\varphi_m| < 170$  мВ- каналы наружного выпрямления (ККНВ). По данным разных авторов проводимость ККНВ на один порядок выше проводимости ККВВ, что обуславливает переходы  $R_m$  между различными величинами при изменении экзогенной концентрации  $\text{K}^+$ .

Изменения  $C_m$  в данной работе оценивались по смещению амплитудно-частотной характеристики ёмкостного сопротивления. В наших исследованиях 10, 100-кратное увеличение содержания  $\text{K}^+$  в составе питательной среды не приводило к смещению амплитудно-частотной характеристики ёмкостного сопротивления (рис. 2) ПМ. Нечувствительность ёмкостного сопротивления плазматической мембраны к повышению концентрации  $\text{K}^+$  в составе питательной среды была характерна для всех исследуемых клеток. С другой стороны, на фоне постоянства электрической емкости происходили уменьшения  $\varphi_m$ ,  $R_m$ . Эти факты свидетельствуют о перестройках структурно-функциональной организации ионных каналов и ионных насосов мембраны,



**Рисунок 1.** Зависимость потенциала  $\varphi_m$  и сопротивления  $R_m$  ПМ клеток *Nitellopsis obtusa* от десятичного логарифма концентрации  $\text{K}^+$  в омывающем растворе. Значение логарифма концентрации -4 по оси абсциссы соответствует содержанию  $\text{K}^+$  в искусственной прудовой воде. Кривые 1, 3 соответствуют потенциалу и сопротивлению клеток с  $|\varphi_m| > 170$  мВ, а 2, 4 – те же самые параметры клеток, с  $|\varphi_m| < 170$  мВ. Пунктиром проведена зависимость Нернстовского потенциала от концентрации  $\text{K}^+$  в среде, с учётом внутриклеточной активности ионов калия  $a_{\text{K}^+} = 104$  мМ



**Рисунок 2.** Амплитудно-частотная характеристика ёмкостного сопротивления плазматической мембраны клетки *Nitellopsis obtusa* в стандартных условиях среды ( $\circ$ ), в среде с повышенной концентрацией  $K^+$  ( $\bullet$ ). ( $\ominus$ ) совпадающие точки названных характеристик. Длина и диаметр клетки составили 21 и 0,8 мм соответственно  $C_m = 0,6$  мкф·см<sup>-2</sup>

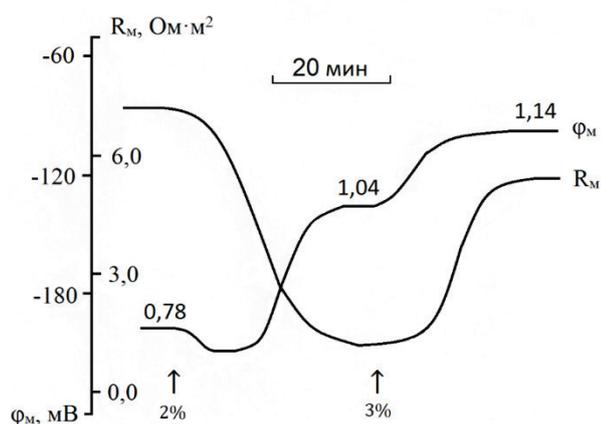
составляющих её белковую фазу. Для тестирования отсутствия изменения мембранной ёмкости при конформационных перестройках белковых каналов и ионных насосов ПМ нами была предпринята попытка измерения ёмкости мембраны при включении в её состав компонентов белковой природы. С этой целью нами выбраны два модификатора проводимости белковой природы. Из литературы известно, что молекулы выбранных модификаторов эффективно внедряются в структуру клеточных мембран и обеспечивают селективный перенос одновалентных катионов между средой и цитоплазмой клеток [10,11]. Так, включение в состав питательной среды полипептидного антибиотика, циклической структуры -  $10^{-6}$  М валиномицина деполаризовало ПМ в течение 30 минут на 25-30 мВ. Деполаризация ПМ сопровождалась уменьшением мембранного сопротивления на 25-30% (рис. 3). Изменения  $\varphi_m$ ,  $R_m$  происходили при постоянстве  $C_m$ . Эти данные свидетельствуют о том, что изменение белкового содержания ПМ не затрагивает величину мембранной ёмкости. Последующее увеличение концентрации антибиотика в составе питательной среды до  $10^{-5}$  М не вызвало существенное изменение регистрируемых нами параметров плазматической мембраны  $\varphi_m$ ,  $R_m$ ,  $C_m$ . При исключении антибиотика из состава питательной среды, в течение 20-25 мин происходило полное восстановление  $\varphi_m$ ,  $R_m$  на своих первоначальных уровнях в стандартных условиях.

Клетки, мембранный потенциал которых находился в диапазоне активации ККНВ, на введение в среду вышеуказанных концентраций антибиотика не реагировали. Нечувствительность  $\varphi_m$ ,  $R_m$  на отмеченных уровнях мембранного потенциала свидетельствует об отсутствии градиента электрохимического потенциала по ионам, для которых плазматическая мембрана хорошо проницаема.

На этом уровне мембранного потенциала каналформеры билипидных мембран 10 нМ грамицидин А и его производная грамицидин С также не вызвали электрофизиологические эффекты. Однако у клеток,  $\varphi_m$  которых находился в диапазоне ККВВ появление в наружной среде 10 нМ грамицидина А или С в течение 30 мин вызвали деполаризацию ПМ до уровня  $K^+Na^+$ - диффузионного потенциала  $-120 \pm 12$  мВ и двукратного уменьшения  $R_m$ . Эти эффекты антибиотиков связаны с формированием токопроводящих комплексов в ПМ в присутствии антибиотиков, о чём свидетельствует существенное уменьшение мембранного сопротивления, сопровождаемое деполаризацией мембраны. В наших экспериментах полное восстановление  $\varphi_m$  мембраны при отмывании клеток от полипептидных антибиотиков длилось в течение 45 мин. Интересным является тот факт, что электрофизиологические эффекты грамицидина А и С проявлялись при неизменном  $C_m$ .

Таким образом, нами установлено, что при модуляции белкового содержания ПМ: перестраиванием канального белка, встраиванием циклического полипептида, включением полипептидной цепи в мембранную структуру не происходит изменения электрической ёмкости ПМ интактной клетки. Следовательно, вклад белковой фазы ПМ в её суммарную электроёмкость незначителен. Остаётся предположить, что электрическая ёмкость плазматической мембраны отражает структурно-поляризационное состояние её липидной фазы. Действительно проводимость и электроёмкость белков настолько велики, что они не способны накопить заряд, как в статистических, так и в переходных условиях [1,3].

Для тестирования взаимосвязи функциональной активности и лабильности структурно-поляризационных свойств ПМ нами проведен ингибиторный анализ с применением специфического ингибитора  $H^+$ -АТФазы - дициклогексилкарбодимида (ДЦКД). ДЦКД обладает липофильной природой, хорошо растворяется в этаноле. Пороговая концентрация ингибитора ( $10^{-6}$  М) и концентрация вызывающая максимальный электрофизиологи-



**Рисунок 3.** Кинетика изменения мембранного потенциала ( $\varphi_m$ ) и сопротивления ( $R_m$ ) клеток *Nitellopsis obtusa* при последовательном включении в состав питательной среды 2% и 3% концентрации диметилсульфоксида (ДМСО). Моменты поступления отмеченных концентраций ДМСО в измерительную камеру указаны стрелками. Цифрами на кинетической кривой мембранного потенциала указаны значения мембранной емкости ПМ, соответствующие моментам регистрации  $\varphi_m$

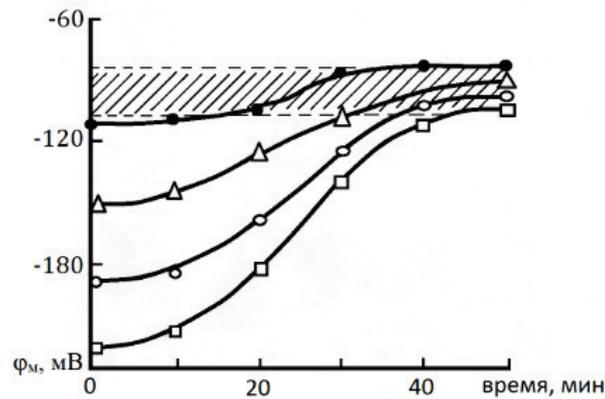
ческий эффект ( $5 \cdot 10^{-6}$  М) оказались очень близкими. Это затруднило установление зависимости электрофизиологического эффекта ингибитора от его концентрации.

Электрофизиологические эффекты ДЦКД определялись исходным уровнем  $\varphi_m$  клеток. Клетки,  $\varphi_m$  которых находились в диапазоне активации ККНВ на введение в среду  $10^{-6}$  М ДЦКД не реагировали на действие ингибитора, или реагировали гиперполяризацией ПМ в пределах 15 мВ. Изменения  $\varphi_m$  при этом сопровождалось увеличением  $R_m$  на 25-30%, уменьшением  $C_m$  12-18%. Действие повышенной концентрации ингибитора принципиально не различалось от действия его пороговой концентрации. Клетки,  $\varphi_m$  которых находились в диапазоне активации ККВВ на введение в среду  $10^{-6}$  М ДЦКД реагировали деполяризацией ПМ, в условиях постоянства  $R_m$ . При этом обнаружено уменьшение  $C_m$ , величина которой в некоторых опытах могло достигнуть 20%. Максимальное увеличение  $C_m$  (до 27%) выявили при увеличении концентрации ингибитора в среде до  $5 \cdot 10^{-6}$  М. Эти факты свидетельствуют о причастности липидной фазы плазматической мембраны в регуляции её электрогенной активности. Данное предположение может найти своё подтверждение при воздействии неполярного (липофильного) растворителя на ПМ. Поэтому очередной этап наших исследований мы посвятили изучению электрогенной активности и структурной лабильности ПМ при модификации липидной фазы липофильным растворителем. В качестве липофильного растворителя нами применён диметилсульфоксид (ДМСО). Амфифильность молекулы ДМСО создает условие её быстрого проникновения в органы и ткани живых систем [1, 3]. Высокая проникающая способность молекулы растворителя в липидный матрикс клеточных мембран может привести к изменению её электроемкости и впоследствии электрогенной активности и проницаемости.

Для тестирования предполагаемых эффектов растворителя мы пользовались его растворами в ИПВ. Пороговое значение экзогенной концентрации ДМСО в составе ИПВ оказалась 1% ( $8 \cdot 10^{-4}$  М/л). При появлении отмеченной концентрации ДМСО в составе ИПВ, ПМ гиперполяризовалась на 20-25 мВ в течение 40 мин при постоянстве  $R_m$ . Емкость ПМ при этом увеличилась на 22-26%. Такая гиперполяризация была характерна для клеток,  $\varphi_m$  которых находился в диапазоне активации ККНВ. В гиперполяризованном состоянии клетка могла держаться в течение часа и дольше.

Как нами установлено на начальном этапе данной работы, электрическая ёмкость является, в основном, показателем липидной фазы биомембран. Поэтому твёрдо можно утверждать, что все эти факты свидетельствуют об активации электрогенной системы ПМ за счет изменения физического состояния липидного окружения протонных помп. Амфифильность и высокая проникающая способность молекулы растворителя [12-14] позволяют ей внедряться в состав липидной фазы мембраны, о чем свидетельствует увеличение емкости ПМ (рис. 3). Отмеченное положение было доказано посредством тонких физических методов с применением нейтронного и синхротронного излучения [15,16]. С другой стороны, становится очевидным регуляторная роль физического состояния липидной фазы в установлении функциональной активности ПМ.

При появлении в составе питательной среды повышенной концентрации ДМСО обнаружили небольшую переходную гиперполяризацию только в начале воздействия (рис.3). Далее следовала фаза деполяризации ПМ на 60-70 мВ. Процесс сопровождался значительным уменьшением мембранного сопротивления и увеличением мембранной емкости (рис.3). Дальнейшее увеличение концентрации ДМСО в составе питательной среды вызвало деполяризацию плазмалеммы ещё на 30 мВ и резкий рост сопротивления, чуть не доходившее до исходного уровня. Увеличение мембранного сопротивления сопровождалось дальнейшим ростом мембранной емкости на 40% от исходной величины. Таким образом, увеличение емкости под влиянием ДМСО носило двухфазный характер. Первая фаза увеличения  $C_m$  происходило на фоне уменьшения, а вторая - на фоне увеличения  $R_m$ . Общий



**Рисунок 4.** Деполяризация ПМ клеток *Nitellopsis obtusa* под влиянием различных концентраций ДМСО в ИПВ: □ - 2%; ○ - 3%; △ - 4%; ● - 5%. Точками на графике представлены средние значения опытных величин, среднеквадратическое отклонение которых по вертикали не превышало 10% основной величины. Каждая точка была получена в результате 7-9 измерений. Начало координат соответствует моменту добавления ДМСО в среду, окружающую опытную клетку

рост деполяризации ПМ при этом составил 95 мВ (рис. 3). Величина деполяризации ПМ зависела как от исходного уровня  $\phi_m$ , так и от концентрации ДМСО (рис. 3). Исходные  $\phi_m$  клеток, которые подвергались деполяризации под влиянием ДМСО находились в диапазоне -110÷-230 мВ. Наибольшую величину деполяризации выявили у клеток с большим исходным  $\phi_m$  при действии относительно высоких концентраций растворителя в окружающей среде опытной клетки (рис. 3). После деполяризации ПМ, конечные уровни  $\phi_m$  исследуемых клеток расположились в полосе мембранных потенциалов шириной 20 мВ около  $\phi_m \sim -100$  мВ.

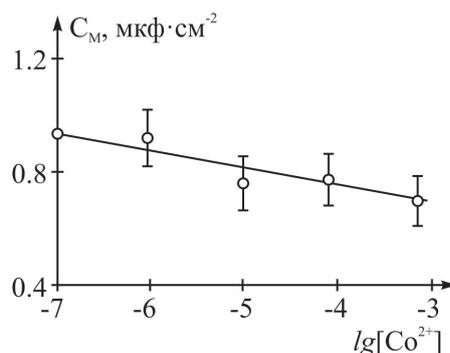
Двукратное увеличение содержания ДМСО в составе ИПВ вызвало подавление электрогенной активности ПМ. При этом происходит реализация градиента электро-химического потенциала плазматической мембраны по  $\text{Na}^+$  ( $\Delta\mu_{\text{Na}^+} = ZF\Delta\phi_m \approx 13,5$  кДж/моль), направленного внутрь клеток. Значительное снижение мембранного сопротивления при этом согласуется с фактами, установленными в ранних работах [17]. Нам кажется, что это могло бы произойти за счет потери  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  избирательности  $\text{K}^+$ -каналов за счет конформационных перестроек, в результате чего  $\text{K}^+$ - каналы оказываются проницаемы и для  $\text{Na}^+$ . Результатом этих событий является деполяризация ПМ. А увеличение  $\text{Na}^+$ -проницаемости ПМ клеток под влиянием ДМСО чётко продемонстрировано в работах [18,19].

Увеличение  $R_m$  при повышении концентрации ДМСО на фоне продолжающейся деполяризации мембраны сопровождалось значительным увеличением мембранной емкости (рис. 2). Как уже было отмечено выше, всякое изменение мембранной емкости является отражением изменения структурно-поляризационного состояния липидной фазы мембраны, что могло бы привести к разрушению функционально активной конформации канальных белков, а также электрогенной помпы. И, вероятно, под влиянием повышенных концентрации ДМСО происходит не разрушение мембранной структуры, а перестройка функционально активных конформаций компонентов транспортных коммуникаций. Об этом может свидетельствовать факт, установленный на клетках *Chara gymnophylla*, что при замене в измерительной камере ИПВ на чистый ДМСО происходило уменьшение  $\phi_m$  до нуля, однако мембранное сопротивление при этом установилось на уровне, превышающий уровень  $R_m$  в ИПВ в несколько раз [17]. Это указывает на то, что даже в присутствии самых больших концентраций ДМСО клеточная мембрана сохраняет свою целостность, что обеспечивается, в основном, липидным матриксом и структурными белками ПМ (рис. 3).

Итак, проведённый нами экспериментальный и теоретический анализ закономерностей изменения потенциала сопротивления и ёмкости при действии ДМСО позволил установить, что растворитель может быть применён в качестве эффективного регулятора транспортных функций биологических мембран. Регулированием электрофизиологических параметров клеток *Nitellopsis obtusa* в присутствии ДМСО выявили взаимосвязь между функциональной активностью и структурной лабильностью ПМ.

Для выявления возможной взаимосвязи между функциональной активностью и структурной лабильностью ПМ при блокировании её ионных каналов нами предпринято воздействие на мембрану катионами кобальта. Ответная реакция здесь тоже оказалась зависимой от  $\phi_m$ .

У клеток,  $\phi_m$  которых находились в диапазоне активации ККНВ первичный эффект добавления в состав питательной среды  $10^{-6}$  М  $\text{Co}^{2+}$  в виде соли  $\text{CoCl}_2$  было уменьшение электрической ёмкости плазмалеммы в пределах 20%. Следом за уменьшением электрической ёмкости ПМ происходило увеличение её электрогенной активности на 20-25 мВ. Отмеченные изменения  $C_M$  и  $\phi_m$  происходили при постоянстве мембранного сопротивления ПМ, то есть уменьшение шунта протонных насосов не причастно в изменениях мембранных параметров. Следовательно, увеличение абсолютного значения  $\phi_m$  отражает усиление электрогенной активности ПМ за счёт изменения физического состояния липидной фазы, о чём свидетельствует заметное изменение её электрической ёмкости под влиянием катионов  $\text{Co}^{2+}$ .



**Рисунок 5.** Корреляционная зависимость электрической ёмкости ПМ от десятичного логарифма концентрации  $CoCl_2$  в составе питательной среды. Коэффициент линейной корреляции  $r = 0,7$ , линейная зависимость установлена как  $C_M = 0,93 - 0,065\lg[Co]$

В наших экспериментах при включении в состав питательной среды  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  М концентрации  $Co^{2+}$  также происходило увеличение абсолютного значения  $\phi_m$  на 20-25% при постоянстве  $R_M$ . Но величина убыли электрической ёмкости возрастало до 32%. Уменьшение электрической ёмкости может произойти за счёт увеличения толщины плазмалеммы и за счёт экранирования поверхностного заряда, приводящего к уменьшению поляризуемости липидной фазы ПМ. Здесь тоже становимся очевидцами активации протонной помпы, которая может произойти также за счёт изменения физического состояния их липидного окружения.

Особенно примечательный электрофизиологический эффект катионов  $Co^{2+}$  проявился при достижении его концентрации в среде  $10^{-3}$  М. Появление  $10^{-3}$  М  $Co^{2+}$  в среде вызвало гиперполяризацию ПМ на 80-100 мВ в течение 40-50 мин. Значительная гиперполяризация ПМ под влиянием  $Co^{2+}$  обнаружена также в междоузловых клетках *Chara gymnophylla* [9] и корневых волосках *Trianea bogotensis*. Гиперполяризация плазмалеммы в наших опытах сопровождалась увеличением мембранного сопротивления в 4-5 раза. При повторном введении катиона в среду  $R_M$  ПМ установились на относительно высоких уровнях. Уровни  $R_M$  в ИПВ после отмывания клеток от катиона также оказались выше сопротивления клеток, не обработанных  $Co^{2+}$ . Этот эффект  $Co^{2+}$  мы обнаружили только у клеток, мембранный потенциал которых находился в диапазоне активации ККНВ. Следовательно, обнаруженное нами многократное увеличение  $R_M$ , сопровождаемое гиперполяризацией ПМ, отражает блокирование наружу выпрямляющих  $K^+$ -каналов. А значительная гиперполяризация ПМ в присутствии  $10^{-3}$  М  $Co^{2+}$  несомненно, является следствием уменьшения шунтирующей нагрузки протонной помпы. Но значительной гиперполяризации плазмалеммы всегда предшествовало также уменьшение электрической ёмкости ПМ. Поэтому вполне вероятно, что в значительную гиперполяризацию ПМ вносит свой вклад также изменение физического состояния природного окружения мембранных помп – липидной фазы. Подтверждением такого предположения может явиться тот факт, что гиперполяризация 18-20 мВ ПМ в сопровождении уменьшения её электрической ёмкости на 20% мы выявили даже у клеток, к  $\phi_m$  которых находились в диапазоне активации ККВВ, когда изменение  $R_M$  отсутствовало даже в присутствии в наружной среде  $10^{-3}$  М  $Co^{2+}$ . Отсюда следует, что гиперполяризация ПМ на 20-25 мВ под влиянием  $Co^{2+}$ , сопровождаемая изменением электрической ёмкости липидной фазы, характерна для всех клеток *Nitellopsis obtusa*. А отсутствие изменения  $R_M$  клеток,  $\phi_m$  которых находились в диапазоне активации ККВВ даже в присутствии повышенной концентрации катиона  $10^{-3}$  М  $Co^{2+}$  показывает, что катион способен блокировать только  $K^+$ -канала наружного выпрямления.

Подводя итоги анализам изменения электрофизиологических параметров ПМ клеток *Nitellopsis obtusa* под влиянием катионов  $Co^{2+}$  нами установлено что всякие изменения структурно-поляризационных свойств отражаются в изменениях её электрогенной активности. Катионы  $Co^{2+}$  удачно инактивируют ККНВ, не затрагивая при этом ККВВ.

Установленные факты в представленной работе свидетельствуют о том, что изменения структурно-поляризационного состояния ПМ можно контролировать непрерывным измерением электрической ёмкости, что является важным моментом идентификации закономерностей белок-липидного взаимодействия в биомембранах. Скрининг механизмов белок-липидного взаимодействия в биомембранах могло бы стимулировать идентификацию усиления функциональной активности транспортных АТФаз посредством липидной фазы. Совокупность установленных фактов о влиянии стандартных модификаторов на основные электрофизиологические параметры ПМ свидетельствуют о наличии органической связи между функциональной активностью и фазовым состоянием липидного окружения функциональных групп. Вероятно, это осуществляется по определённой генетической программе, что должно заинтересовать молекулярных биологов.

#### Список литературы / References:

1. Volkov G.A. Plant Electrophysiology: "Theory and methods". Springer-Verlag-New-York, 2006, 512 p.
2. Cole K.S. Electrical properties of squid axon sheath. *Biophys. J.*, 1976, vol. 16, pp. 137-142.
3. Adrian R.H., Almers W. Charge movement in the membrane of striated muscle. *J. Physiol. London*, 1976, vol. 254, pp. 339-360.

4. Musayev N.A., Ojaqverdiyeva S.Y., Mahmudova Sh.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, vol. 3, no. 3, pp. 241-247.
5. Воробьев Л.Н., Мусаев Н.А. Электрические характеристики плазмалеммы и клеточной оболочки клеток *Nitellopsis obtusa*. Низкочастотной импеданс. *Физиология растений*, 1979, т. 26, № 4, с. 711-720. [Vorobyev L.N., Musayev N.A. Electrical characteristics of plasma membrane and cell wall of *Nitellopsis obtusa* cells. Low frequency impedance. *Plant physiology*, 1979, vol. 26, no. 4, pp. 711-720. (In Russ.)]
6. Lu C.C., Kabakov A., Markin S., Mager S. et al., Membrane transport mechanisms probed by capacitance measurements with megahertz voltage clamp. *Proced. Natl. Acad. Science USA*, 1995, vol. 92, pp. 11220-11224.
7. Мусаев Н.А., Воробьев Л.Н. Электрогенная активность и структурная лабильность плазмалеммы клеток *Nitellopsis obtusa* при повышенных температурах. *Физиол. раст.*, 1981, т. 28, № 1, с. 86-93. [Musayev N.A., Vorobyev L.N. Electrogenic activity and structural lability of plasma membrane of *Nitellopsis obtusa* cells at elevated temperatures. *Plant physiology*, 1981, 28(1), pp. 86-93. (In Russ.)]
8. Мусаев Н.А., Юрин В.М., Соколик А.И., Исмаилов Э.Р. Электрогенная активность плазматической мембраны клеток *Chara gymnohylla*. *Вестник БГУ*, 2008, сер. 2, № 3, с. 46-49. [Musayev N.A., Yurin V.M., Sokolik A.I., Ismailov T.R. Elektrogenic activity of plasma membrane of *Chara gymnohylla* cells. *Messenger of BSU*, 2008, ser. 2, no. 3., pp. 46-49. (In Russ.)]
9. Musayev N.A., Ismailov E.R. Bioelectrical properties of *Chara gymnohylla* plasma membrane during interaction with cobalt (Co<sup>2+</sup>). *Ecology*, vol. 200763, pp. 1-6.
10. Самойлов В.О. Медицинская биофизика. *Спец. лит.*, 2004, 495 с. [Samoylov V.A. Medical Biophysic. *Spes. Lit*, 2004, 495 p. (In Russ.)]
11. Касумов Х.М. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. Баку-Москва, *Элм-Наука*, 2009, 512 с. [Kasumov Kh.M. Structure and membrane function of polyene makrolide antibiotics. Baku-Moscow, *Elm- Nauka*, 2009, 512 p. (In Russ.)]
12. Ибрагимова В.Х., Алиев Д.И., Алиева И.Н. Биофизические и медикобиологические аспекты использования полиеновых антибиотиков в сочетании с диметилсульфоксидом. *Биофизика*, 2002, т. 47, № 5, с. 833-841. [Ibrahimova, V.Kh., Aliyev, D.I., Aliyeva, I.N. Biophysical and medical-biological aspects of using of polyene antibiotics in combination with dimethyl sulfoxide. *Biophysics*, 2002, vol. 47, no. 5, pp. 833-841 (in Russ.)]
13. Yu Z.W., Quinn P.J. *Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology*. *Bioscience Report*, 1994, vol. 14, pp. 259-81.
14. Chi-Yuan Cheng, Jinsuk Song, Jolien Pas, Lenny H.H. Meijer, Songi Han. DMSO Induces Dehydration near Lipid Membrane Surfaces. *Biophys J.*, 2015, vol. 109, no. 2, pp. 330-339. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.06.011.
15. Киселёв М.А. Комбинированное применение нейтронного и синхротронного излучения для исследования влияния диметилсульфоксида на структуру и свойства мембран дипальмитоилфосфатидилхолина. *Кристаллография*, 2007, т. 52, № 3, с. 554-559. [Kiselyov M.A. Combined use of neutron and synchrotron radiation to study the effect of dimethyl sulfoxide on the structure and properties of dipalmitoylphosphatidylcholine membranes. *Crystallography*, 2007, vol. 52, no. 3, pp. 554-559. (In Russ.)]
16. Klaus-Dieter Liss. *Challenged by Neutron and Synchrotron Radiation*. *Metals*, 2017, no. 7, pp. 266-274.
17. Исмаилов Э.Р., Мусаев Н.А. Диметилсульфоксид индуцированная деполяризация плазмалеммы клеток *Chara gymnohylla*. *Вестник Бакинского Государственного Университета*, серия естественные науки, 2005, № 1, с. 74-79. [Ismailov E.R., Musayev N.A. Dimethyl sulphoxide induced depolarization of plasmalemma of *Chara gymnohylla* cells. *Messenger of Baku State University*, series of natural sciences, 2005, no. 1, pp. 74-79. (In Russ.)]
18. Орлова О.В., Егорова С.Н., Ослопов В.Н. Исследование влияния диметилсульфоксида на проницаемость клеточных мембран. *Экспериментальная медицина*, 2011, т. 92, № 6, с. 901-904. [Orlova O.V., Egorova S.N., Oslopov V.N. Study of the effect dimethyl sulphoxide on the permeability of cell membranes. *Experimental Medicine*, 2011, vol. 92, no. 6, pp. 901-904. (In Russ.)]
19. Călinescu O., Linder M., Wöhlert D., Yildiz Ö., Kühlbrandt W., Fendler K. Electrogenic Cation Binding in the Electroneutral Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter of *Pyrococcus abyss*. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, vol. 291, iss. 52, pp. 26786-26793.

**FUNCTIONAL ACTIVITY AND STRUCTURAL LABILITY OF PLASMA MEMBRANE IN *NITELLOPSIS*  
*OBTUSA* CELLS****Mahmudova Sh.S.<sup>1</sup>, Musayev N.A.<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Institute of Botany, National Academy of Sciences of Azerbaijan  
*Baku, Azerbaijan; e-mail: mahmudovashirin656@gmail.com*<sup>2</sup> Department of Biophysics and Molecular biology, Baku State University  
*Baku, Azerbaijan; e-mail: nagi.musayev@hotmail.com*

**Abstract.** Using the method of impedance spectroscopy, we studied the change regularities in the three electrical characteristics of *Nitellopsis obtuse* cells: potential  $\varphi_m$ , resistance  $R_m$ , capacity  $C_m$ , while modifying the transport properties of the plasma membrane (PM). The average values of these quantities for 100 cells under standard conditions were  $\varphi_m = -171 \pm 0,4$  mV,  $R_m = 3.8 \pm 0,15$  Ohm·m<sup>2</sup>,  $C_m = 0,9 \pm 0,05$   $\mu$ F·cm<sup>-2</sup>, respectively. Between  $R_m$  and  $\varphi_m$  has been established a linear dependence of  $R_m = 0,032 - 0,03\varphi_m$  with a coefficient correlation  $r = 0,67$ . The activity of K<sup>+</sup> ions in the cell cytoplasm, measured using K<sup>+</sup>-sensitive microelectrodes, was  $a_{k^+} = 104 \pm 6$  mM. In the conducting state, in cells with  $|\varphi_m| > 170$  mV, were observed K<sup>+</sup>- channels of inward rectification and in cells with  $|\varphi_m| < 170$  mV - K<sup>+</sup>- channels of outward rectification. At 10 and 100-fold increase of the K<sup>+</sup> content in the medium, and modulation of the protein phase content in the PM,  $C_m$  change wasn't observed. Consequently, the contribution of the protein phase in PM is insignificant for  $C_m$ . The exogenous effects of low concentrations of lipophilic modifiers of dimethyl sulfoxide, dicyclohexylcarbodiimide and the K<sup>+</sup> channel blocker Co<sup>2+</sup> caused a change of  $C_m$  by 20-30%, an increase in  $\varphi_m$  within 30 mV at a constant  $R_m$ , which indicated the relationship between electrogenic activity and lability of structural-polarization PM properties.

**Key words:** lability, Functional activity.