

ON THE ROLE OF THE BILAYER-MENISCUS BOARD IN ELECTRIC BREAKDOWN OF BILAYER LIPID MEMBRANES (BLM)

V. B. AKAKELYAN, H. R. KHACHATRIAN, N. S. MATINYAN, Ts. M. AVAKIAN

This report is based on the experimental results showing that the electric breakdown of BLM of a sufficiently small area S ($S < 0,24 \text{ mm}^2$) is going on as a results of birth and development of board-allocated defects. It is shown, also, that the density of these defects is two orders more than that of those placed on the bilayer surface.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абидор И. Г., Аракелян В. Б., Пастушенко В. Ф., Тарасевич М. Р., Черномордик Л. В., Чизмаджев Ю. А. Докл. АН СССР, 240, 3, 733—736, 1978.
2. Абидор И. Г., Аракелян В. Б., Пастушенко В. Ф., Черномордик Л. В., Чизмаджев Ю. А. Докл. АН СССР, 245, 5, 1239—1242, 1979.
3. Аракелян В. Б. Электрохимия, 16, 2, 218—220, 1980.
4. Аракелян В. Б., Хачатрян Г. Р., Матинян Н. С. *Studia biophysica* (в печати).
5. Исков В. Г., Берестовский Г. Н., Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.
6. Левин Б. Р. Теория надежности радиотехнических систем. М., 1981.
7. Пучкова Т. В., Путвинский А. В., Владимиров Ю. А. Докл. АН СССР, 249, 5, 1241—1244, 1979.
8. Abidor J. G., Arakeljan V. B., Pastushenko V. F., Tarasevich M. R., Chernomordik L. V., Chizmadzhev Yu. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 6, 37—52, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 9, 1982

УДК 581.175

ИОННАЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ И ЗАВИСИМОСТЬ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ОТ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ

Г. Н. ХАЧАТРЯН, Г. Т. КАЗАРЯН

Исследовали влияние ионного состава (K^+ , Na^+ , H^+ , Li^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) среды и ингибиторов энергетического обмена (2,4-динитрофенол), белкового синтеза (актиномицин Д), протонного насоса (дициклогексилкарбодимид) на мембранный потенциал (МП) колеоптилей пшеницы. Высокие концентрации указанных соединений вызывали резкую деполяризацию плазматических мембран. Высказывается предположение о неспецифическом характере взаимодействия различного класса соединений с мембранными структурами клеток высших растений.

Ключевые слова: мембранный потенциал, плазматические мембраны.

Изучение действия различных соединений на мембраны интересно как с точки зрения установления свойств самих мембран, так и для понимания механизма их действия. Изменения МП клетки, подвержен-

ной различным воздействиям, могут в большей или меньшей степени предсказать поведение мембран при данном воздействии.

В последние годы сильно возрос интерес к этим проблемам, в частности, к проблеме воздействия на клетку различных ингибиторов на мембранном уровне [3, 9], а также различных ионов, в присутствии которых во внешней среде меняются свойства поверхностной клеточной мембраны [2, 9].

Целью настоящих исследований было выявление характера взаимодействия специфических и метаболических ингибиторов с плазматическими мембранами клеток колеоптилей пшеницы.

Материал и методика. Объектом исследования служили колеоптили 3-дневных проростков пшеницы сорта «Безостая-1». Методы получения проростков и регистрации МП описаны ранее [4, 5]. В экспериментах использовались хлористые соли H^+ , K , Na^+ , Li^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} в концентрациях от 0,01 до 100 мМ, а также растворы динитрофенола (2,4-ДНФ, от 0,01 до 10 мМ), актиномицина Д (10 γ /мл) и дициклогексилкарбодиимида (ДЦКД, 8×10^{-6} М) с различными значениями pH: от двух до восьми. Кислые значения pH получались с помощью HCl, щелочные значения — КОН. Полученные значения pH контролировали на универсальном иономере марки ЭВ-74. Растворы 2,4-ДНФ, актиномицина Д и ДЦКД готовились на 1 мМ растворе KCl. В таком же растворе KCl измеряли контрольные значения МП.

Величину МП регистрировали через каждые две мин в течение 30 мин. В каждом варианте измеряли МП от 15 до 45 корешков.

Проводили статистическую обработку материала методом Стьюдента.

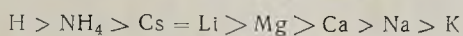
Результаты и обсуждение. Влияние ионного состава среды. Первичная реакция клетки на внешнее воздействие локализована на плазматической мембране, ряд характеристик которой определяется по закономерностям генерации МП. Известно, что величина последнего зависит от ионного состава внешней среды, с изменением концентрации которого меняются свойства самих клеточных мембран.

Путем измерения величины МП можно определить характер прохождения различных ионов через мембрану и тем самым предсказать поведение мембран при любых изменениях внешней среды.

Как неоднократно отмечалось, в отличие от мембран животных клеток мембраны клеток высших растений отличаются низкой избирательностью к различным ионам внешней среды [2, 9].

Найдено, что изменение проводимости плазматических мембран в растворах, содержащих хлорид-ион какого-нибудь одного элемента (одно- или двухвалентного), зависит от природы катиона. Табл. 1 иллюстрирует эту зависимость.

Из табл. 1 видно, что растительная мембрана в исследованном диапазоне концентраций четко различает ионы водорода от остальных ионов. Таким образом, исходя из данных табл. 1, можно составить следующий ряд, характеризующий ионную избирательность:



Подобную избирательность клеточных мембран высших растений можно объяснить спецификой жизнедеятельности и условиями существования этих растений, обусловленных ходом эволюции.

Таблица 1

Влияние ионного состава среды на МП клеток колеоптилей пшеницы, мв

Вид иона	Концентрация, мМ				
	100	10	1	0,1	0,01
H ⁺	+5,8±0,5	8,2±0,8	33,3±0,8	52,4±1,1	76,2±1,1
NH ₄ ⁺	2,2±0,5	26,4±0,7	51,4±1,6	76,7±0,9	94,5±0,9
Cs ⁺	4,6±0,8	29,8±0,8	60,9±0,9	84,7±0,7	97,8±0,6
Li ⁺	4,8±0,7	32,0±0,9	70,5±0,7	86,0±0,9	98,2±0,9
Mg ²⁺	0,2±0,9	32,6±0,9	60,9±1,2	81,4±1,0	103,2±1,3
Ca ²⁺	14,4±0,8	33,9±0,6	63,8±0,9	84,2±1,0	105,5±1,7
Na ⁺	9,3±1,2	32,9±1,2	72,9±1,3	98,0±1,2	113,9±1,8
K ⁺	3,6±1,2	33,8±1,2	76,4±1,2	97,9±1,5	115,3±2,9

Примечание: количество измерений в каждом отдельном варианте равно 45.

Действие ингибиторов на МП. Известно, что процессы переноса электронов и фосфорилирования АДФ до АТФ сопряжены промежуточным этапом—возникновением градиента активности водородного иона в мембране, где происходит фосфорилирование. Ингибитор метаболизма 2,4-ДНФ разобщает окислительное фосфорилирование: в его присутствии перенос электронов продолжается, но синтез АТФ оказывается подавленным. Вызывая утечку H⁺ в мембране, разобщающий агент тем самым препятствует возникновению градиента потенциальной энергии или градиента рН, вследствие чего необходимая свободная энергия для синтеза АТФ не обеспечивается.

Поскольку 2,4-ДНФ влияет не только на энергетику клетки, но и на проницаемость мембраны, в наших экспериментах мы попытались найти связь между действием 2,4-ДНФ и величиной МП. Оказалось, что проявление деполяризующего эффекта зависит от концентрации 2,4-ДНФ. Так, при концентрации 2,4-ДНФ, равной 10 мМ, развивается глубокая деполяризация мембран (МП падает на 50—55 мв), которая становится все меньше при более низких его концентрациях (1 и 0,1 мМ). При действии 0,01 мМ раствора 2,4-ДНФ МП падает всего на 3—6 мв. Во всех случаях деполяризации, даже под действием высокой концентрации (10 мМ) 2,4-ДНФ, имеется «остаточное» значение МП, которое не подавляется ингибитором метаболизма. Эта часть МП обусловлена диффузионными потоками через мембрану. Необходимо также отметить, что наблюдаемые эффекты при концентрации 2,4-ДНФ от 1 до 0,01 мМ обратимы: заменой раствора 2,4-ДНФ на 1 мМ раствор KCl достигается контрольный уровень МП.

В опытах по исследованию действия 10 мМ раствора 2,4-ДНФ на фоне растворов различных концентраций KCl (рис. 1) показано, что при всех примененных концентрациях KCl 2,4-ДНФ вызывает деполяризацию мембраны. Это лишний раз говорит о том, что МП клеток высших растений наряду с пассивной включает в себя также активную компоненту, которая и подавляется ингибитором метаболизма.

Являясь слабой кислотой, свое разобщающее действие 2,4-ДНФ проявляет в диссоциированной форме, и проявление эффекта зависит от рН среды [11]. Имеются работы [4, 6, 10], в которых приводятся из-

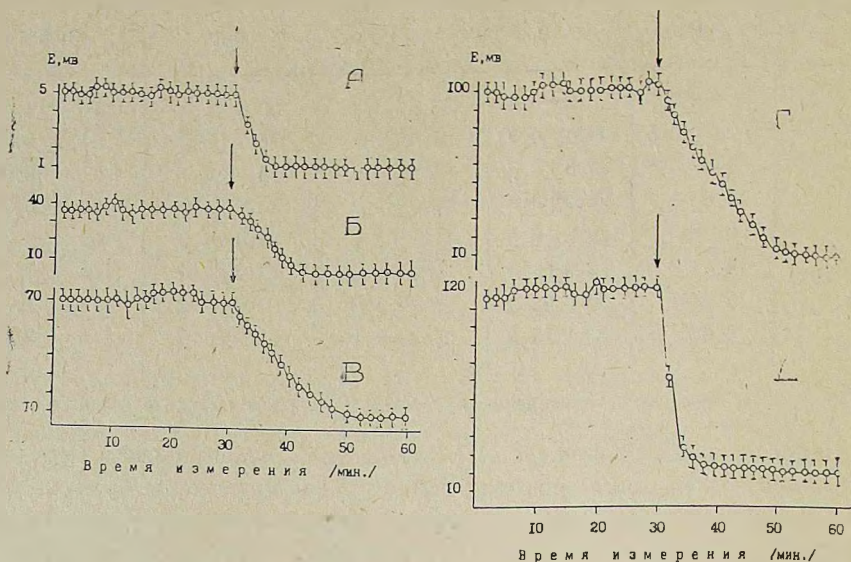


Рис. 1. Влияние различных концентраций KCl на фоне постоянной концентрации ДНФ (10 мМ) на величину МП клеток coleoptилей. А—100 мМ KCl ; Б—10 мМ KCl ; В—1 мМ KCl ; Г—0,1 мМ KCl ; Д—0,01 мМ KCl .

менения МП под действием различных значений рН среды. В этой связи нами было изучено действие 2,4-ДНФ на мембрану в зависимости от рН среды: сильнокислого (рН 2), слабокислого (рН 5) и щелочного (рН 8). Как и следовало ожидать, при всех значениях рН 2,4-ДНФ деполяризует мембрану (табл. 2). Однако, если при рН 2 падение МП составляет 11,9 мВ, а при рН 8—всего 4,1 мВ, то при слабокислом значении рН наблюдается сильная деполяризация мембраны: МП падает на 58,3 мВ.

Подобное действие 2,4-ДНФ можно объяснить, вероятно, действием рН на диссоциацию молекулы. В пределах рН 5 2,4-ДНФ диссоциирует в водном растворе и оказывает сильное действие на дыхание [1]. Такая связь между действием на дыхание и на МП свидетельствует в пользу предположения, что величина МП непосредственно зависит от метаболизма клетки. С другой стороны, возможно, что именно в диссоциированной форме молекулы ДНФ легче переносить ионы водорода через мембрану, что в свою очередь также имеет непосредственное влияние на величину МП.

Известно, что актиномицин Д блокирует синтез белка на уровне транскрипции, присоединяясь к ДНК-матрице и тем самым мешая работе РНК-полимеразы [7, 8]. Известно также, что ингибирующее действие актиномицина Д на синтез белка проявляется через 1,5—2 ч после добавления ингибитора [12]. Однако эксперименты по изучению действия актиномицина Д на мембрану показали, что деполяризация мем-

браны под его действием возникает сразу же после добавления ингибитора в перфузат (рис. 2), достигает 5 мв (величина МП падает на 70 мв) и с двадцатой мин измерения выходит на стационарный уровень. Замена же актиномицина Д на 1 мМ раствор КСl приводит к частичному восстановлению значений МП (до 55 мв). Подобная картина может быть оценена как проявление действия ингибитора на мембранном уровне: возможно, что под его действием нарушаются механизмы, ответственные за нормальное функционирование мембран.

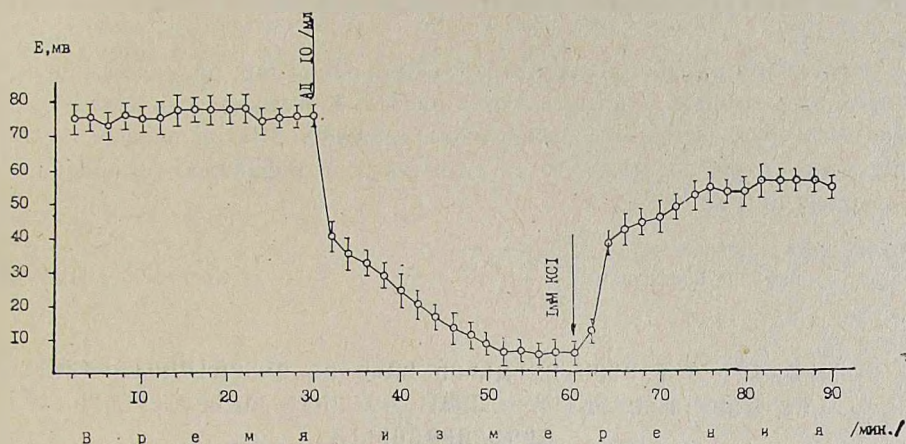


Рис. 2. Влияние актиномицина Д (10 γ/мл) на величину МП клеток колеоптилей.

Таблица 2

Влияние 2,4-ДНФ и ДЦКД на МП при различных значениях рН среды

рН среды	t, мин	Контроль	2,4-ДНФ	ДЦКД
2	5	— 2,5±1,3	— 7,2±1,0	— 5,0±1,2
	10	+ 3,2±1,5	+ 4,4±0,8	+ 4,4±1,3
	15	+ 4,0±1,0	+11,3±1,4	+15,2±1,4
	20	+ 8,2±1,8	+18,5±1,3	+19,5±1,1
	25	+10,3±2,1	+21,6±1,2	+23,6±1,8
	30	+12,4±1,8	+24,3±1,7	+28,7±1,9
5	5	—69,3±1,7	—46,2±1,9	—52,2±0,9
	10	73,0±1,9	40,4±1,5	58,0±1,4
	15	78,1±2,2	35,3±2,1	46,3±1,5
	20	76,8±1,6	30,1±1,1	45,1±1,8
	25	72,7±2,5	22,5±1,8	40,0±1,0
	30	77,5±1,3	19,9±2,0	40,2±1,3
8	5	49,6±1,1	40,0±1,1	47,2±1,2
	10	47,2±1,0	36,2±1,0	46,3±1,0
	15	40,0±1,6	33,3±1,4	40,1±1,7
	20	36,1±1,2	29,2±1,2	35,2±1,4
	25	32,0±1,5	27,4±1,5	30,0±1,1
	30	30,1±1,8	26,0±1,6	28,6±1,6

Примечание: количество измерений в каждом отдельном варианте равно 15.

Результаты опытов по изучению действия ДЦКД на плазматические мембраны показали, что, специфически подавляя работу Н⁺-насоса, ДЦКД непосредственно влияет на величину МП. В зависимости от

значений pH среды ингибирующее действие его проявляется по-разному: наиболее сильно оно выражено при pH 2, а при pH 8 ингибитор почти не эффективен (табл. 2). При pH 5 регистрируется почти 50%-ное ингибирование. Создается впечатление, будто ДЦКД блокирует протонные каналы, препятствуя созданию необходимого градиента pH. Это в свою очередь влияет на синтез АТФ, что оказывает двойное действие на МП. Во-первых, на величине МП сказывается низкий уровень метаболизма, во-вторых, не обеспечивается необходимая энергия для работы электрогенного H^+ -насоса, локализованного на плазматической мембране.

Таким образом, сравнительный анализ действия различных ингибиторов на мембрану клеток высших растений показал, что, хотя все они деполаризуют мембрану, кинетика изменения МП в разных случаях различна. А pH среды является лимитирующим фактором в проявлении действия ингибиторов.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 15/IV 1982 г.

ԲԱՐՁՐԱԿԱՐԳ ԲՈՒՅՍԵՐԻ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԻՈՆԱՅԻՆ ԸՆՏՐՈՂԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ՄԵՄԲՐԱՆԱՅԻՆ ՊՈՏԵՆՑԻԱԼԻ ԿԱՆՈՒՄԸ ԻՆՀԻԲԻՏՈՐՆԵՐԻ ԱԶԳԵՅՈՒԹՅՈՒՆԻՅ

Գ. Ն. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Հ. Տ. ԴԱԶԱՐՅԱՆ

Հետազոտվել է միջավայրի իոնական կազմի (K^+ , Na^+ , H^+ , Li^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) և էներգետիկ փոխանակության (2,4—դինիտրոֆենոլ), սպիրտակուցային սինթեզի (ակտինոմիցին D) ու ջրածնային պոմպի (դիցիկլոհեքսիլկարբոդիմիդ) ինհիբիտորների ազդեցությունը ցորենի ծիլերի կոլեոպտիլների մեմբրանային պոտենցիալի վրա: Նշված միացությունների բարձր կոնցենտրացիաները առաջացնում են պլազմատիկ մեմբրանների խիստ ապաբևեռացում: Ենթադրվում է, որ տարբեր տիպի միացությունների փոխազդեցությունը բարձրակարգ բույսերի բջիջների մեմբրանային ստրուկտուրաների հետ կրում է ոչ սպեցիֆիկ բնույթ:

ION SELECTIVITY OF THE CELLS OF HIGHER PLANTS AND DEPENDENCE OF THE MEMBRANE POTENTIAL FROM THE INFLUENCE OF INHIBITORS

G. N. KHACHATRIAN, G. T. KAZARIAN

The influence of the composition of the medium and inhibitors of energetical exchange (2,4-DNP), synthesis of proteins (actinomycin D) and proton pump (DCCD) on the membrane potential of wheat coleoptiles has been investigated. Higher concentrations of these compounds cause depolarization of plasma membranes. It is supposed that interactions of the various compounds with cell membrane structures of higher plants carry a non/specific character.

1. Казарян Г. Т. Биолог. ж. Армении, 20, 6, 1967.
2. Казарян Г. Т., Авакян Ц. М., Аджян Н. С. Биолог. науки, 3, 1967.
3. Казарян Г. Т. Канд. дисс., Ереван, 1968.
4. Казарян Г. Т., Хачатрян Г. Н., Паносян Г. А. Биолог. ж. Армении, 30, 12, 1977.
5. Казарян Г. Т., Паносян Г. А., Хачатрян Г. Н. Биолог. науки, 5, 1978.
6. Лялин О. О., Ктиторова И. Н. Физиол. растений, 23, 305, 1976.
7. Сазыкин Ю. О. Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов. М., 1968.
8. Goldberg J. H., Friedman P. A. Ann. Rev. Biochem., 40, 1971.
9. Higinbotham N., Etherton B., Foster R. Plant Physiol., 39, 2, 1964.
10. Higinbotham N. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 1973.
11. Hopfer U., Lehninger A. L., Thompson T. E. Proc. Natl. Acad. Sci., (USA), 59, 1968.
12. Key J. L. Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 1969.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 9, 1982

УДК 616—097.612.017—11/12

ИНДУКЦИЯ КЛЕТОК, ОБЛАДАЮЩИХ КОНТРАСУПРЕССОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ СЕЛЕЗЕНКЕ

С. С. ГАМБАРОВ, Г. В. ХАРЛОВА, А. М. ХЗАРДЖЯН

В регенерирующей селезенке выявлены клетки, блокирующие индукцию специфических и неспецифических Т-супрессоров гуморального иммунного ответа.

Ключевые слова: Т-супрессоры, контрасупрессия, селезенка.

Регенерационный процесс в разных органах сопровождается изменением функциональных свойств лимфоидных клеток [1—4]. В частности, при стимуляции регенерационных процессов в селезенке в определенных условиях (частичная спленэктомия в 2 этапа) у мышей наблюдается угнетение индукции специфических и неспецифических Т-клеток супрессоров [5]. Предполагается, что эти изменения связаны с появлением в регенерирующей селезенке клеток, блокирующих индукцию (или активацию) супрессорных клеток.

В настоящей работе излагаются результаты исследования влияния частичной спленэктомии на индукцию клеток, обладающих контрасупрессорной активностью.

Материал и методика. Эксперименты проводились на мышах линии СВА и гибридах (СВА×С57BL/6) F₁.

Моделирование специфической супрессии осуществлялось методом Визлер Стобо [9]. Мышей линии СВА иммунизировали супрессорогенной дозой эритроцитов барана (3×10⁹). Некоторым мышам до иммунизации (за 2 ч) вводили клетки селезенки от ложнооперированных или спленэктомизированных мышей. Спустя 2 недели клетки селезенки (5×10⁷) иммунных животных вводили интактным мышам.

Реципиентов селезеночных клеток в тот же день иммунизировали ЭБ (2×10⁸). Индукцию неспецифической активности проводили по Шанду [8]. Облученным