

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXIII, 28

SECTIO AA

1968

Z Katedry Fizyki Ogólnej Wydziału Mat. Fiz. Chem. UMCS

Kierownik: doc. dr Danuta Stachórska

Franciszek JAŚKOWSKI,

Jadwiga SKIERCZYŃSKA, Edward SPIEWLA

Pomiary oporu elektrycznego błon komórek *Nitella mucronata*

Измерения электрического сопротивления мембран клеток *Nitella mucronata*

Measurements of the Electric Resistance of the Cell Membrane
of *Nitella mucronata*

Badania oporu elektrycznego (R) błon komórek *Characeae* prowadzone są dziś w wielu laboratoriach. Określa się zmiany tego oporu wywołane zmianami różnych parametrów, takich jak koncentracja jonów w roztworze otaczającym komórkę [4, 7], natężenie pola elektrycznego [5] itp.

Na uwagę zasługuje jednak fakt, że chociaż wiele osób zajmowało się i aktualnie zajmuje badaniami tego oporu, jego wartość dla niektórych gatunków *Characeae* w ogóle nie była mierzona i — co ciekawsze — dla żadnego gatunku *Characeae* nie została dotychczas jednoznacznie określona; w zależności od stosowanej metody pomiarowej otrzymywano różne wartości R , zawarte w granicach od kilku $k\Omega \text{ cm}^2$ do kilkuset $k\Omega \text{ cm}^2$ [3, 11].

Celem niniejszej pracy było wyznaczenie wartości oporu błon komórki *Nitella mucronata*, ściślej — wartości oporu warstwy rozdzielającej wodniczkę tej komórki od zewnętrznego ośrodka.

W znanym piśmiennictwie jedynie U m r a t h [10] dokonał pomiaru oporu elektrycznego dla tego gatunku *Characeae*.

Pomiary wykonywano zarówno metodą mikroelektrod (stosując prąd stały), jak i metodą elektrod zewnętrznych (używając prądu zmiennego).

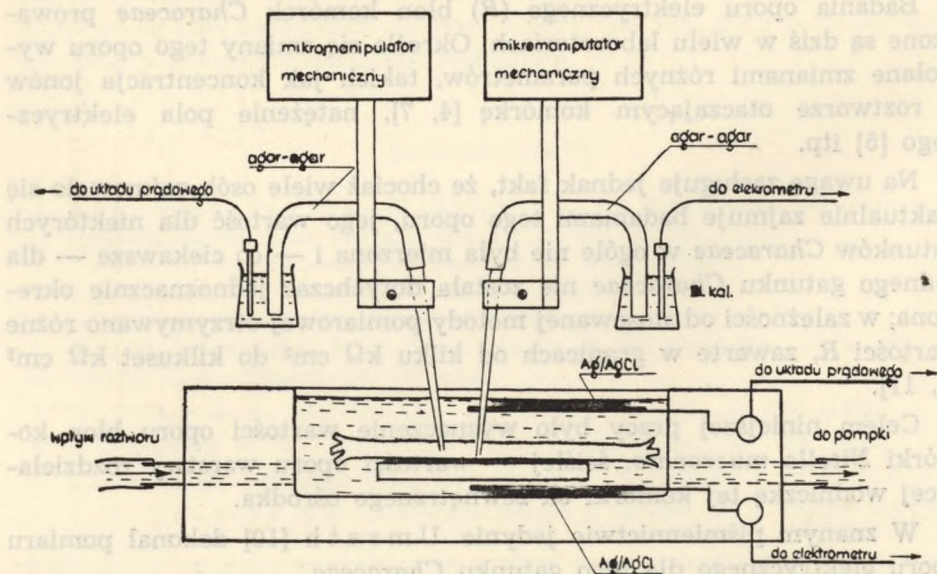
MATERIAŁ I METODA POMIARÓW

Materiał

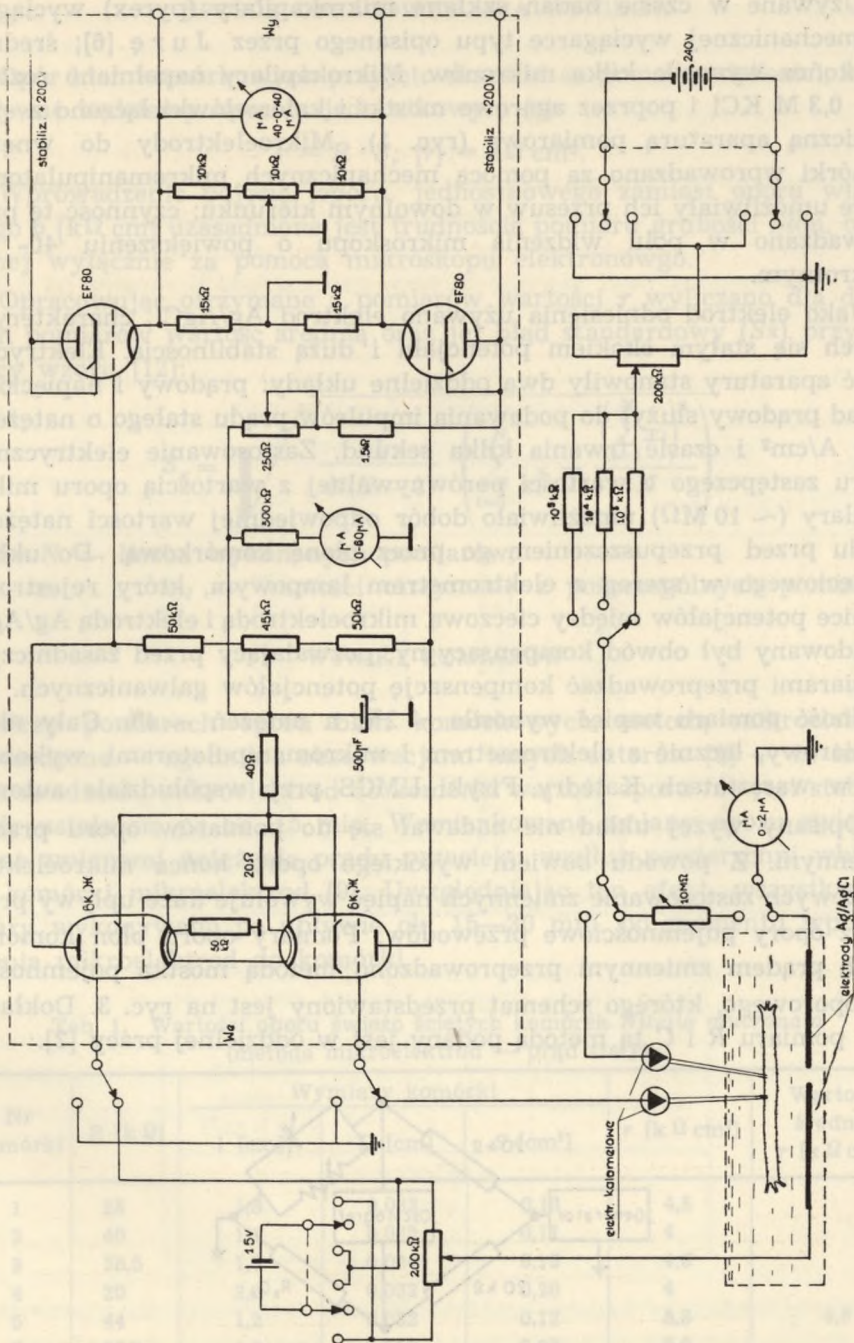
Badania przeprowadzano na międzywęzłowych komórkach glonu *Nitzschia mucronata*, pochodzącego z hodowli laboratoryjnej. Hodowla założona została w sierpniu 1967 r., komórki do badań pobierano w miesiącach maj—lipiec 1968 r. Pobierane do badań komórki miały długość 2—3 cm i średnicę $\sim 0,4$ mm. Odcinano je od sąsiednich międzywęzłowych i „niby-liściowych” komórek, pozostawiając na końcach zespoły małych komórek węzłowych. Komórki podczas pomiarów umieszczone były w roztworze „laboratoryjnym”, tj. wodnym roztworze o składzie: K — 0,1 mN; Na — 1,0 mN; Ca — 0,2 mN; Cl — 1,3 mN.

Aparatura pomiarowa

Zestaw aparaturowy stosowany do pomiaru oporu elektrycznego błon metodą mikroelektrod przedstawiono na ryc. 1 i 2. Z powodu wysokiego oporu mikroelektrod cieczowych (rzędu megaomów), pomiar oporu błon wymaga wprowadzenia do komórki dwu mikroelektrod. Jedną mikroelektrodą dopływa prąd o znanym natężeniu, druga zaś służy do rejestracji zmian napięcia, które podczas przepływu tego prądu wytwarzają się między wnętrzem komórki a zewnętrznym roztworem.



Ryc. 1. Schematyczny rysunek zestawu do pomiaru oporu elektrycznego błon komórkowych metodą mikroelektrod

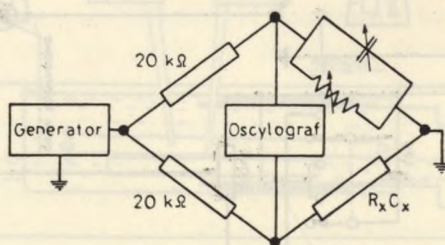


Ryc. 2. Schemat aparatury elektrycznej do zestawu pomiarowego, przedstawionego na ryc. 1

Używane w czasie badań szklane mikrokapilary (pyrex) wyciągano na mechanicznej wyciągarce typu opisanego przez Jurę [6]; średnica ich końca wynosiła kilka mikronów. Mikrokapilary napełniano roztworem 0,3 M KCl i poprzez agarowe mostki i kalomelówki łączono z elektroniczną aparaturą pomiarową (ryc. 1). Mikroelektrody do wnętrza komórki wprowadzano za pomocą mechanicznych mikromanipulatorów, które umożliwiały ich przesuw w dowolnym kierunku; czynność tę przeprowadzano w polu widzenia mikroskopu o powiększeniu 40- lub 80-krotnym.

Jako elektrod odniesienia używano elektrod Ag/AgCl, charakteryzujących się stałym skokiem potencjału i dużą stabilnością. Elektryczną część aparatury stanowiły dwa oddzielne układy: prądowy i napięciowy. Układ prądowy służył do podawania impulsów prądu stałego o natężeniu 10^{-6} A/cm² i czasie trwania kilka sekund. Zastosowanie elektrycznego oporu zastępczego o wartości porównywalnej z wartością oporu mikrokapilary (~ 10 M Ω) umożliwiało dobór odpowiedniej wartości natężenia prądu przed przepuszczeniem go przez błonę komórkową. Do układu napięciowego w szereg z elektrometrem lampowym, który rejestrował różnice potencjałów między cieczową mikroelektrodą i elektrodą Ag/AgCl, wbudowany był obwód kompensacyjny, pozwalający przed zasadniczymi pomiarami przeprowadzać kompensację potencjałów galwanicznych. Dokładność pomiaru napięć wynosiła $\sim 2\%$, a natężenie $\sim 4\%$. Cały układ pomiarowy, łącznie z elektrometrem i mikromanipulatorami, wykonany był w warsztatach Katedry Fizyki UMCS przy współudziale autorów.

Opisany wyżej układ nie nadawał się do pomiarów oporu prądem zmiennym. Z powodu bowiem wysokiego oporu końca mikroelektrod cieczowych zastosowanie zmiennych napięć wywołuje duże upływy prądu przez opory pojemnościowe przewodów. Pomiary oporu błon komórkowych prądem zmiennym przeprowadzono metodą mostka pojemnościwo-oporowego, którego schemat przedstawiony jest na ryc. 3. Dokładny opis pomiaru R i C tą metodą podany jest w oddzielnej pracy [2].



Ryc. 3. Schemat aparatury do pomiaru oporu elektrycznego błon komórki metodą elektrod zewnętrznych

SPOSÓB OPRACOWYWANIA WYNIKÓW

Opór błon komórkowych przyjęto określać za pomocą wielkości, którą nazywać będziemy oporem jednostkowym (r)

$$r = R \cdot S; [r] = \text{k}\Omega \text{ cm}^2.$$

Wprowadzenie pojęcia oporu jednostkowego zamiast oporu właściwego ρ [$\text{k}\Omega \text{ cm}$] uzasadnione jest trudnością pomiaru grubości błon, określanej wyłącznie za pomocą mikroskopu elektronowego.

Opracowując otrzymane z pomiarów wartości r wyliczano dla danej serii pomiarów wartość średnią oraz jej błąd standardowy (S_x) przy pomocy wzoru [12]:

$$S_x = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2}{N} \right)}$$

gdzie N — liczba wykonanych pomiarów,

$x_1 \dots x_N$ — wartości otrzymane z poszczególnych pomiarów.

WYNIKI POMIARÓW

Przy pomiarach oporu błon komórkowych metodą mikroelektrod stwierdzono — zgodnie z obserwacjami innych autorów [1] — że tuż po wprowadzeniu mikroelektrod do komórki wartość oporu nie jest stabilna. Opór ustala się po ok. 15 min. Wzmiankowane zmiany oporu związane są ze zmianami natężenia prądu przecieku wzdłuż powierzchni wbitych do komórki mikroelektrod [9]. Uwzględniając ten efekt, wszystkie pomiary wykonywano po upływie ok. 15–30 min. od momentu wprowadzenia mikroelektrod do komórki.

Tab. 1. Wartości oporu świeżo ściętych komórek *Nitella mucronata* (metoda mikroelektrod — prąd stały)

Nr komórki	R [$\text{k}\Omega$]	Wymiary komórki			r [$\text{k}\Omega \text{ cm}^2$]	Wartość średnia r [$\text{k}\Omega \text{ cm}^2$]
		l [cm]	D [cm]	S [cm^2]		
1	25	1,8	0,033	0,18	4,5	4,5
2	40	1,1	0,032	0,11	4	
3	35,5	1,3	0,034	0,13	4,6	
4	20	2,0	0,032	0,20	4	
5	44	1,2	0,032	0,12	5,3	
6	25,8	1,8	0,040	0,23	5,9	
7	15	2,1	0,045	0,29	4,4	
8	7,4	3,7	0,042	0,49	3,6	

Wartość średnia oporu jednostkowego 8 świeżo ściętych komórek, tj. ściętych zaledwie kilka godzin przed pomiarem, wynosiła $4,5 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ (tab. 1). Błąd standardowy był równy 0,3. Rozrzut otrzymanych wartości zawierał się w granicach od 3,6 do $5,9 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

Następnie zmierzono wartości oporu 13 komórek, ściętych co najmniej jeden dzień przed pomiarami i przetrzymywanych w roztworze laboratoryjnym. Niektóre z komórek przebywały w tym roztworze przez okres 16, a nawet 17 dni. Średnia wartość oporu była równa $31,2 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ (tab. 2). Błąd standardowy miał wartość 7. Granice rozrzutu wynosiły od 5,3 do $70,9 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$.

Tab. 2. Wartości oporu komórek *Nitella mucronata* po kilku dniach od ścięcia (metoda mikroelektrod — prąd stały)

Nr komórki	Czas od momentu ścięcia (dni)	R [$\text{k}\Omega$]	Wymiary komórki			r [$\text{k}\Omega \text{ cm}^2$]	Wartość średnia r [$\text{k}\Omega \text{ cm}^2$]
			l [cm]	D [cm]	S [cm^2]		
1	1	45	1,4	0,032	0,14	6,3	
2	1	45,5	1,8	0,038	0,23	10,4	
3	1	165	1,6	0,049	0,24	39,6	
4	1	28	2,2	0,046	0,30	8,5	
5	2	105	2,4	0,039	0,30	31	
6	3	272	2,0	0,038	0,24	65,3	
7	5	69	2,6	0,039	0,32	22	31,2
8	5	481	1,3	0,035	0,14	67,3	
9	5	53	1,9	0,045	0,27	14,3	
10	6	45,5	2,2	0,035	0,24	10,9	
11	16	271,0	1,6	0,042	0,20	54	
12	17	38	1,3	0,035	0,14	5,3	
13	17	407,5	1,6	0,029	0,15	70,9	

Tab. 3. Wartości oporu świeżo ściętych komórek *Nitella mucronata* (metoda elektrod zewnętrznych, częstość prądu 1000 Hz)

Nr komórki	r [$\text{k}\Omega \text{ cm}^2$]	Wartość średnia r [$\text{k}\Omega \text{ cm}^2$]
1	5,39	
2	5,30	4,3
3	2,30	

Należy dodać, że badane komórki *Nitella mucronata* po wprowadzeniu do ich wnętrza mikroelektrod ginęły, przeważnie po upływie od kilku do kilkunastu godzin, podczas gdy kontrolne komórki mogły przebywać w roztworze laboratoryjnym przez okres paru tygodni.

Tylko w 3 przypadkach po wprowadzeniu mikroelektrod komórki utrzymywały się przy życiu przez okres jednej doby. Opór takich komórek, jak wykazały pomiary, początkowo utrzymywał się na stałym poziomie, a następnie powoli malał. Opór martwych komórek był równy zero.

Wyniki pomiarów wykonanych za pomocą elektrod zewnętrznych i prądu zmiennego zestawiono w tab. 3 i 4.

Tab. 4. Wartości oporu komórek *Nitella mucronata* po kilku dniach od ścięcia (metoda elektrod zewnętrznych, częstość prądu 1000 Hz)

Nr komórki	Czas od momentu ścięcia (dni)	r [$k \Omega \text{ cm}^2$]	Wartość średnia r [$k \Omega \text{ cm}^2$]
1	1	5,08	4,0
2	1	5,27	
3	2	5,00	
4	2	9,00	
5	2	2,80	
6	3	3,42	
7	4	2,70	
8	4	2,00	
9	4	2,45	
10	4	2,66	

Średnia wartość wszystkich 13 pomiarów (tab. 3 i 4) wynosiła $4,1 k\Omega \text{ cm}^2$. Błąd standardowy tej wartości był równy 0,5, rozrzut zawierał się w granicach od 2,0 do $9,0 k\Omega \text{ cm}^2$ (średnia wartość c wyliczona dla 13 komórek wynosiła $0,09 \mu\text{F}/\text{cm}^2$).

Pomiary przeprowadzone za pomocą prądu zmiennego wykazały, że tak R , jak i C zależą od częstości stosowanego prądu: obie te wielkości wzrastają przy zmniejszaniu się częstości.

Dokładne badania tych zależności dla różnych gatunków *Characeae* będą tematem osobnej pracy.

DYSKUSJA

Ponieważ — jak wykazały obserwacje — opór elektryczny błon ginących komórek malał i opór błon martwych komórek był równy zero, należy przypuszczać, że wartość oporu błon jest pewnego rodzaju wskaźnikiem aktywności życiowej komórki: normalnie funkcjonujące (nie pobudzone) komórki wykazują wyższą wartość tego oporu niż komórki, których funkcjonowanie zostało w jakiś sposób zakłócone.

A zatem niski opór błon komórek świeżo ściętych w porównaniu z oporem błon komórek badanych po kilku dniach od momentu ścięcia świadczyłby o tym, że proces ścinania uszkadza komórkę.

Czy opory określane metodą mikroelektrod po upływie kilku dni od momentu ścięcia są oporami komórek normalnie funkcjonujących — trudno na to dać odpowiedź. Ginięcie komórki po tak krótkim czasie od chwili wbicia do niej mikroelektrod należałoby chyba tłumaczyć jej uszkodzeniem.

Jeśli to istotnie miałyby miejsce, mierzony opór byłby niższy od rzeczywistego.

Interesujące jest porównanie wyników otrzymanych obiema stosowanymi metodami. Średnia wartość oporu $4,0 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ (tab. 4) otrzymana z pomiarów prądem zmiennym jest o cały rząd niższa od wartości $31 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ (tab. 2) otrzymanej z pomiarów prądem stałym. Zmniejszanie się pojemności i oporu tkanek biologicznych wraz ze wzrostem częstości stosowanego pola elektrycznego obserwowane było przez wielu autorów i czynione są różne próby wyjaśnienia tego zjawiska [8]. Istnieje np. teoria relaksacji, która wiąże zmiany oporu z polaryzacją dipolowych drobin: środowisko z uporządkowanym układem drobin stawia większy opór przepływowi prądu niż środowisko z układem drobin drgających pod wpływem działającego pola [8].

Przyjmując takie wyjaśnienie, zagadkowa staje się z kolei otrzymana w obu metodach zgodność wyników pomiaru (r) dla komórek świeżo ściętych.

Wydaje się, że wyjaśnienie obserwowanych rozbieżności w pomiarach oporu komórek można podać, przyjmując (na podstawie ostatnich badań eksperymentalnych [9]), że wysokooporowa warstwa, którą dotychczas utożsamiano z plazmalemą, składa się z dwu wysokooporowych warstw: zewnętrznej o oporze rzędu kilku $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ i wewnętrznej o niestabilnej wartości oporu, wahającej się od zera do kilkuset $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$. Przy pomiarach wykonywanych prądem zmiennym określany jest opór tylko warstwy zewnętrznej (opór warstwy wewnętrznej dla częstości 1000 Hz bocznikuje się małym oporem pojemnościowym tej warstwy). Pomiar mikroelektrodami przy stosowaniu prądu stałego dają łączną wartość oporu obu warstw, przy czym w komórkach uszkodzonych procesem odcinania od rośliny opór warstwy wewnętrznej równy jest zeru.

Zatem dla uszkodzonych ścinaniem komórek wyniki otrzymane obiema metodami będą jednakowe, natomiast gdy z biegiem czasu komórka powraca do normalnego funkcjonowania, to opór warstwy zewnętrznej wzrasta, z tego też powodu wartości oporów otrzymywane każdą z tych metod będą różne.

PIŚMIENNICTWO

1. Blinks R.: J. Gen. Physiol., 19, 633 (1935).
2. Bulanda W., Skierczyńska J., Zarębski W.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio AA, vol. **XXIII** (1968), 29, Lublin 1969.
3. Dainty J.: An. Rev. Plant. Physiol., 13, 379 (1962).
4. Findlay G. P., Hope A. B.: Austral. J. Biol. Sci., 17, 62 (1964).
5. Hope A. B., Walker N. A.: Austral. J. Biol. Sci., 14, 26 (1961).
6. Jura C.: Problemy, 21, 149 (1965).
7. Paszewski A., Stolarek J., Gębala T.: Acta Societ. Botan. Poloniae, 37, 327 (1968).
8. Schwan P.: Electrical Properties in Tissue and Cell Suspension [w:] Advances in Biological and Medical Physics, vol. V (ed. Lawrance J. H.), New York 1957.
9. Skierczyńska J.: J. Exp. Botany, 19, 389 (1968).
10. Umrath K.: Protoplasma, 16, 173 (1932).
11. Williams E. J., Johnston R. J., Dainty J.: J. Exp. Bot., 15, 1 (1963).
12. Youden W. J.: Statistical Methods for Chemists. New York—London 1951.

РЕЗЮМЕ

Измерения электрического сопротивления R проводились при помощи двух методов: микроэлектродным методом с постоянным током и методом внешних электродов с током частоты 1000 гц. Величина сопротивления, полученная при измерении первым методом, равнялась $31,2 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$, а вторым — $4,1 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$. Приводится интерпретация (качественная) полученных результатов, основанная на предположении, что слой с высоким сопротивлением, отождествляемый до сих пор с плазмолеммой, на самом деле состоит из двух слоев, имеющих высокое сопротивление.

SUMMARY

The microelectrode method with a direct current and the method of outside electrodes, with a current of frequency of 1,000 cycles per second, were used for measurements of the electric resistance R . The values obtained from the first and the second method were $31.2 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ and $4.1 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$, respectively. The qualitative explanation of the obtained results was based on the assumption that the high resistance layer identified with the plasmalemma was, in fact, the double resistance layer.

Uznawając, że w badaniach przeprowadzonych w poprzednich pracach, w których stosowano metodę pomiaru rezystancji przy pomocy prądu przemiennego, w celu poprawienia dokładności pomiarów, w niniejszej pracy zastosowano metodę pomiaru rezystancji przy pomocy prądu stałego. Wyniki pomiarów przedstawiono dla temperatury 300 K i 400 K. Wzrost rezystancji z temperaturą jest zgodny z teorią. Wyniki pomiarów przedstawiono także dla różnych wartości natężenia pola elektrycznego. Wyniki pomiarów przedstawiono także dla różnych wartości natężenia pola elektrycznego. Wyniki pomiarów przedstawiono także dla różnych wartości natężenia pola elektrycznego.

RESUME

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki pomiarów rezystancji przy pomocy prądu stałego. Wyniki pomiarów przedstawiono dla temperatury 300 K i 400 K. Wzrost rezystancji z temperaturą jest zgodny z teorią. Wyniki pomiarów przedstawiono także dla różnych wartości natężenia pola elektrycznego. Wyniki pomiarów przedstawiono także dla różnych wartości natężenia pola elektrycznego. Wyniki pomiarów przedstawiono także dla różnych wartości natężenia pola elektrycznego.

SUMMARY

The microstructure of the samples was investigated by X-ray diffraction. The results are compared with the theoretical values. The microstructure of the samples was investigated by X-ray diffraction. The results are compared with the theoretical values. The microstructure of the samples was investigated by X-ray diffraction. The results are compared with the theoretical values.

Wzrost rezystancji z temperaturą jest zgodny z teorią. Wyniki pomiarów przedstawiono także dla różnych wartości natężenia pola elektrycznego. Wyniki pomiarów przedstawiono także dla różnych wartości natężenia pola elektrycznego.