

Institut Fizyki UMCS
Dyrektor: prof. dr Stanisław Szpilkowski

Jan KUTNIK

**Wpływ jonów Na^+ i Cl^- na potencjał czynnościowy komórek
*Nitellopsis obtusa***

Влияние ионов Na^+ и Cl^- на потенциал действия клеток *Nitellopsis obtusa*

The Influence of Na^+ and Cl^- on an Action Potential of *Nitellopsis obtusa*
Cells

WSTĘP

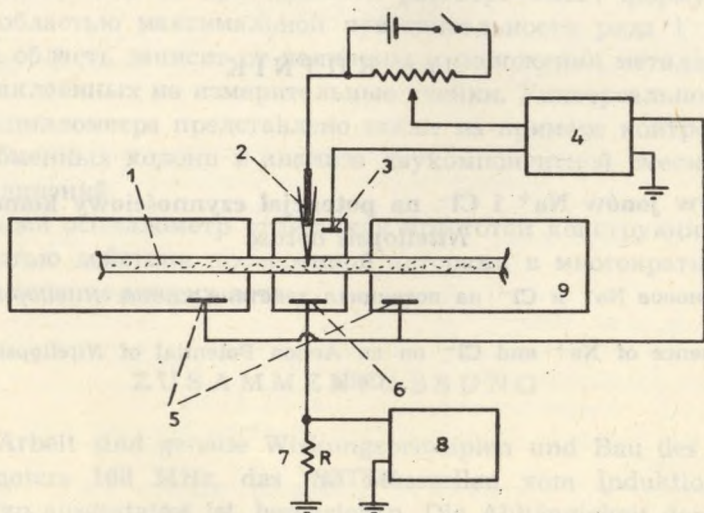
Generowanie potencjałów czynnościowych przez membrany biologiczne tłumaczy się zmianą przepuszczalności membrany dla jonów K^+ i Na^+ , a w przypadku mebran roślinnych — również Cl^- i prawdopodobnie H^+ [2, 3, 4]. Jednak mechanizm przenikania tych jonów przez membranę oraz wpływ ich koncentracji na przepuszczalność nie jest dokładnie znany. Istnieje szereg hipotez wyjaśniających to zagadnienie. Najprostszą z nich wydaje się hipoteza kanalików (porów) otwierających się podczas procesu pobudzenia [1].

W niniejszej pracy badano wpływ zwiększenia koncentracji jonów Na^+ i Cl^- w ośrodku zewnętrznym na potencjał czynnościowy.

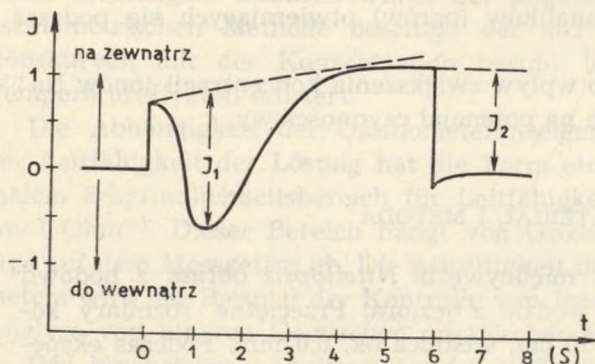
MATERIAŁ I METODA

Do badań użyto komórek międzywęźla *Nitellopsis obtusa* z hodowli utrzymywanej w naturalnej wodzie z jeziora. Przeciętne rozmiary komórek wynosiły: długość ok. 10 cm, średnica ok. 0,6 mm. Podczas eksperymentu były one zanurzone w wodzie z jeziora. Koncentrację jonów Na^+ i Cl^- zmieniano przez dodawanie: chlorku sodu, azotanu sodu i chlorku cholinyl. Używano też wody nie zawierającej jonów Na^+ . Utrzymywano pH wody na stałym poziomie. Wartość pH wynosiła 7,9 i była

równa wartości pH wody środowiska naturalnego badanych roślin. Zastosowana została znana z wielu prac [2, 7] metoda pomiaru zwana *clamp voltage method*, polegająca na stabilizacji napięcia na membranie przy jednoczesnej rejestracji płynącego przez nią prądu. Układ służący do tego celu jest przedstawiony na ryc. 1.



Ryc. 1. Układ do pomiarów prądów jonowych metodą *clamp voltage*; 1 — komórka roślinna, 2 — mikroelektroda szklana, 3 — elektroda napięciowa Ag/AgCl, 4 — wzmacniacz elektrometryczny, 5 — elektrody prądowe Ag/AgCl, 6 — elektroda prądowa Ag/AgCl, 7 — opornik, 8 — samopis, 9 — naczynie pomiarowe



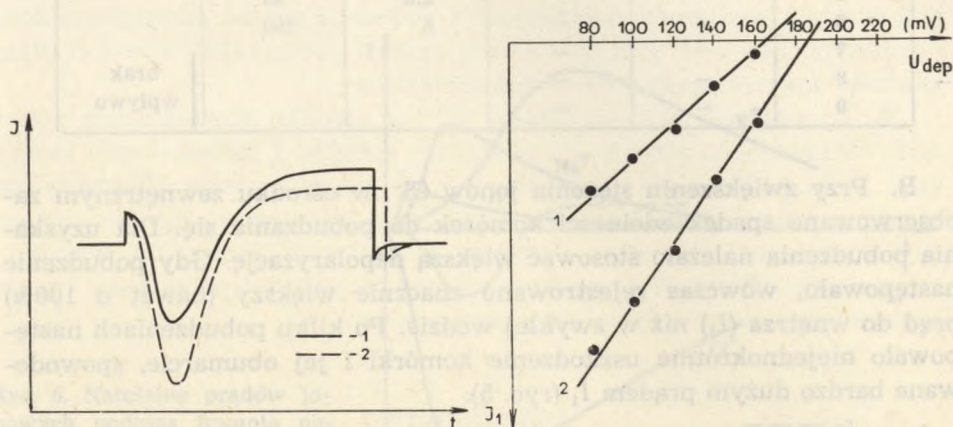
Ryc. 2. Typowy przebieg natężenia prądu rejestrowanego metodą *clamp voltage*; I_1 — maksymalny prąd do wnętrza komórki, I_2 — prąd na zewnątrz przy danej depolaryzacji

Gdy komórka znajdowała się w naczyniu pomiarowym, w środkowej jego części, zawierającej elektrody, utrzymywano stały przepływ cieczy ok. 0,8 ml/min i tylko w tej części naczynia był wymieniany roztwór.

Powierzchnia komórki, przez którą płynął rejestrowany prąd, wynosiła ok. $0,076 \text{ cm}^2$. Typowy przebieg natężenia prądu jest przedstawiony na ryc. 2. Komórkę pobudzano przy kilku różnych depolaryzacjach: 80, 100, 120, 140, 160 mV. Dla określenia wielkości I_1 stosowano metodę graficzną, jak na ryc. 2.

WYNIKI POMIARÓW

Przebadano 13 komórek, w tym 6 w wodzie z jeziora wzbogaconej w jony Na^+ , 4 komórki w wodzie wzbogaconej w jony Cl^- oraz 3 komórki w wodzie nie zawierającej jonów Na^+ .



Ryc. 3. Prądy rejestrowane przy zwiększeniu koncentracji Na^+ ; 1 — przebieg zmian natężenia prądu dla wody zwykłej, 2 — przebieg dla wody wzbogaconej w Na^+

Ryc. 4. Zależność prądu I_1 od depolaryzacji; 1 — wykres dla komórki w wodzie z jeziora, 2 — wykres dla komórki w wodzie zawierającej NaCl

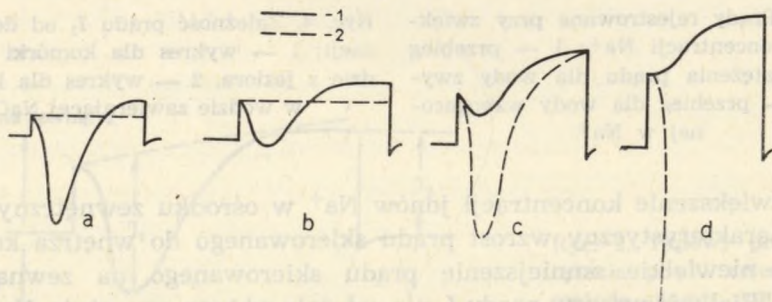
A. Zwiększenie koncentracji jonów Na^+ w ośrodku zewnętrznym dawało charakterystyczny wzrost prądu skierowanego do wnętrza komórki I_1 oraz niewielkie zmniejszenie prądu skierowanego na zewnątrz I_2 (ryc. 3). Wielkość wzrostu prądu I_1 nie zależała od tego, czy użyto NaCl , czy NaNO_3 . Dla wody nie zawierającej jonów Na^+ nie zaobserwowano ani zmian prądu I_1 , ani też prądu I_2 (tab. 1). Wzrost prądu I_1 , podany w tab. 1, obliczano w następujący sposób: wykreślano dla badanej komórki zależność maksymalnej wartości natężenia prądu skierowanego do wnętrza od wielkości napięcia depolaryzacji. Pomiary wykonywano w wodzie (I) i w roztworze wzbogaconym w jony Na^+ (II) (ryc. 4). Następnie, aby wyeliminować wpływ przesunięcia punktu przecięcia z osią depolaryzacji

(U_{dep}), wyznaczano nachylenia prostych do tej osi. Stosunek nachyleń w procentach, wyrażający wzrost maksymalnego prądu do wnętrza I_1 podano w tab. 1.

Tab. 1. Wzrost prądu I_1

Nr komórki	Woda z NaNO_3		Woda z NaCl		Woda bez Na
	mN	%	mN	%	
1	5	85			} brak wpływu
2	5	35			
3	10	176			
4	—	—	2,5	45	
5	—	—	2,5	43	
6	—	—	5	290	
7	—	—			
8	—	—			
9	—	—			

B. Przy zwiększeniu stężenia jonów Cl^- w ośrodku zewnętrznym zaobserwowano spadek zdolności komórek do pobudzania się. Dla uzyskania pobudzenia należało stosować większą depolaryzację. Gdy pobudzenie następowało, wówczas rejestrowano znacznie większy (nawet o 100%) prąd do wnętrza (I_1) niż w zwykłej wodzie. Po kilku pobudzeniach następowało niejednokrotnie uszkodzenie komórki i jej obumarcie, spowodowane bardzo dużym prądem I_1 (ryc. 5).



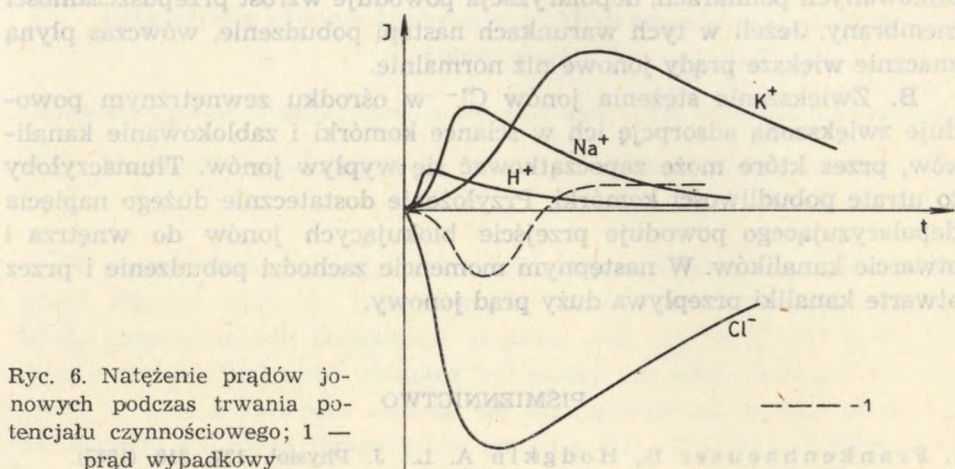
Ryc. 5. Przebieg zmian natężenia prądu dla komórki pobudzonej; 1 — w wodzie zwykłej, 2 — w wodzie wzbogaconej w jony Cl^- ; a — depolaryzacja 80 mV, b — depolaryzacja 100 mV, c — depolaryzacja 120 mV, d — depolaryzacja 140 mV

Podobny efekt uszkodzenia komórki obserwowano po szybkim zastąpieniu wody wzbogaconej w jony Cl^- wodą zwykłą i pobudzeniu komórki, nawet przy małej depolaryzacji (tab. 2).

Tab. 2. Utrata zdolności komórek do pobudzania się

Nr komórki	Woda z Cl^- mN	Depolaryzacja (mV)				
		80	100	120	140	160
1	25	—	—	+	+	+
2	25	—	+	+	+	+
3	50	—	—	—	—	+
4	100	—	—	—	—	uszkodzenie

— brak pobudzenia
+ pobudzenie



Ryc. 6. Natężenie prądów jonowych podczas trwania potencjału czynnościowego; 1 — prąd wypadkowy

DYSKUSJA

Duża zawartość chloru (150 mN), potasu (80 mN) i sodu (60 mN) [5] wewnątrz komórki pozwala sądzić, że jony tych pierwiastków wypływają podczas pobudzenia na zewnątrz.

Można założyć także, że prądy jonowe mają wtedy przebieg zbliżony do przedstawionego na ryc. 6. Rysunek ten wykonano przez analogię do przedstawionego przez Frankenhaeusera i Huxleya [6] przebiegu prądów jonowych potencjału czynnościowego komórek nerwowych.

Obecność jonów Na^+ w ośrodku zewnętrznym zmniejsza różnicę koncentracji tych jonów i tym samym ich wpływ, co w wyniku daje, obserwowane eksperymentalnie, zwiększenie prądu do wnętrza (I_1) oraz zmniejszenie prądu na zewnątrz (I_2). Zastanawiająca jest tylko wielkość efektu — jest on nadspodziewanie duży. Jednakże, jeśli przyjąć, że rzeczy-

wista koncentracja jonów Na^+ jest znacznie mniejsza niż podana w pracach Mc Robbie [5] i Findlaya [7], dlatego iż znaczna część wewnątrzkomórkowego sodu znajduje się w stanie związanym — to wpływ 5—10 mN stężenia jonów Na^+ na potencjał czynnościowy byłby zrozumiały. Wpływ jonów Cl^- na potencjał czynnościowy nie jest łatwy do jednoznacznego wyjaśnienia.

A. Jeżeli założyć, że wpływ jonów Cl^- podczas pobudzenia wyprzedza wpływ innych jonów (analogicznie do wpływu jonów Na^+ w nerwie), to wzrost koncentracji tych jonów w ośrodku zewnętrznym przeciwdziała ich wypływowi na zewnątrz i obniża pobudliwość komórki. Duża koncentracja jonów Cl^- na zewnątrz powoduje obniżenie potencjału spoczynkowego, co odpowiada depolaryzacji komórki. Jak stwierdzono, w niepublikowanych pomiarach, depolaryzacja powoduje wzrost przepuszczalności membrany. Jeżeli w tych warunkach nastąpi pobudzenie, wówczas płyną znacznie większe prądy jonowe niż normalnie.

B. Zwiększenie stężenia jonów Cl^- w ośrodku zewnętrznym powoduje zwiększoną adsorpcję ich w ściance komórki i zablokowanie kanałików, przez które może zapoczątkować się wypływ jonów. Tłumaczyłoby to utratę pobudliwości komórki. Przyłożenie dostatecznie dużego napięcia depolaryzującego powoduje przejście blokujących jonów do wnętrza i otwarcie kanałików. W następnym momencie zachodzi pobudzenie i przez otwarte kanałiki przepływa duży prąd jonowy.

PIŚMIENNICTWO

1. Frankenhaeuser B., Hodgkin A. L.: *J. Physiol.* **137**, 218 (1957).
2. Kishimoto U.: *Plant and Cell Physiol.* **9**, 539 (1968).
3. Findlay G. P.: *Austr. J. Biol. Sci.* **23**, 1033 (1970).
4. Rent R. K., Johnson R. A., Barr C. E.: *J. Membrane Biol.* **7**, 231 (1972).
5. Emid A. C., Mc Robbie: *J. Gen. Physiol.* **45**, 861 (1962).
6. Frankenhaeuser B., Huxley A. F.: *J. Physiol.* **171**, 302 (1964).
7. Findlay G. P.: *Aust. J. Biol. Sci.* **17**, 388 (1964).

РЕЗЮМЕ

Полученные результаты при возбуждении клеток помещенных в среде с увеличенной концентрацией ионов Na^+ , позволят предполагать, что эти ионы участвуют в токах потенциала действия.

Влияние ионов Cl^- на потенциал действия не легко выяснить. Влияние это проявляется, между прочим, в понижении способности клеток к возбуждению, а в случае возбуждения, в увеличении тока текущего внутрь клетки.

SUMMARY

Experimental results obtained by exciting cells of *Nitellopsis obtusa* in water enriched with Na^+ ions justify the supposition that these ions participate in the current of action potentials.

The effect of Cl^- ions on the action potentials cannot be easily explained. When these ions are present in the external water, they cause a decrease in the excitability of cells and in the event of excitation, they cause an increase in the inward current.

Jerzy MATYSIA, Jacełwiga SABA

Polarografia zmiennoprądowa w ciekłym amoniaku i azotanu amonowego

Переменная-токовая полярграфия в жидком аммиаке азотнокислотной амонии

Wechselstrompolarographie im flüssigen Ammoniak und Ammoniumnitrat

W poszukiwaniu odpowiednich elektrolitów podstawowych w polarografii sięgano także do różnorodnych roztworów niewodnych, jak np. liczne rozpuszczalniki organiczne, stopione sole czy skroplone gazy. Jednym z częściej badanych układów był ciekły amoniak, jednakże robota w tym środowisku okazała się skomplikowana, przede wszystkim ze względu na niską temperaturę wrzenia NH_3 . Znacznie wygodniejszą niż amoniak są ciekłe amoniakaty (tj. bezwodne solwaty azotanowe pewnych soli nieorganicznych) zachowujące swą trwałość także w temperaturze pokojowej.

W piśmiennictwie polarograficznym odnotować można przynajmniej kilkadziesiąt pozycji dotyczących polarografii klasycznej, oksylografii i chronowoltamperometrii w amoniakatach, brak natomiast danych na temat badań na drodze polarografii zmiennoprądowej z nabeżem napięciem sinusoidalnym (A. C.) lub z nabeżem napięciem prostokątnym (S. W.). Celem niniejszej pracy było uzyskanie informacji o zachowaniu pewnych charakterystycznych jonów i substancji organicznych w ciekłym amoniaku i azotanu amonowego (CAAA) w polarograficznych metodach zmiennoprądowych. Z jednej strony uzupełniła to wiadomości o mechanizmach procesów ciekłowodnych referowanych w publikacjach wcześniejszych (szczególnie w kwestiach adsorpcji i odwracalności), a z drugiej strony dostarcza danych porównawczych dla porównania stosowanego w polarografii wodnego roztworu buforowego $\text{NH}_4\text{OH}-\text{NH}_4\text{NO}_3$.

