

Institut Fizyki UMCS
Dyrektor: prof. dr Stanisław Szpikowski

Jan KUTNIK, Jan STASIAK

**Rola jonów Cl^- i K^+ w generacji potencjału czynnościowego w komórkach
*Nitellopsis obtusa***

Роль ионов Cl^- и K^+ в генерации потенциала действия
в клетках *Nitellopsis obtusa*

Role of Cl^- and K^+ Ions in Generation of an Action Potential
in *Nitellopsis obtusa* Cells

Różnica potencjałów występująca między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym (wnętrze jest zawsze ujemne) w normalnym stanie komórki nazywana jest potencjałem spoczynkowym, natomiast charakterystyczny przebieg zmian potencjału podczas procesu pobudzenia nazywany jest w skrócie potencjałem czynnościowym. Ogólnie przyjętym wyjaśnieniem zjawiska generacji potencjałów czynnościowych jest okresowa zmiana przepuszczalności membrany komórkowej dla pewnych jonów. Pobudzenie membrany może być wywołane bodźcem mechanicznym, chemicznym lub elektrycznym. Podczas zwiększonej przepuszczalności membrany płyną przez nią strumienie jonowe o kierunku zgodnym z gradientem koncentracji, powodując zmiany napięcia na membranie. Rola potencjałów czynnościowych w nerwowych komórkach zwierzęcych, ich przebieg i zależności jonowe są dość dobrze zbadane i opisane w wielu pracach [1, 2, 3].

Potencjały czynnościowe występujące w komórkach roślinnych są wciąż jeszcze niedostatecznie zbadane i rola ich w procesach metabolicznych rośliny nie jest wyjaśniona. Jednym z podstawowych zagadnień przy badaniu potencjałów czynnościowych jest ustalenie, jakie rodzaje jonów i w jaki sposób biorą udział w generacji tego potencjału. Badania potencjału czynnościowego roślin prowadzone metodą *clamp voltage* wykazują, że w pierwszej fazie pobudzenia płynie prąd jonowy z wnętrza komórki na zewnątrz (*leakage*), który następnie zmienia kierunek i płynie przez pe-

wien czas do wnętrza, dając charakterystyczny wierzchołek prądu (czasami podwójny) i wreszcie zanika — jeśli nie utrzymać depolaryzacji wywołującej pobudzenie — lub przechodzi w prąd płynący na zewnątrz, ustalający się na pewnym poziomie, odpowiadającym stosowanej depolaryzacji (ryc. 1).



Ryc. 1. Przebieg wypadkowego prądu jonowego rejestrowanego metodą *clamp voltage*

Za prąd do wnętrza mogą być odpowiedzialne bądź jony dodatnie wpływające do komórki, bądź jony ujemne wypływające na zewnątrz. Za prąd skierowany na zewnątrz, odwrotnie — bądź jony dodatnie wypływające, bądź wpływające jony ujemne. Pomiar przeprowadzony metodą *clamp voltage*, przy pobudzaniu komórki zanurzonej w środowisku o różnym stężeniu jonów potasu, wskazują jednoznacznie na to, że w ostatniej fazie przebiegu potencjału czynnościowego (przy pewnej depolaryzacji) wypływają na zewnątrz jony K^+ . Wszyscy autorzy, którzy zajmowali się tym zagadnieniem, są co do tego zgodni.

Istnieją jednak kontrowersje dotyczące fazy potencjału czynnościowego, w której prąd płynie do wnętrza komórki. Odpowiedzialne za ten prąd mogą być jony Cl^- , wypływające zgodnie z gradientem koncentracji, lub też jony Ca^{++} , wpływające do wnętrza. Inne jony można w zasadzie wykluczyć, gdyż musiałyby one płynąć przeciwnie do gradientu koncentracji.

F i n d l a y [4] początkowo uważał, że jony Ca^{++} odpowiadają za generację prądu do wnętrza, w późniejszych pracach stwierdził, że za generację tego prądu odpowiedzialne są jony Cl^- [5]. Duży wpływ chloru podczas potencjału czynnościowego stwierdzili także Gaffey i Mullins [6, 7], natomiast Wostrikow, Demina i Kurella [8] całkowicie wykluczają uczestnictwo chloru.

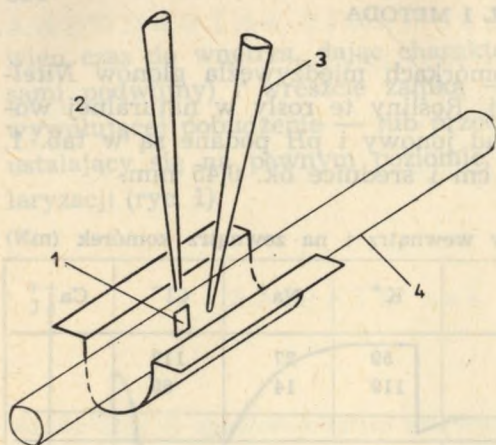
MATERIAL I METODA

Badania przeprowadzono na komórkach międzywęzła glonów *Nitellopsis obtusa* z hodowli akwariowej. Rośliny te rosły w naturalnej wodzie, pobranej z jeziora, której skład jonowy i pH podane są w tab. 1. Komórki posiadały długość ok. 10 cm i średnice ok. 0,45 mm.

Tab. 1. Aktywność podstawowych jonów wewnątrz i na zewnątrz komórek (mN)

Komórka — autor	Faza	K^+	Na^+	Cl^-	Ca^{++}
1. <i>Nitella translucens</i> — Mc Robbie, Spanswick	wakuola cytopl.	59	27	112	
		119	14	65	
2. <i>Nitella flexilis</i> — Kishimoto	wakuola cytopl.	80	27	135	
		125	5	36	
	woda zewn.	0,1	0,2		
3. <i>Nitella mucronata</i> — Worobiew	wakuola woda zewn.	70	50	125	
		0,1	1,5		
4. <i>Chara australis</i> — Worobiew	wakuola cytopl.	48	35	86	
		115	—	—	
5. <i>Griffithsia</i> — Worobiew	wakuola cytopl.	343			
		153			
6. <i>Chara australis</i> — Hope, Walker		86	49		
		74	47	106	2,6
	woda zewn.	0,06	2,2	2,4	0,16
7. <i>Nitella flexilis</i> — Jurin	wew. woda zewn.	80	30		
		0,1	1,0		
8. Badania własne	woda (pH 7, 9) zewn.	0,04	0,23	0,48	1,4

Badaną komórkę umieszczano w naczyniu pomiarowym, w którego środkowej części znajdowały się elektrody czułe na jony chloru i potasu oraz elektroda odniesienia. Elektrode czułą na jony chlorowe stanowiła, ukształtowana w rynienkę, srebrna blaszka pochlorowana na powierzchni ok. 1 mm^2 , a na pozostałej części powierzchni pokryta nieprzewodzącym lakierem (ryc. 2). Elektroda czułą na potas była mikroelektroda o zato-



Ryc. 2. Układ elektrod do pomiaru wypływu jonów Cl^- i K^+ ; 1 — elektroda Ag/AgCl , 2 — elektroda odniesienia, 3 — elektroda czuła na jony K^+ , 4 — komórka

pionym końcu, sporządzona ze specjalnego szkła potasowego, i wypełniona roztworem KCl (1N). Elektrode tę zbliżano do ścianki komórkowej na odległość ok. 0,2 mm. Blisko niej umieszczano elektrodę odniesienia: szklaną mikroelektrodę o średnicy końca ok. 30 μm , napelnioną $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,1N). Koniec tej elektrody był zatkany agarem nasyconym roztworem $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Woda, w której znajdowała się roślina (w części pomiarowej), zawierała znikome ilości jonów chlorowych i potasowych.

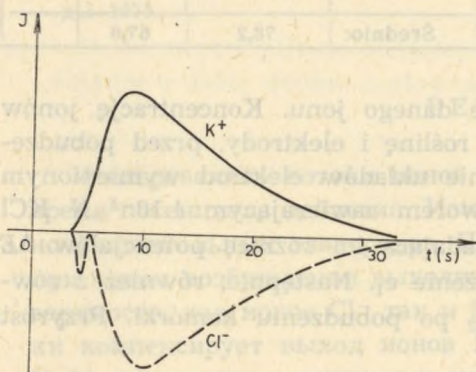
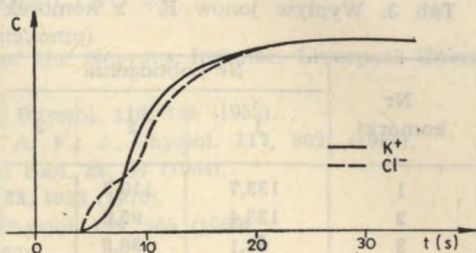
WYNIKI POMIARÓW

W opisanym układzie rejestrowano wypływ z komórki jonów chloru i potasu podczas przebiegu potencjału czynnościowego (ryc. 3). Zastosowanie układu różniczkującego pozwalało uzyskać przebieg jonowego prądu wypływającego z komórki podczas pobudzenia (ryc. 4). Przebadano w 26 komórkach wypływ jonów chlorowych oraz w 14 komórkach wypływ jonów potasowych. Wyniki zestawiono w tab. 2 i 3. Ilości chloru i potasu wypływające z komórki podczas pobudzenia obliczano w następujący sposób:

Całkowe krzywe wypływu (ryc. 3) przedstawiają rejestrowane po pobudzeniu komórki zmiany potencjału elektrod czułych na jony Cl^- i K^+ , wynikające ze zwiększenia aktywności tych jonów w roztworze kontaktującym się z rośliną i elektrodami. Roztwór omywający roślinę ($2 \cdot 10^{-3}\text{N Ca}(\text{NO}_3)_2$) można uważać za rozcieńczony, zatem współczynniki aktywności jonów Cl^- i K^+ praktycznie są równe jedności. Stąd równanie Nernsta można napisać w następującej postaci:

$$\Delta E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_2}{C_1}$$

Ryc. 3. Przebieg zmian koncentracji (c) jonów Cl^- i K^+ w roztworze zewnętrznym wypełniającym naczynie pomiarowe podczas potencjału czynnościowego



Ryc. 4. Prądy jonowe rejestrowane podczas potencjału czynnościowego

Tab. 2. Wpływ jonów Cl^- z komórek *Nitellopsis obtusa* podczas pobudzenia ($\text{pmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{imp.}$)

Nr komórki	Nr pobudzenia			Nr komórki	Nr pobudzenia		
	1	2	3		1	2	3
1	157,2	56,2	47,7	15	108,3		
2	114,5	72,3	48,3	16	61,5		
3	71,8	37,4	26,2	17	124,8		
4	116,0	108,3		18	42,4		
5	113,6	73,3		19	71,8		
6	45,6	41,2		20	35,6		
7	71,8	38,5		21	38,5		
8	43,8	54,8		22	41,8		
9	126,3	36,2		23	47,1		
10	71,8	37,4		24	31,7	38,5	31,2
11	104,5			25	32,3		
12	82,4			26	41,2	50,0	47,1
13	152,8						
14	100,6						
				Średnio:	78,8	53,7	40,1

Tab. 3. Wpływ jonów K^+ z komórek *Nitellopsis obtusa* podczas pobudzenia ($\text{pmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{imp.}$)

Nr komórki	Nr pobudzenia			Nr komórki	Nr pobudzenia		
	1	2	3		1	2	2
1	133,7	119,3		9	78,3		
2	123,4	95,6		10	61,5		
3	52,1	38,5		11	52,1		
4	48,3	47,4		12	52,1		
5	54,7	37,1	30,7	13	48,3		
6	104			14	41,5		
7	103,9						
8	80,1						
				Średnio:	78,2	67,6	

gdzie c_1 i c_2 oznaczają koncentracje danego jonu. Koncentrację jonów Cl^- i K^+ w roztworze otaczającym roślinę i elektrody, przed pobudzeniem — c_1 określono przez zalewanie układów elektrod wymienionym wyżej roztworem, a następnie roztworem zawierającym $1 \cdot 10^{-5}$ N KCl i $2 \cdot 10^{-3}$ N $Ca(NO_3)_2$. Mierząc odpowiadającą im różnicę potencjałów ΔE wyznaczano z równania Nernsta stężenie c_1 . Następnie, również z równania Nernsta, określano stężenie c_2 po pobudzeniu komórki. Przyrost stężenia: $\Delta c = c_2 - c_1$.

Znając objętość roztworu (0,008 ml) obliczano ilość jonów Cl^- i K^+ wypływających z komórki podczas jednego pobudzenia przez powierzchnię zanurzoną w naczynku pomiarowym. Ponieważ rozmiary naczynka oraz średnica komórki były zmierzone, określano ilość jonów wypływających z jednostki powierzchni komórki przy jej pobudzeniu.

DYSKUSJA

Wykonane pomiary wypływu jonów Cl^- i K^+ z komórki wykazują, że chlor bierze udział w generacji potencjału czynnościowego. Otrzymane w pracy ilości wypływających jonów Cl^- są mniejsze niż otrzymane metodą izotopową przez Gaffeya i Mullinsa [6] (9000 ± 7000 $\text{pmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{imp.}$) i Fandlaya [5] (maksymalny wypływ 1000 $\text{pmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{imp.}$), jednakże rozbieżności te mogą być przypisane różnicom w badanym materiale.

Ponieważ wypływ jonów Cl^- równoważy pod względem elektrycznym wypływ jonów K^+ , można stąd wnioskować, że jeżeli jony Ca^{++} nawet biorą udział w generacji potencjału czynnościowego, to ich strumień jest niewielki.

PISMIENNICTWO

1. Hodgkin A. L.: The Conduction of the Nervous Impulse. Liverpool University Press, 1964.
2. Hodgkin A. L., Huxley A. F.: J. Physiol. **116**, 449 (1952).
3. Frankenhaeuser B., Huxley A. F.: J. Physiol. **117**, 302 (1964).
4. Findlay G. P.: The Journal of Cell Biol. **22**, 69 (1964).
5. Findlay G. P.: Austr. J. Biol. Sci. **23**, 1033 (1970).
6. Gaffey C. T., Mullins L. J.: J. Physiol. **144**, 505 (1958).
7. Mullins L. J.: Nature **196**, 986 (1962).
8. Востриков Я. Я., Демина И. Ф., Курелла Т. А.: Биофизика мембран. Каунас 1973, 150—153.
9. Воробёв Л. Н.: Труды Московского Общества Исследователей Природы 1970.

РЕЗЮМЕ

Исследовались потоки ионов Cl^- и K^+ выходящие из клетки во время потенциала действия. Измерения были проведены методом иончувствительных электродов. Полученные результаты показали, что при одном возбуждении выходит, в среднем, 78 pmol через 1 cm^2 поверхности, как ионов Cl^- так и K^+ , т.е. выход ионов Cl^- , электрически компенсирует выход ионов K^+ . Отсюда следует, что если ионы Ca^{++} участвуют в генерации потенциала действия, то их поток небольшой.

SUMMARY

The efflux of Cl^- and K^+ ions from the cell during the action potential was investigated. The measurements show that the average flux of Cl^- ions as well as K^+ ions is 78 pmol/cm².imp. Because the efflux of Cl^- ions is electrically balanced with the efflux of K^+ ions, we can conclude that even if Ca^{++} ions take part in the generation of an action potential their flux is not large.

