

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXVI/XXVII, 6

SECTIO AA

1971/1972

Instytut Fizyki UMCS

Kierownik Zespołu Badawczego: doc. dr hab. Jadwiga Skierczyńska

Jadwiga SKIERCZYŃSKA, Ryszard ŻOLNIERCZUK,
Edward ŚPIEWŁA, Władysław BULANDA,
Anna PRZYGODZKA

**Pomiary oporu elektrycznego błon komórek *Characeae*, przeprowadzone
równolegle elektrodami zewnętrznymi i mikroelektrodami**

Измерения электрического сопротивления мембран клеток *Characeae*,
проведенные одновременно внешними электродами и микроэлектродами

Measurements of the Electric Resistance of the Cell Membranes of *Characeae*,
Made Simultaneously with External Electrodes and Microelectrodes

Pomiary oporu elektrycznego błon komórek *Characeae* przeprowadzone przez R. Spanswicka [9] wykazały, że po wprowadzeniu mikroelektrod do komórki opór elektryczny powoli wzrasta i osiąga wartość stabilną — wyższą o ok. 40% od wartości początkowej — po upływie ok. 4 godz. R. Spanswick uważa, że ta maksymalna wielkość oporu jest wartością oporu błony nie uszkodzonej, to znaczy taką, jaką posiadała błona komórkowa przed wprowadzeniem mikroelektrod. Wniosek ten niezupełnie pokrywa się z danymi pracy A. Walkera [11], w której autor stwierdził, że opór błony komórkowej przed wprowadzeniem mikroelektrod — mierzony metodą elektrod zewnętrznych — jest identyczny z oporem uzyskiwanym metodą mikroelektrod, tuż po ich wprowadzeniu.

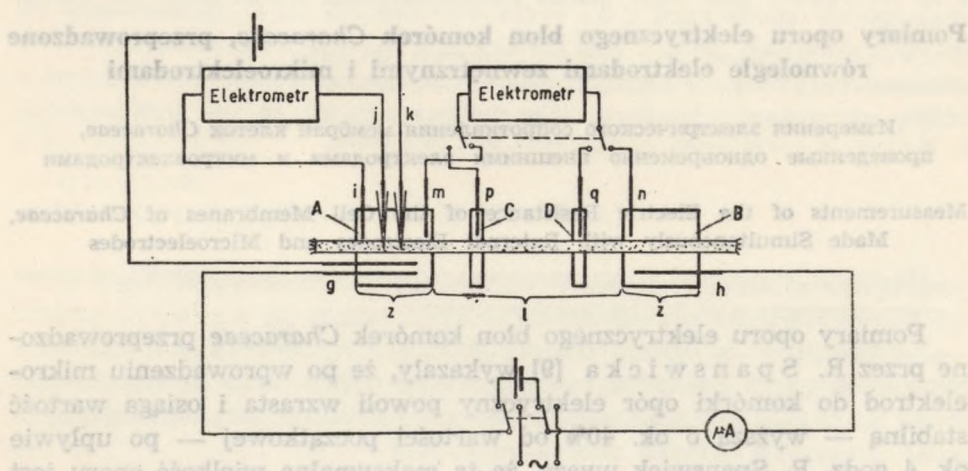
Wstępne pomiary [12] wykazały, że wprowadzanie mikroelektrod nie powoduje — w większości przypadków — bezpośredniej zmiany oporu błony komórkowej, pojawia się jednak powolny okresowy wzrost tego oporu; maksymalna wartość tej zmiany może przewyższać nawet o 100% jego początkową wartość.

Ponieważ uważa się na ogół, że uszkodzenia błony prowadzą do obniżenia wartości jej oporu, toteż zaobserwowany efekt okresowego wzrostu oporu jest trudny do wyjaśnienia. Celem niniejszej pracy było bardziej dokładne przebadanie tego efektu.

MATERIAŁ I METODA POMIARU

Pomiary przeprowadzono w okresie od stycznia do maja 1971 r. na komórkach *Nitellopsis obtusa* i *Chara brauni*, pochodzących z hodowli laboratoryjnej założonej w sierpniu 1970 r.

Do badań stosowano zestaw pozwalający wykonywać pomiary oporu błony komórkowej równolegle obu metodami: metodą elektrod zewnętrznych i mikroelektrod (ryc. 1). Mikroelektrodami mierzono opór na odcinku Z zanurzonym w naczyniu A w sposób ogólnie stosowany [1, 2, 3, 10]. Mikroelektroda *k*, którą doprowadzono prąd do wnętrza komórki, umieszczona była w środku odcinka Z; mikroelektroda napięciowa *j* znajdowała się w odległości 0,2 Z od środka [1].



Ryc. 1. Zestaw do pomiaru oporu błony równolegle obu metodami: metodą mikroelektrod i elektrod zewnętrznych

Przy pomiarach oporu błony elektrodami zewnętrznymi prąd doprowadzano do zbiorników A, B elektrodami *g*, *h*. Podczas przepływu przez komórkę prądu o natężeniu *I* elektrody *m*, *n* (ryc. 1) rejestrowały spadek napięcia ΔU_{mn} . Z wartości tego napięcia określano wielkość całkowitego oporu komórki R_c , korzystając ze wzoru: $R_c = \frac{\Delta U_{mn}}{I}$ (opór cieczy w naczyniach A i B stanowił w tych eksperymentach zaledwie 0,5% całkowitego oporu i nie był uwzględniany).

Aby wyliczyć opór błony komórkowej, określano początkowo opór odcinka komórki o długości Z zanurzonego w naczyniu A (lub B).

$$R_k = \frac{R_c - l R_i}{2}$$

gdzie R_k — opór odcinka komórki Z zanurzonego w naczyniu A (lub B); R_c — całkowity opór między elektrodami m, n ; l — odległość między naczyniami A, B ; R_i — opór podłużny jednostki długości komórki.

Opór podłużny komórki między zbiornikami A, B mógł być określany albo za pomocą prądu zmiennego, albo stałego. W pierwszym przypadku mierzono napięcie między elektrodami m, n podczas przepływu przez komórkę prądu o częstotliwości 5000 Hz, doprowadzonego do elektrod g, h . Stosunek tego napięcia do natężenia prądu przyjmowano za wartość oporu między zbiornikami A, B . W drugim przypadku korzystano z dodatkowych zbiorników C, D i mierzono spadek napięcia między elektrodami p, g podczas przepływu przez komórkę prądu stałego.

W obu przypadkach, znając odległości między zbiornikami, można było wyliczyć opór podłużny R_i przypadający na jednostkę długości komórki.

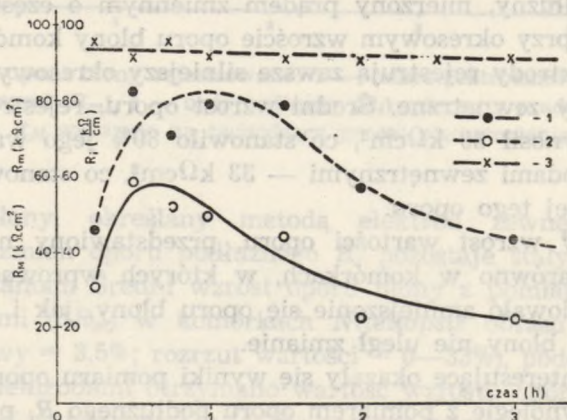
Znając R_k i R_i wyliczano opór błony R_m ze wzoru uwzględniającego efekt kablowy [7]:

$$R_k = \sqrt{R_i R_m} \operatorname{ctgh} Z \sqrt{\frac{R_i}{R_m}}$$

W powyższym wzorze — zgodnie z wynikami wcześniejszych obserwacji [8] — za wartość R_i przyjmowano wielkość o 50% niższą od otrzymanej z pomiarów dla nie zanurzonej w wodzie części komórki.

WYNIKI OBSERWACJI

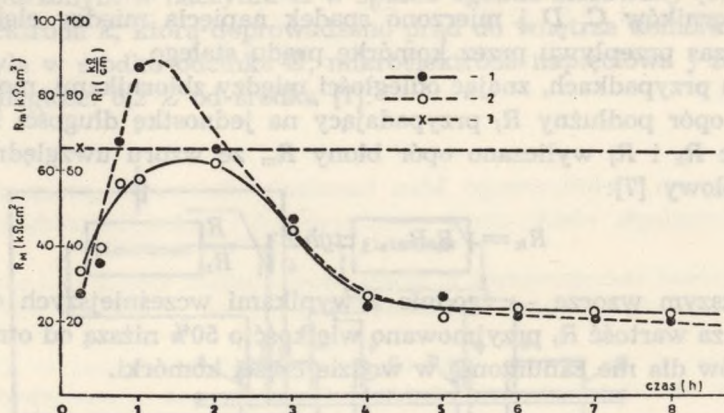
Pomiary oporu metodą mikroelektrod (R_M) i elektrod zewnętrznych (R_m) przy zastosowaniu prądu zmiennego do określania oporu podłużnego R_i przeprowadzono na 5 komórkach *Chara brauni*. Wykres zaobserwowanych zmian oporów w jednej z badanych komórek przedstawiono na



Ryc. 2. Czasowe zmiany oporu błony rejestrowane: 1 — mikroelektrodami (R_M), 2 — elektrodami zewnętrznymi (R_m) z poprawką na opór podłużny (R_i) mierzony prądem zmiennym, 3 — czasowe zmiany wartości oporu podłużnego R_i

ryc. 2. We wszystkich badanych komórkach opór R_i podczas wzrostu oporu błony pozostawał stały.

Na 11 komórkach *Chara brauni* przeprowadzono obserwacje zmian R_M i R_m , ograniczając się do jednorazowego pomiaru oporu podłużnego R_i prądem stałym i przyjmując, że w okresie przeprowadzanych eksperymentów opór R_i nie ulegał zmianie. Wyniki pomiarów były zgodne z otrzymanymi dla wyżej omówionej serii. Dla jednej z badanych komórek wykreślono je na ryc. 3.



Ryc. 3. Czasowe zmiany oporu błony rejestrowane: 1 — mikroelektrodami (R_M), 2 — elektrodami zewnętrznymi (R_m), 3 — opór podłużny (R_i) określany jednorazowo prądem stałym

Wyniki całej tej serii badań można było ująć następująco:

1. Opór podłużny, mierzony prądem zmiennym o częstotliwości 5000 Hz, pozostaje stały przy okresowym wzroście oporu błony komórkowej.

2. Mikroelektrody rejestrują zawsze silniejszy okresowy wzrost oporu aniżeli elektrody zewnętrzne. Średni wzrost oporu, rejestrowany mikroelektrodami, wynosił $39 k\Omega cm^2$, co stanowiło 80% jego wartości początkowej, a elektrodami zewnętrznymi — $33 k\Omega cm^2$, co stanowiło 67% wartości początkowej tego oporu.

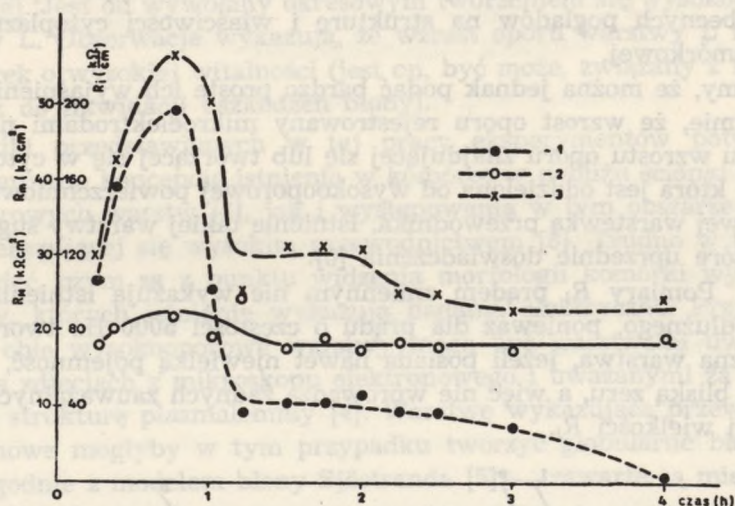
3. Okresowy wzrost wartości oporu, przedstawiony na ryc. 2 i 3, obserwowano zarówno w komórkach, w których wprowadzenie mikroelektrod spowodowało zmniejszenie się oporu błony, jak i w komórkach, w których opór błony nie uległ zmianie.

Niezwykłe interesujące okazały się wyniki pomiaru oporu błony przeprowadzone równolegle z pomiarem oporu podłużnego R_i prądem stałym. Stwierdzono, że wzrost oporu błony, obserwowany w uprzednich eksperymentach, rejestrowany jest w zasadzie tylko przez mikroelektrody. Elektrody zewnętrzne wykazują bardzo niewielkie zmiany oporu.

Obserwacje takie przeprowadzono na 8 komórkach *Chara brauni* i 15 komórkach *Nitellopsis obtusa*. Na ryc. 4 przedstawiono wyniki pomiarów w jednej z badanych komórek.

Wyniki tej serii obserwacji można było ująć następująco:

1'. Wzrostowi oporu błony, określanego metodą mikroelektrod, towarzyszy zawsze wzrost wartości oporu podłużnego R_i , mierzonego prądem stałym. Średni wzrost wartości R_i w komórkach *Chara brauni* wynosił 48,3% (błąd standartowy = 14,8%; rozrzut wartości zawarty był w granicach 10—125%). Średni wzrost wartości R_i w komórkach *Nitellopsis obtusa* wynosił 25% (błąd standartowy = 7,9%; rozrzut wartości zawarty był w granicach 0—123%).



Ryc. 4. Wartości oporu błony rejestrowane: 1 — mikroelektrodami (R_M), 2 — elektrodami zewnętrznymi (R_m), 3 — opór podłużny (R_i) mierzony prądem stałym (obniżanie się wartości R_M wskazuje na zachodzący proces pieczętowania mikroelektrody)

2'. Opór błony, określany metodą elektrod zewnętrznych, przy uwzględnieniu zmian oporu podłużnego R_i pozostaje stały i ulega tylko niewielkim zmianom. Średni wzrost oporu błony z pomiarów elektrodami zewnętrznymi (ΔR_m) w komórkach *Nitellopsis obtusa* wynosił 7,5% (błąd standartowy = 3,5%; rozrzut wartości = 0—33%), podczas gdy z pomiarów mikroelektrodami otrzymano wartość wzrostu oporu błony (ΔR_M) równą 43% (błąd standartowy = 11,3%; rozrzut wartości = 0—145%). Odpowiednie wartości dla komórek *Chara brauni* wynosiły: $\Delta R_m = 22,7\%$ (błąd standartowy = 8%; rozrzut = 0—50%) i $\Delta R_M = 102\%$ (błąd standartowy = 19,4%, rozrzut = 25—200%).

Podczas pomiarów z zastosowaniem prądu stałego do określania wartości R_i zauważono ponadto, że zasklepienie się mikroelektrody (*sealing process*) poprzedzane jest zawsze wzrostem wartości oporu błony określonego mikroelektrodami i oporu podłużnego R_i .

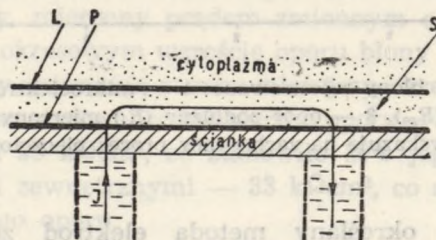
W kilku przypadkach zaobserwowano, że tuż po wprowadzeniu mikroelektrod wartość oporu błony z pomiarów mikroelektrodami kilkakrotnie przewyższała wartość otrzymaną z pomiarów elektrodami zewnętrznymi. We wszystkich tych przypadkach proces wprowadzania mikroelektrod powodował bardzo silny wzrost wartości R_i .

DYSKUSJA

Otrzymane wyniki mogą wydawać się dość zaskakujące z punktu widzenia obecnych poglądów na strukturę i właściwości cytoplazmy oraz błony komórkowej.

Sądzymy, że można jednak podać bardzo proste ich wyjaśnienie, jeżeli się przyjmie, że wzrost oporu rejestrowany mikroelektrodami następuje w wyniku wzrostu oporu znajdującej się lub tworzącej się w cytoplazmie warstwy, która jest oddzielona od wysokooporowej powierzchniowej błony komórkowej warstwą przewodnika. Istnienie takiej warstwy sugerowały już niektóre uprzednie doświadczenia [6].

Ad 1. Pomiary R_i prądem zmiennym nie wykazują istnienia zmian oporu podłużnego, ponieważ dla prądu o częstotliwości 5000 Hz tworząca się wewnętrzna warstwa, jeżeli posiada nawet niewielką pojemność, ma impedancję bliską zeru, a więc nie wprowadza żadnych zauważalnych zmian mierzonej wielkości R_i .



Ryc. 5. Model wycinka komórki *Characeae* z dwiema wysokooporowymi warstwami P i L, przedzielonymi przewodnikiem S, przez który przepływa prąd I (odległość między warstwami P i L silnie powiększona)

Ad 1'. Wartość oporu R_i dla prądu stałego przy wzroście oporu warstwy wewnętrznej będzie ulegała wzrostowi — jak to widać z ryc. 5 — w wyniku zwężania się przestrzeni, przez którą płynie prąd.

Ad 2. Mikroelektrody wprowadzone do wodniczki zawsze rejestrują opór łączny obu warstw, a zatem wzrost oporu warstwy wewnętrznej

będzie powodował wzrost oporu rejestrowanego mikroelektrodami. Obserwowany wzrost oporu rejestrowanego elektrodami zewnętrznymi jest w dużej mierze pozorny i wynika z niewłaściwego założenia o stałej wartości oporu podłużnego R_i .

Ad 2'. Opór mierzony metodą elektrod zewnętrznych — przy określaniu wartości R_i prądem stałym w sposób przedstawiony wyżej — pozostawałby stały i równy oporowi tylko warstwy zewnętrznej P , gdyby całkowity prąd, dopływając z zewnątrz, przecinał tylko warstwę P (patrz ryc. 5) i przepływał obszarem przewodnika S , zawartym między obu wysokooporowymi warstwami. Niewielki zaobserwowany wzrost oporu łatwo daje się wyjaśnić przepływem części prądu przez wodniczkę.

Ad 3. Wzrost oporu błony nie oznacza powrotu oporu do wartości normalnej. Jest on wywołany okresowym tworzeniem się wysokooporowej warstwy L . Obserwacje wykazują, że wzrost oporu warstwy L następuje u komórek o wysokiej vitalności (jest on, być może, związany z tendencją komórek do likwidacji uszkodzeń błony).

Wyniki przedstawionych w tej pracy eksperymentów potwierdzają zatem zarówno koncepcję istnienia w komórce w pobliżu ścianki dwu wysokooporowych warstw [6], jak i występowania w tym obszarze warstwy charakteryzującej się wysokim przewodnictwem [8]. Trudno w tej chwili powiedzieć, czym są z punktu widzenia morfologii komórki wymienione warstwy, których istnienie wykazują badania elektryczne. Przypuszczamy, że obie wysokooporowe warstwy mogą być warstwami uwidocznionymi na zdjęciach z mikroskopu elektronowego i uważanymi za dwuwarstwową strukturę plazmalemy [4]. Warstwę wykazującą przewodnictwo elektronowe mogłyby w tym przypadku tworzyć globularne białka, które — zgodnie z modelem błony Sjöstranda [5] — zawarte są między warstwami lipidów.

PIŚMIENNICTWO

1. Hogg J., Williams E. J., Johnston R. J.: *Biochim et biophys acta* **150**, 518 (1968).
2. Jaśkowski F., Skierczyńska J., Śpiewła E.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, sectio AA*, **23**, 265 (1968).
3. Paszewski A., Stolarek J., Gębal T.: *Acta Soc. Bot. Pol.* **37** (2), 327 (1968).
4. Robertson J. [w:] *Intracellular Transport*, ed. K. B. Warren, Academic Press, New York and London 1969.
5. Sjöstrand, F. S. [w:] *Regulatory Functions of Biological Membranes*, ed. J. Järnefeld, Elsevier Publishing Company, Amsterdam — London — New York 1968.
6. Skierczyńska J.: *J. exp. Bot.* **19**, 389 (1968).
7. Skierczyńska J., Bulanda W., Żołnierczuk R.: *J. exp. Bot.* (1973).

8. Skierczyńska J., Śpiewła E., Bulanda W., Żołnierczuk R., Sielewiesiuk J.: exp. Bot. (1973).
9. Spanswick R. M.: J. exp. Bot. **21**, 617 (1970).
10. Stolarek J.: Acta Soc. Bot. Pol. **37** (4), 561 (1968).
11. Walker N. A.: J. exp. Bot. **13**, 468 (1960).
12. Żołnierczuk R., Śpiewła E., Skierczyńska J.: Folia Soc. Scien. Lublinensis.

РЕЗЮМЕ

Исследования показали, что постепенное увеличение сопротивления мембраны, наблюдаемое после введения микроэлектродов в вакуоль, нельзя регистрировать внешними электродами, а только микроэлектродами. В работе дается объяснение этого явления, базирующееся на гипотезе существования в клетке оболочки состоящей из двойного слоя с высоким сопротивлением.

SUMMARY

Measurements showed that a gradual increase in the membrane resistance, which appeared after insertion of the microelectrodes into the vacuole, was not registered by the external electrodes but only by the microelectrodes.

The explanation of the results obtained was given in terms of double high-resistance layer close to the cell wall.