

ČEDOMIR RADENović

ISTOVREMENO IZUČAVANJE AKTIVNOSTI HLORIDA I ELEKTRIČNIH BIOPOTENCIJALA U VAKUOLI ČELIJA

Nitella mucronata i *N. flexilis*

UVOD

Istraživanja u oblasti elektrofiziologije sve se više usavršavaju i proširuju primenom savremenije instrumentalne tehnike i uvođenjem novih metoda rada. Tako, primena mikroelektrodne tehnike (obične i selektivne mikroelektrode) i uvođenje novih metoda za registraciju električnih biopotencijala (Kostjuk, 1960; Kurella, 1958; Dainty, 1962), aktivnosti jona (Vorobjev, i dr. 1961; Vorobjev, 1965), bioprovodljivosti, biokapaciteta, ξ — potencijala i drugih parametara u mnogome potvrđuju gornju konstataciju i omogućavaju posredno ili neposredno izučavanje veoma važnih i složenih procesa u ćeliji, odnosno u njenim pojedinim fazama (Vorobjev i dr. 1967; Vorobjev i dr. 1965; Radenović, 1967).

Pomenuta istraživanja obavljaju se u uslovima pune fiziološke aktivnosti ćelije i ona se mogu ponavljati više puta na jednoj te istoj živoj ćeliji.

Mogućnost posrednog određivanja aktivnosti jona (efektivna koncentracija) i biopotencijala u ćeliji, odnosno u nekim njenim fazama, svakako je značajno, i to ne samo sa fizičko-hemijskog, termodinamičkog i biofizičkog gledanja na mehanizme autoregulacije jona (Vorobjev i dr. 1965), uticaj jona na formiranje biopotencijala (Radenović, 1966), transport, distribuciju i druge funkcije jona (Hodgkin i dr. 1959), nego i sa stanovišta fizioloških procesa koji se odigravaju u pojedinim fazama ćelije, za koje nije bitna samo stacionarna koncentracija jona u nekom momentu, nego i uloga efektivne koncentracije (aktivnost) jona u tim dinamičnim procesima.

Stoga, uvođenje novog metoda istovremenog određivanja aktivnosti hloridnih jona i biopotencijala u vakuoli živih ćelija, omogućuje da se detaljnije pristupi izučavanju mehanizma distribucije i akumuliranja jona, s jedne, i prirode biopotencijala, s druge strane.

MATERIJAL I METOD RADA

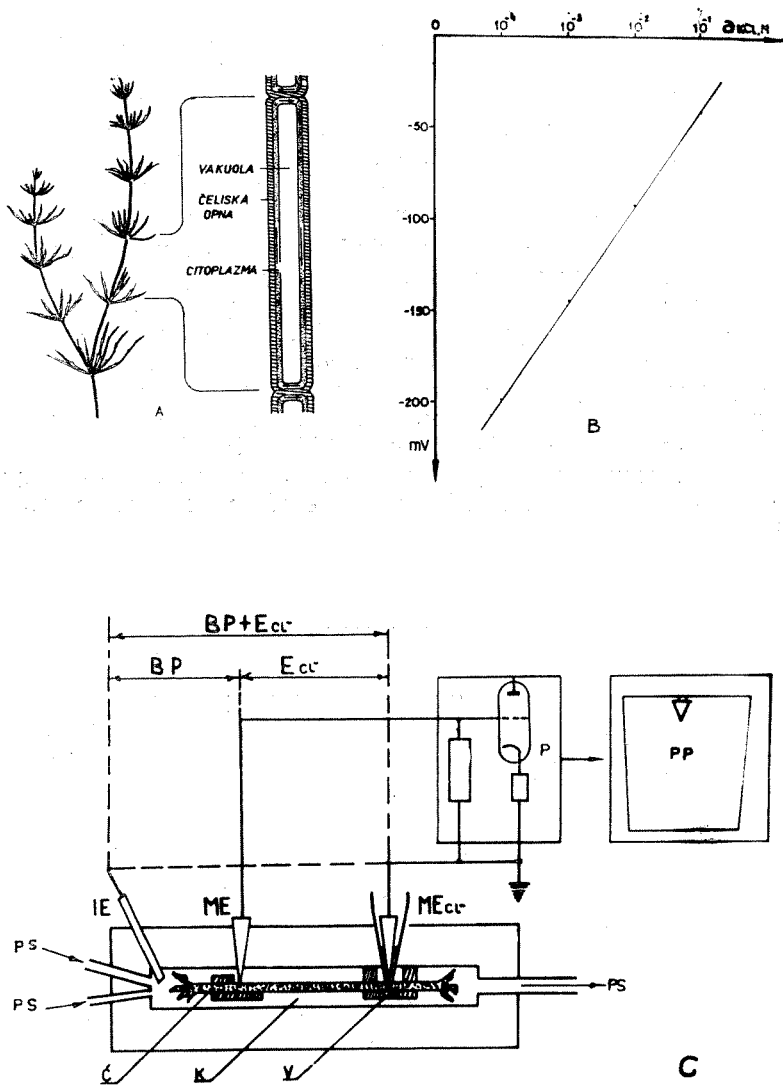
Ispitivane su ćelije *Nitella mucronata* i *N. flexilis* (slatkovodne zelene alge iz familije *Characeae*). Dijametar ovih ćelija kreće se od 150—500 mikrona, a njihova dužina od 10—40 milimetara, [Sl. 1a.]. Ove ćelije postale su klasičan objekat za mnoga istraživanja.

Hranljiva podloga (u 1% -nom agar-agaru) sadržala je: 0,1 mM KCl; 1,0 mM NaHCO₃; 0,2 mM Mg(NO₃)₂ i 0,4 mM CaCl₂. Alge su gajene u staklenim posudama u laboratoriji, uz dopunsko osvetljenje sa luminiscentnim lampama. Postizan je svetlosni intenzitet od 500 luksa, što odgovara prirodnim uslovima. Za merenje korišćene su druga ili treća ćelija od vrha. Dvadeset četiri časa pre početka eksperimenta ćelije su bile odvojene (odrezane) i prenete u posudu sa rastvorom 0,1 mM KCl + 1,0 mM NaCl.

Istovremeno merenje bioelektričnih potencijala i aktivnosti hloridnih jona u vakuoli ćelija izvođeno je u specijalno konstruisanoj komori, [Sl. 1c.], u kojoj se položaj ćelija ne menja pri uvođenju mikroelektroda. Ova komora svojom konstrukcijom omogućava uzimanje mikroproba sa »suvom« mikropipetom iz vakuole ćelije. Da se mikropipeta ne bi punila spoljašnjim rastvorom iz komore, u kojem se ćelija nalazi, za nju je napravljen specijalni prilaz od vazelina kojim se jedan mali deo (oko 4 milimetra) ćelije izoluje od rastvora u komori. Posle uvođenja »suve« mikropipete u ćeliju, sok vakuole pod dejstvom kapilarnih sila ispunjava vrh mikropipete do određene visine njenog proširenog dela. Zapremina jedne uzete mikroprobe iznosi $2,5 \cdot 10^{-7}$ ml. Do ove zapremine dolazimo računskim putem. U momentu kontakta meniska ćelijskog soka sa selektivno-oseflijivom Ag—AgCl mikroelektrodom, koja je smeštena u mikropipeti, uspostavlja se potencijal (E_{Cl^-}) iz čije vrednosti se izračunava aktivnost hloridnih jona u vakuoli žive ćelije.

U ovom radu korišćene su obične mikroelektrode, izrađene od staklenih cevi (pyrex), koje omogućuju tačno merenje bioelektričnih potencijala. Dijametar vršnog dela mikroelektroda bio je oko jedan mikron. Ove mikroelektrode punjene su sa 3 M KCl ili 2,5 M NH₄Cl. Dalje, korišćene su selektivne srebro-srebrohloridne mikroelektrode koje su izrađivane od srebrne žice. Pre hloriranja ove elektrode su obrađene; dijametar njihovog vrha iznosio je 2—3 mikrona. Tako izrađene srebro-srebrohloridne elektrode reverzibilne su u odnosu na hloridne jone. Promena potencijala (ΔE_{Cl^-}) registrovana sa ovakvom selektivnom mikroelektrodom u odnosu na indiferentnu mikroelektrodu (elektroda upoređivanja), iznosila je od 53—55 mV pri smeni rastvora u kojima se aktivnost hloridnih jona menja za deset puta, što je vrlo blisko teorijskoj vrednosti, [Sl. 1b.]. Pri registraciji bioelektričnog potencijala korišćena je indiferentna elektroda. Kao standardne, nepolarizujuće elektrode, uz obične i indiferentne mikroelektrode, korišćene su Ag—AgCl elektrode.

Upravljanje mikroelektrodama vršeno je pomoću mikromanipulatora. Mikroelektrode su uvođene u ćeliju pod binokularnim mikroskopom pri uvećanju 300×, odnosno 56×. Biopotencijal vakuole registrovan je



Sl. 1. a. Čelija *Characeae*

b. Kalibracioni dijagram Ag-AgCl selektivne mikroelektrode u odnosu na indiferentnu elektrodu u rastvorima KCl.

c. Principijelna šema jednovremenog merenja biopotencijala (BP) i potencijala (E_{cl}) u živoj ćeliji. IE — indiferentna elektroda, ME — obična mikroelektroda, ME_{cl} — srebro-srebrohloridna selektivna mikroelektroda, PS — protočni sistem za smenu spoljašnjih rastvora, Č — ćelija, K — komora, V — vazelin, P — potenciometar, PP — potenciometar-pisač.

pomoću potenciometra — pojačivača tipa LP—58 koji je, za potrebe ovih istraživanja prilagođen. Registrovane veličine biopotencijala automatski i sinhronizovano su zapisivane pomoću potenciometra-pisača tipa 3PP—09.

Radi istovremenog merenja biopotencijala i aktivnosti hloridnih jona bilo je neophodno predvideti mogućnost naizmeničnog preključivanja na mreži potenciometra dve mikroelektrode (od ukupno tri), [Sl. 1c.]. Ovo preključivanje mikroelektroda na mreži potenciometra obavljano je pomoću ručnog ili poluautomatskog regulatora. Merenja su vršena sa tačnošću od $\pm 0,25$ mV. Eksperimenti su izvođeni pri temperaturi od 20°C.

Biopotencijali se uspostavljaju usled gradienta koncentracija pojedinih jona (K^+ , Na^+ , Cl^- i dr.) između ćelije i spoljašnje sredine. Stoga smo pored standardnog registrovanja bioelektričnih potencijala (BEP), kinetike njihovog uspostavljanja i aktivnosti hloridnih jona u vakuoli živih ćelija *Nitella* uveli istovremeno merenje aktivnosti hloridnih jona i BEP. Značaj ovog postupka je u tome, što on može poslužiti za eksperimentalnu proveru postojećih hipoteza o mehanizmu uspostavljanja električnih potencijala (Dainty, 1962; Walker, 1955; Radenović, 1967), a s druge strane, rezultati dobijeni metodom istovremenog merenja mogu se upoređivati sa rezultatima dobijenim metodom posebnog registrovanja istih veličina.

REZULTATI I DISKUSIJA

Uvođenjem »suve« mikropipete u kojoj je smeštena selektivna Ag—AgCl elektroda nije bilo odmah moguće vršiti merenja, jer se u prvim momentima pojavljuju biopotencijali nadražaja, koji su često praćeni prestankom kretanja citoplazme. Kretanje citoplazme uspostavlja se ponovo posle 2—3 minuta, a stabilizuje se posle 5—6 minuta, i tek tada je moguće meriti EBP i E_{Cl} . Pri provođenju eksperimenata, čije rezultate prikazujemo u ovom radu, nastojali smo da bude ispunjen uslov: $[KCl] + [NaCl] = \text{const}$. Ovaj uslov obezbeđivao je da koncentracija hlorida u spoljašnjoj sredini ostane neizmenjena, a da se koncentracija katjona (K^+ i Na^+) može menjati. Iz rezultata koji su prikazani u Tabeli 1. vidi se da aktivnost hloridnih jona u vakuoli živih ćelija *Nitella mucronata* i *N. flexilis* ima prosečnu vrednost $124,3 \pm 0,7$ mM, a da BP registrovani pod istim uslovima imaju prosečnu vrednost za polazni rastvor (0,1 mM KCl + 1,0 mM NaCl) $-155,0 \pm 1,4$ mV, dok za završni spoljašnji ćelijski rastvor (1,0 mM KCl + 0,1 mM NaCl) odgovarajuća vrednost biopotencijala iznosi $-109,7 \pm 0,8$ mV. Ista merenja provedena su i za sledeće rastvore koji okružuju ćeliju:

0,2 mM KCl + 0,9 mM NaCl

0,4 mM KCl + 0,7 mM NaCl

0,6 mM KCl + 0,5 mM NaCl

0,8 mM KCl + 0,3 mM NaCl

Aktivnost hloridnih jona, merena istovremeno sa BP u vakuoli živih ćelija, za navedene rastvore, ne odstupa od prosečne vrednosti aktivnosti hlorida koje su date u *Tabeli 1*. Upoređujući rezultate aktivnosti hlorid-

Tabela 1: Aktivnost hloridnih jona u vakuoli ćelije, biopotencijali (BP, mV) registrovani između vakuole i spoljašnjeg polaznog rastvora (p-rastvor: 0,1 mM KCl + 1,0 mM NaCl), odnosno završnog rastvora (z-rastvor: 1,0 mM KCl + 0,1 mM NaCl) i brzina kretanja citoplazme (v, μ /sec).

Red. br.	Aktivnost Cl ⁻ u mM	BP za p-rastvor u mV	BP za z-rastvor u mV	v u μ /sek
1	124	-156	-105	51
2	122	-153	-111	50
3	123	-160	-115	50
4	130	-155	-110	50
5	125	-150	-109	48
6	126	-166	-112	49
7	123	-149	-107	50
8	120	-152	-106	50
9	122	-163	-115	52
10	125	-151	-108	50
11	127	-150	-109	50
—	124,3 \pm 0,7	-155,0 \pm 1,4	-109,7 \pm 0,8	50,0 \pm 0,2

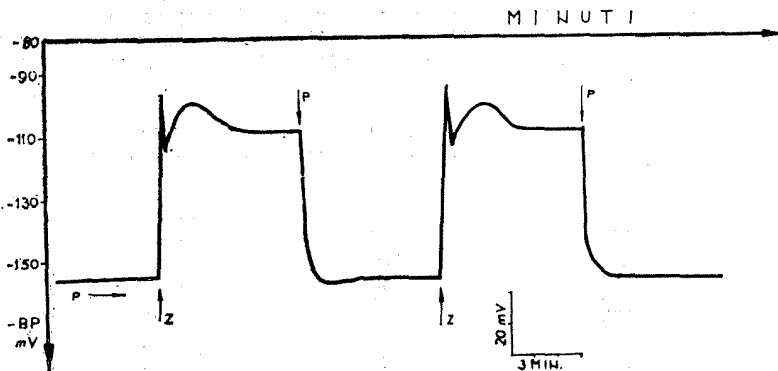
nih jona u vakuolarnom soku dveju vrsta *Nitella*, izmerene neposredno sa selektivnom Ag—AgCl elektrodom, sa rezultatima koncentracija hlorida, dobijenim hemijskim analizama, može se zaključiti da se hlor u vakuoli, najvećim delom nalazi u disosovanom obliku.

Određivanjem srednje aktivnosti hlorida u spoljašnjim rastvorima (KCl+NaCl) i u vakuolarnom soku, kod krupnih ćelija *Nitella*, stvorena je mogućnost provere teorije o formiranju biopotencijala koja korelira veličinu BP sa odnosom aktivnosti hloridnih jona u spoljašnjoj sredini i u vakuoli.

Distribucija jona Cl⁻ između spoljašnje sredine i vakuole ćelija, gajenih u uslovima koji su vrlo bliski prirodnim, karakteriše se značajnim nagomilavanjem ovih jona u vakuoli. Tako, na osnovu naših rezultata aktivnost hloridnih jona u vakuoli oko 113 puta je veća od aktivnosti istog jona u spoljašnjoj ćelijskoj sredini.

Ispitivana zavisnost električnih biopotencijala, pri konstantnoj koncentraciji anjona Cl⁻, menjala se po vrednosti i po kinetici uspostavljanja posebno za svaki od pomenutih spoljašnjih rastvora. Smenom rastvora, koji okružuje ćeliju, kinetika uspostavljanja biopotencijala se menja, [Sl. 2]. Tako, sa povećanjem spoljašnje koncentracije K⁺ za deset puta novonastali nivo biopotencijala uspostavlja se za vreme od 3,2 \pm 0,45 minuta i pri tome ima karakteristična kolebanja u predelu koji je određen novonastalom stacionarnom ravnotežom, [Sl. 2]. Ako sada ovaj spoljašnji rastvor (z-rastvor) smenimo sa rastvorom (p-rastvor) u kojem je koncen-

tracija Na^+ deset puta veća u odnosu na koncentraciju K^+ , vreme uspostavljanja nivoa biopotencijala je u proseku duže i iznosi $3,7 \pm 0,3$ minuta, [Sl. 2]. Ove promene biopotencijala su reverzibilne i mogu se ponoviti na jednoj istoj ćeliji više puta.



Sl. 2. Kinetika biopotencijala koji se formiraju pri smeni spoljašnjih rastvora:

p — 0,1 mM KCl + 1,0 mM NaCl

z — 1,0 mM KCl + 0,1 mM NaCl

Metod za istovremeno merenje BP i aktivnosti hloridnih jona u vakuoli živih ćelija jednostavan je i može se primeniti u bilo kojoj laboratoriji, gde postoji iskustvo u radu sa mikroelektrodama. Osim toga primena selektivnih mikroelektroda omogućila je da se pređe od mikrohemijskih analiza razorenih ćelija na određivanje aktivnosti hloridnih jona u živim ćelijama, a da se pri tom ne naruši sposobnost ćelija za obavljanje složenih procesa.

REZIME

Obavljena ispitivanja obuhvataju sledeće rezultate:

1. Konstruisana je i razrađena laboratorijska aparatura za istovremeno registrovanje aktivnosti hloridnih jona i bioelektričnih potencijala u vakuoli ćelija *Nitella*. Pomoću ove aparature demonstriran je postupak mikroanalize koji omogućava kvantitativno određivanje aktivnosti hloridnih jona u mikroprobama zapremine $2,5 \cdot 10^{-7}$ ml.

2. Prosečna aktivnost hloridnih jona u vakuoli ćelija *Nitella mucronata* i *N. flexilis* iznosi $124,3 \pm 0,7$ mM i ne zavisi od smene spoljašnjih rastvora u kojima se aktivnost hlorida održava konstantnom.

3. Distribucija hloridnih jona između vakuole i spoljašnje ćelijske sredine karakteriše se nagomilavanjem hlorida u vakuoli — aktivnost hlorida u vakuoli veća je za oko 113 puta od aktivnosti istog jona u spoljašnjoj ćelijskoj sredini.

4. Biopotencijali registrovani u vakuoli, po kinetici formiranja i promeni u veličini, zavise od sumarnih izmena spoljašnjih koncentracija kationa — K^+ i Na^+ .

LITERATURA

- Kostjuk, P. G. (1960): Mikroelektrodna tehnika. Izd. ANUSSR, Kiev.
 Kurella, G. A. (1958): Biofizika, 3, 243.
 Dainty, J., (1962): Ann. Rev. Plant Physiol. 13, 379.
 Walker, N. A., (1955): Austr. J. Biol. Sci. 8, 476.
 Vorobev, L. N., Kurella, G. A., Popov, G. A. (1961): Biofizika, 6, 582.
 Vorobev, L. N., (1965): Biofizika, 10, 358.
 Vorobev, L. N., Radenović, Č., Hitrov, Ju. A; Jaglova, L. G. (1967): Biofizika, 12, 1016.
 Vorobev, L. N., Li Su — ju nj., Radenović, Č. (1965): Fiziko-himičke osnove avtoregulacije u kletkama. Izd. »Nauka«, Moskva.
 Radenović, Č. (1967): Mehanizam uspostavljanja električnog potencijala (biopotencijala) na membranama biljnih ćelija. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu.
 Radenović, Č. (1966): Ispitivanje uloge adnovalentnih i dvuvalentnih kationov i anionov u formiranju biopotencijala u kletkama vodorosle. Disertacija kandidata nauke (avtorferat). Moskovskij gosudarstvenij Univerzitet im. M. V. Lomonosova.
 Hodgkin, A. L., Horowicz, P. (1959): J. Physiol. 148, 127.

Résumé

ČEDOMIR RADENOVIĆ

ETUDE SIMULTANÉE DE L'ACTIVITÉ DES IONS DU CHLORIDE ET DES BIOPOTENTIELS ÉLECTRIQUES DANS LA VACUOLE DES CELLULES DE *NITELLA MUCRONATA* ET *NITELLA FLEXILIS*

Un appareillage de laboratoire pour l'enregistrement simultané de l'activité des ions du chlorure et des potentiels bioélectriques dans la vacuole de la cellule de *Nitella*, a été construit et élaboré en détail. La prise de microessais d'un volume de $2,5 \cdot 10^{-7}$ ml peut être appliquée aussi comme méthode de microanalyse pour la détermination quantitative de l'activité des ions du chlorure.

La moyenne de l'activité des ions du chlorure dans la vacuole de la cellule de *Nitella mucronata* et de *Nitella flexilis* est $124,3 \pm 0,7$ mM et ne dépend pas de la substitution des solutions extérieures où l'activité du chlorure est maintenue constamment.

La distribution des ions du chlorure entre la vacuole et le milieu cellulaire extérieur est caractérisée par l'accumulation du chlorure dans la vacuole — l'activité du chlorure dans la vacuole est environ 113 fois plus grande que l'activité de se ion dans le milieu cellulaire extérieur.

Les biopotentiels enregistrés dans la vacuole, d'après la cinétique de formation et le changement de la grandeur, dépendent des substitutions des concentrations extérieures des cations: K^+ et Na^+ .