

АНАЛИЗ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ВОДОРОСЛИ *CLORELLA PYRENOIDOSA* S-39 С ПОМОЩЬЮ ИМПЕДАНСНЫХ ДИАГРАММ

Е.С. Озерова¹, С.В. Константиновская², Ю.Ф. Перов¹,
Л.Б. Братковская¹, С.Е. Плеханов¹

¹Биологический факультет,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Воробьевы горы, 119899, Москва, Россия;

²Экологический факультет, Российский университет дружбы народов,
Подольское шоссе, 8/5, 113093, Москва, Россия

Анализ электрических свойств клеток показал возможность использования полученных данных для оценки физиологического состояния развивающихся культур водоросли.

Для графического представления и анализа зависимости активного сопротивления R от реактивного X в широком диапазоне частот суспензий клеток водоросли *Chlorella* предлагается метод построения импедансных диаграмм в комплексной плоскости. Анализ электрических свойств клеточных суспензий позволил определить величину сопротивления внутреннего содержимого клетки $R_{вн}$ и сопротивления межклеточной среды $R_{мк}$. Установлено, что действие 2,4 ДНФ и ПХФ-*Na* на мембраны клеток водоросли сопровождается изменениями концентрации ионов как в межклеточной, так и во внутренней среде клетки. Показана двухфазность действия ПХФ-*Na*-активация процессов ионного транспорта при 10^{-4} М, их ингибирование при 10^{-3} М и необратимые нарушения функционирования мембран при 10^{-3} М. Использование импедансных диаграмм позволяет оценивать функциональное состояние клеток водоросли путем измерения их электрических свойств в широком диапазоне частот в норме, при воздействии химических загрязнителей и определения механизмов их действия.

Измерение электрических свойств суспензий клеток в широком диапазоне частот, или электроспектроскопия, позволяет изучать и контролировать те изменения, которые происходят в процессе развития культур или действия повреждающих факторов в реальном масштабе времени и без нарушения интактности клеток. При этом соответствующие методы анализа экспериментальных данных открывают возможность получения информации, позволяющей объективно и с высокой точностью оценивать функциональное состояние клеток.

В первую очередь к таким методам анализа следует отнести предложенный К. Cole: представление электрических параметров биологических объектов путем построения их активной (R) и реактивной (X) составляющих в комплексной плоскости или в виде импедансной диаграммы [1]. Этот методический прием, который в настоящее время значительно усложнился [2], успешно используется при разработке биосенсоров и других инструментальных средств исследования и контроля за состоянием окружающей среды и биологических объектов [3, 4]. Ранее нами были изучены электрические свойства суспензии клеток водоросли *Chlorella pyrenoidosa* S-39 в экспоненциальную фазу роста в диапазоне частот от 10^3 до 10^7 Гц, где в области частот 5×10^5 - 10^7 Гц установлена β -дисперсия [5]. Можно полагать, что привлечение к анализу полученных результатов метода построения импедансных диаграмм по К. Cole позволит существенно расширить

информативные возможности экспериментальных данных по электрическим параметрам клеток водоросли *Chlorella*.

Материал и методика. В качестве объекта исследования использовали аксеничную культуру водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick. штамм DMMSU S-39. Культуру *C. pyrenoidosa* выращивали накопительным методом на среде Тамия в культуральных сосудах с 250 мл среды при температуре 37°C и непрерывном освещении 40 Вт/м² лампами ЛБ-80. Измерения электрических свойств суспензии клеток водоросли *Chlorella* на 7-е сутки культивирования проводились на установке по ранее описанной методике [5]. В экспериментах использовались 2,4 динитрофенол (2,4 ДНФ; «Серва») и натриевая соль пентахлорфенола – (ПХФ-*Na*; «Merck»), которые вносились в культуральную среду в концентрациях 10⁻⁴ М (2,4 ДНФ) и 10⁻², 10⁻³ и 10⁻⁴ М (ПХФ-*Na*) после 2-го отмыва (из 3-х) клеток водоросли раствором холинхлорида в концентрации, эквимолярной среде культивирования.

Результаты и обсуждение. При анализе электрических параметров биологических объектов принято использовать эквивалентные электрические схемы различной степени сложности, отражающие характер частотных зависимостей электрических свойств в широком диапазоне частот. При этом предполагается, что окружающая среда и внутреннее содержимое клетки обладают электрической проводимостью и емкостью. Наиболее простые эквивалентные электрические схемы состоят из активного сопротивления R и емкости C , которые соединены или последовательно (R_p, C_p), или параллельно (R_s, C_s) [6]. Однако такие схемы являются упрощенными и не способны в достаточной степени отражать электрические параметры биологических объектов в широком диапазоне частот.

В связи с этим правильнее использовать эквивалентную электрическую схему, которая более полно соответствует электрическим параметрам суспензии клеток, состоящую из комбинации последовательного и параллельного соединений активных сопротивлений и емкости (рис.1).

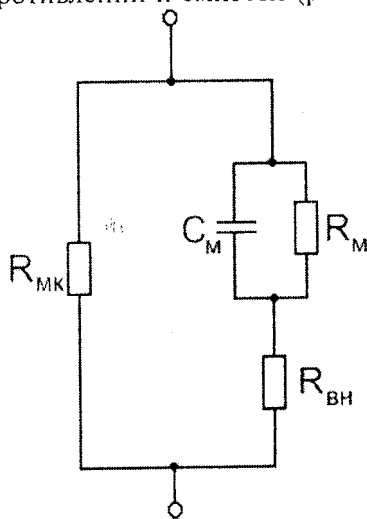


Рис. 1. Эквивалентная электрическая схема суспензии клеток: $R_М$ и $C_М$ – соответственно активное сопротивление и емкость клеточной мембраны; $R_МК$ – активное сопротивление межклеточной среды; $R_ВН$ – активное сопротивление внутреннего содержимого клетки.

Применение такой эквивалентной схемы с минимальным числом одно-значно связанных между собой элементов позволяет без сложных математических расчетов по величине одной из составляющих определять величины других. В этой эквивалентной схеме клеточная мембрана представлена параллельным соединением активного сопротивления R_M и емкости C_M , а сопротивлениями межклеточной среды и внутреннего содержимого клетки соответственно являются $R_{МК}$ и $R_{ВН}$ [6]. Наличие в эквивалентной схеме активного сопротивления R_M , включенного параллельно емкости клеточной мембраны C_M , изначально предполагает, что мембрана помимо емкости обладает и электрической проводимостью.

Анализ частотной зависимости эквивалентной схемы показывает, что часть переменного тока проходит по межклеточной среде, тогда как другая часть — через мембрану и внутреннюю среду клетки. Отношение величин этих токов проявляет значительную зависимость от частоты благодаря наличию у клеточной мембраны емкости C_M .

Общее сопротивление на переменном токе или импеданс представленной на рис. 1 эквивалентной схемы $Z_{ЭК}$ может быть выражен в следующем виде:

$$Z_{ЭК} = \frac{R_{МК}(R_{ВН} + Z_M)}{R_{МК} + R_{ВН} + Z_M}, \quad (1)$$

где Z_M — импеданс клеточной мембраны равный:

$$Z_M = \frac{R_M + X_M}{R_M X_M}. \quad (2)$$

В выражении (2) X_M — реактивное сопротивление мембраны;

$$X_M = \frac{1}{\omega C_M},$$

где $\omega = 2\pi f$; f — частота, на которой проводится измерение электрических свойств.

Величина емкости C_M не зависит от частоты и для мембран различных биологических объектов имеет стабильную величину $\sim 1,0$ мкФ/см², тогда как реактивное сопротивление мембраны X_M проявляет частотную зависимость. Активные сопротивления $R_{МК}$ и $R_{ВН}$ не зависят от частоты, однако их значения отражают функциональное состояние как самой клетки с ее внутренним содержимым, так и внешней мембраны. Так, величина сопротивления R_M зависит от уровня проницаемости мембраны клетки и в первую очередь для ионов, тогда как $R_{МК}$ определяется концентрацией ионов в межклеточной среде.

При экстраполяции импеданса эквивалентной электрической схемы (рис. 1) в область крайне низких частот ($\omega \rightarrow 0$) реактивное сопротивление клеточной мембраны X_M очень велико ($X_M \rightarrow \infty$) и им можно пренебречь. Поскольку величина активного сопротивления мембраны R_M в низкочастотной области значительно выше, чем сопротивления межклеточной среды $R_{МК}$ и внутреннего содержимого клетки $R_{ВН}$, то измеренное на этих частотах сопротивление R_0 будет определяться преимущественно $R_{МК}$, т.е. $R_0 = R_{МК}$. В случае высоких частот ($\omega \rightarrow \infty$) реактивное сопротивление клеточной мембраны X_M стремится к своему минимальному значению ($X_M \rightarrow 0$), и оно шунтирует активное сопротивление клеточной мембраны R_M , в результате чего величина сопротив-

ления R_∞ будет определяться соотношением сопротивлений $R_{МК}$ и $R_{ВН}$. В отсутствие шунтирования, т.е. при низкой электрической проводимости межклеточной среды (большое значение сопротивления $R_{МК}$), величина R_∞ будет равна сопротивлению внутреннего содержимого клетки $R_{ВН}$.

Для графического представления зависимости активного сопротивления R от реактивного X в широком диапазоне частот используется предложенный К. Cole способ построения в комплексной плоскости, или импедансной диаграммы, в которой параметром является частота [1]. Если для различных частот, на которых проводилось измерений электрических параметров клеточной суспензии, отложить значения X по оси ординат, а значения R по оси абсцисс, то полученный результирующий график будет иметь форму полуокружности с центром, смещенным относительно оси абсцисс (рис.2).

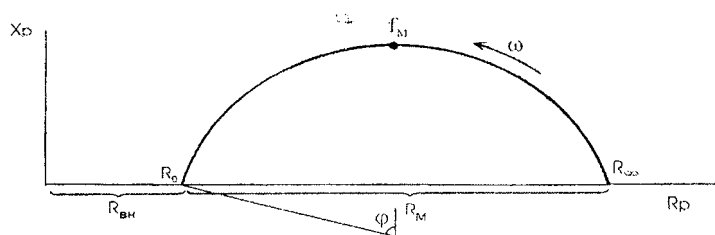


Рис. 2. Комплексная импедансная диаграмма по К. Cole

Наибольшее значение X на полуокружности соответствует характеристической частоте f_M (для исследуемой суспензии клеток), на которой наблюдается максимальная дисперсия ее электрических параметров. Полученная полуокружность пересекает ось абсцисс (активного сопротивления R) в точках R_0 и R_∞ , что дает возможность использовать построенную импедансную диаграмму для определения электрических параметров суспензии клеток по ее элементам в эквивалентной электрической схеме.

В электрохимии подобный метод анализа был предложен J.H. Sluyters с сотр. для изучения обратимости протекающих на электродах реакций путем измерения электродного импеданса при прохождении переменного электрического тока [6,7]. В том случае, когда реакция полностью обратима, т.е. происходит перенос зарядов через границу раздела сред, или, применительно к биологическим мембранам, когда они обладают полной проницаемостью, график частотной зависимости X от R представляет собой прямую линию с наклоном 45° относительно оси абсцисс. При полностью необратимой реакции или, когда мембраны клеток полностью непроницаемы, график частотной зависимости X от R имеет вид полуокружности с центром, лежащим на оси абсцисс. В суспензиях нативных клеток, мембраны которых обладают избирательной проницаемостью в результате функционирования механизмов активного и пассивного транспорта, перенос через мембрану ионов отражается в понижении центра полуокружности относительно оси абсцисс (рис. 2). В связи с этим, угол φ , образованный прямой, проведенной через центр полуокружности и точку ее пересечения с осью абсцисс (точка R_∞), и перпендикуля-

ром, опущенным из центра на эту ось из точки f_m , является характеристикой уровня функционирования транспортных процессов (активных и пассивных) через мембрану клетки и представляет собой фазовый угол мембраны φ [8]. Для того, чтобы охарактеризовать проницаемость (проводимость) клеточной мембраны, выражающуюся в виде снижения центра полуокружности, используется безразмерный параметр частотной характеристики мембраны α , ($\alpha = 2\varphi/\pi$), который является дополнительным критерием ее состояния и определяется характером распределения процессов релаксации на мембране, то есть связан с процессами транспорта зарядов. В том случае, когда $\alpha = 1$, электрические свойства мембраны (импеданс) определяются исключительно ее емкостью, а при $\alpha < 1$ в мембране присутствует проводимость (активное сопротивление).

Таким образом, анализ электрических свойств клеточных суспензий с помощью импедансных диаграмм в комплексной плоскости позволяет, исходя из полученных экспериментально значений сопротивления R_s и емкости C_s , по точкам пересечения полуокружности с осью абсцисс определить величину сопротивления внутреннего содержимого клетки $R_{вн}$ и сопротивления межклеточной среды $R_{мк}$.

Построение импедансной диаграммы на основе экспериментальных данных осуществляется следующим образом. Значения сопротивления R_s и емкости C_s суспензии клеток, полученные при измерениях на переменном токе в параллельной эквивалентной схеме, пересчитываются в последовательную схему по формулам:

$$R_p = \frac{R_s}{1 + \omega^2 C_s^2 R_s^2}; C_p = \frac{1 + \omega^2 R_s^2 C_s^2}{\omega^2 R_s^2 C_s^2}; X_p = \frac{1}{\omega C_p},$$

где R_p , C_p , X_p соответственно активное сопротивление, емкость и реактивное сопротивление суспензии клеток в последовательной эквивалентной схеме.

Затем по оси ординат откладывают значения реактивного сопротивления суспензии клеток X_p , а по оси абсцисс — значения активного сопротивления R_p на всех тех частотах, на которых проводились измерения. Геометрическое место точек всех этих значений образует полуокружность, пересекающую ось абсцисс в двух точках, одна из которых $R_\infty = R_{вн}$, другая — $R_0 = R_{мк}$, а центр полуокружности смещен ниже относительно оси абсцисс (рис. 2) и образует с ней фазовый угол φ . Максимальное значение реактивного сопротивления X_p соответствует частоте f_m , при которой наблюдается максимальная дисперсия электрических параметров исследуемой суспензии клеток водоросли.

В первой группе экспериментов были выполнены измерения электрических свойств суспензии клеток водоросли при внесении в культуральную среду 2,4 ДНФ в концентрации 10^{-4} М. Комплексная импедансная диаграмма, построенная по результатам измерений, представленная на рис. 3, показывает, что влияние 2,4 ДНФ сказалось в снижении, по сравнению с интактными клетками, величины как сопротивления межклеточной среды $R_{мк}$, так и внутреннего содержимого клеток $R_{вн}$. Так, сопротивление межклеточной среды $R_{мк}$ уменьшилось со 157 Ом у интактных клеток до 127 Ом, а сопротивление внутреннего содержимого клеток $R_{вн}$ снизилось со 128 Ом (интактные клетки) до 75 Ом. Эти изменения сопровождались смещением центра полуокружности импедансной диаграммы вниз относительно оси абсцисс — величина фазового угла φ уменьшилась с 80° до 75° , что ука-

зывает на изменение характеристик транспорта на мембране и соответствующие изменения как $R_{МК}$, так и $R_{ВН}$.

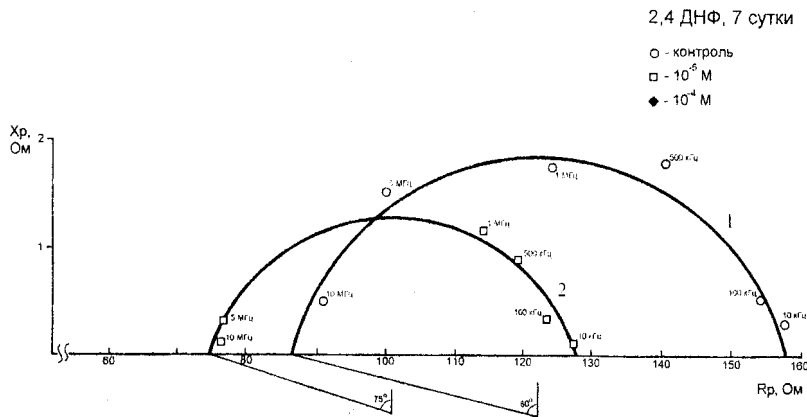


Рис. 3. Комплексные импедансные диаграммы суспензии клеток водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39 (7-е сутки культивирования): 1 — интактные клетки, 2 — клетки в присутствии в среде 10^{-4} М 2,4 ДНФ

Несколько иной характер изменения отмечался при внесении в культуральную среду ПХФ-*Na* в концентрациях 10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4} М (рис.4). Так, ПХФ-*Na* в концентрациях 10^{-3} и 10^{-4} М вызывал по сравнению с интактными клетками изменение только величины сопротивления межклеточной среды $R_{МК}$, а сопротивление внутреннего содержимого клеток $R_{ВН}$ оставалось неизменным. Вместе с тем, ПХФ-*Na* в концентрации 10^{-4} М приводил к повышению величины сопротивления межклеточной среды $R_{МК}$ — с 250 Ом у интактных клеток до 280 Ом у опытных и только в большей концентрации (10^{-3} М) величина $R_{МК}$ снизилась до 220 Ом.

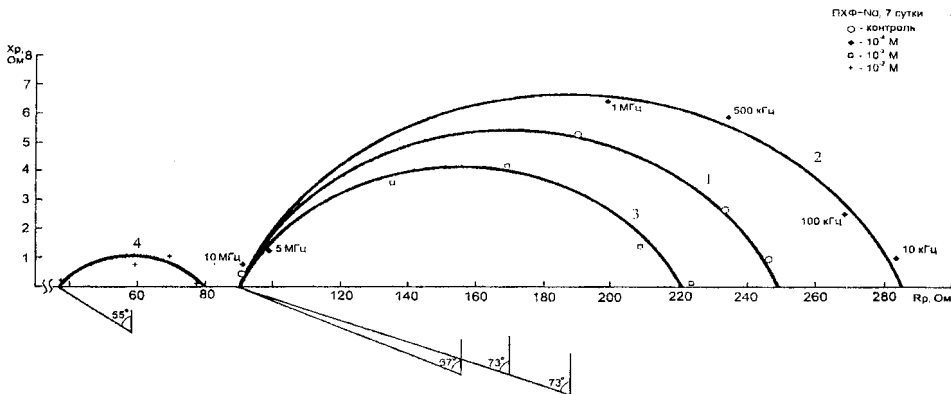


Рис. 4. Комплексные импедансные диаграммы суспензии клеток водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39 (7-е сутки культивирования): 1 — интактные клетки, 2 — клетки в присутствии в среде 10^{-4} М ПХФ-*Na*; 3 — клетки в присутствии в среде 10^{-3} М ПХФ-*Na*; 4 — клетки в присутствии в среде 10^{-2} М ПХФ-*Na*

Следует отметить, что только при концентрации ПХФ-*Na* в среде, составлявшей 10^{-3} М, отмечалось уменьшение фазового угла мембраны до 73° , тогда как при 10^{-4} М его величина не отличалась от величины для суспензии интактных клеток. При дальнейшем увеличении концентрации ПХФ-*Na* в культуральной среде (до 10^{-2} М) отмечалось резкое снижение величины сопротивления межклеточной среды $R_{\text{МК}}$ до 90 Ом, а сопротивление внутреннего содержимого клеток $R_{\text{ВН}}$ стало меньше 40 Ом (рис. 4). Центр полуокружности импедансной диаграммы еще в большей степени сместился вниз относительно оси абсцисс, что привело к уменьшению величины фазового угла мембраны до 55° .

Механизм действия таких разобщителей, как 2,4 ДНФ и ПХФ-*Na* на биологические мембраны с точки зрения их электрических свойств по Р. Mitchell, сводится к повышению их электрической проводимости, что впоследствии было подтверждено исследованиями на искусственных фосфолипидных мембранах, выполненных в лабораториях Е. Либермана и А.Л. Lehninger [10, 11]. Как установлено экспериментально, эффективность действия 2,4 ДНФ и ПХФ-*Na* на мембраны клеток водоросли можно успешно оценить при измерении их электрических свойств с использованием метода построения комплексных импедансных диаграмм, позволяющего однозначно определить характер изменения проницаемости мембран клеток, которые сопровождаются изменениями концентрации ионов как в межклеточной, так и во внутренней среде клетки. Кроме того, выполненный анализ показал характерную для многих разобщителей двухфазность действия [12], выявленную при использовании ПХФ-*Na* в различных концентрациях (рис. 4) — активация процессов ионного транспорта при 10^{-4} М, их ингибирование при 10^{-3} М и необратимые нарушения функционирования мембран при 10^{-3} М.

Таким образом, использование метода построения импедансных диаграмм в комплексной плоскости позволяет значительно повысить информативность метода оценки функционального состояния клеток водоросли *C. pyrenoidosa* путем измерения их электрических свойств в широком диапазоне частот и открывает новые возможности для биотестирования химических загрязнителей окружающей среды или определения механизмов их действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cole K.S. Membranes, Ions and Impulses. — Berkely and Los Angeles, Univ. of California Press, 1968.
2. Келл Д.Б. Изучение электрического импеданса. Принципы и возможности спектроскопии электрического адмиттанса // Биосенсоры: основы и приложения: Пер. с англ. / Под ред. Э. Тернера, И. Краубе, Дж. Уилсона. — М.: Мир, 1992. — С. 344-374.
3. Grimnes S., Martinsen I.G. Bioimpedance and Bioelectricity Basics. — New York: Academic, 2000.
4. Grimnes S., Martinsen I.G. Cole electrical impedance model — a critique and an alternative // IEEE Trans. Biomed. Eng. 2005. — Vol.52, N.1. — P. 132-155.
5. Озерова Е.С., Константиновская С.В., Перов Ю.Ф., Плеханов С.Е. Электрические свойства клеток водоросли *Clorella pyrenoidosa* // Вестн. РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности — 2004.
6. Шван Г. Спектроскопия биологических веществ в поле переменного тока // Электроника и кибернетика в биологии и медицине. — М.: Изд-во Иностранной литературы, 1963. — С. 71-108.
7. Sluyters J.H. On the impedance of galvanic cell. I. Theory // Rec. trav. chim. — 1960. — Vol.79, N.8. — P. 1092-1100.
8. Renbach M., Sluyters J.H. On the impedance of galvanic cell. IV. Determination of the rate constants of rapid electrode reaction from electrode impedance measurements // Ibid. — 1962. — Vol.81, N.4. — P. 301-306.

9. Cole K.S. Electric phase angle of cell membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1932. – Vol. 15, N. 6. – P. 641-649.
10. Либерман Е.А. Переносчики ионов через биологические мембраны // Биологические мембраны. – М.: Медицина, 1973. – С. 48-66.
11. Bielawsky J., Thompson T.E., Lehninger A.L. The effect of 2,4-dinitrophenol on the electrical resistance of phospholipid bilayer membrane // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1966. – Vol.24. N. 6. – P. 943 –947.
12. Pentachlorophenol / *Environmental Health Criteria*; 71. – World Health Organization, Geneva, 1987.

THE ANALYSIS OF ELECTRICAL PROPERTIES OF THE SEAWEED CELLS *CHLORELLA PYRENOIDOSA* S-39

E.S. Ozerova¹, S.V. Konstantinovskaja², Yu.F. Perov¹,
I.F. Bratkovskaya¹, S.E. Plehanov¹

¹*M.V. Lomonosov Moscow State University,
Vorob'ovi gori, 119899, Moscow, Russia*

²*Ecological Faculty, Russian Peoples' Friendship University,
Podolskoye shosse, 8/5, 113093, Moscow, Russia*

The analysis of electric properties of cells has shown an opportunity of use of the received data for an estimation of a physiological condition of developing cultures seaweed.