

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное бюджетное государственное образовательное учре-  
ждение высшего профессионального образования  
«Нижегородский государственный университет имени  
Н.И. Лобачевского»

Сухов В.С., Неруш В.Н., Калинин В.А., Крауз В.О., Воденев В.А.

*БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ:  
БИОЭЛЕКТРОГЕНЕЗ У РАСТЕНИЙ*

*Раздел большого практикума по биофизике*

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией биологического факульте-  
та для студентов биологического факультета ННГУ, обучающихся  
по направлению 020200 «Биология» и специальности 020207 «Био-  
физика»

Нижегород  
2011

УДК 577.3  
ББК 28.07

Сухов В.С., Неруш В.Н., Калинин В.А., Крауз В.О., Воденеев В.А., Биоэлектрические явления: биоэлектрогенез у растений. Раздел большого практикума по биофизике: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского государственного университета, 2009. – 69 с.

Рецензент: д.ф.-м.н. **В.Б. Казанцев**

В настоящем пособии представлены методические разработки к разделу «Биофизики» - «Биоэлектрические явления», которые кратко излагают теоретические основы биоэлектрогенеза в растениях и включают лабораторные работы большого практикума по этому разделу.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов старших курсов биологического факультета ННГУ, обучающихся по направлению 020200 «Биология» и специальности 020207 «Биофизика»

УДК 577.3  
ББК 28.07

© **Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 2011**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b>	4
<b>Глава 1. Потенциалы покоя у растений</b>	5
Лабораторная работа №1. Изучение потенциала покоя изолированных растительных клеток (харовых водорослей)	12
Лабораторная работа №2. Исследование биоэлектрических потенциалов высших растений методом экстраклеточной регистрации	15
Лабораторная работа №3. Изучение фотоэлектрической реакции растений	17
Лабораторная работа №4. Внутриклеточная регистрация биоэлектрической активности растений	20
<b>Глава 2. Потенциалы возбуждения у растений</b>	23
Лабораторная работа №1. Исследование генерации и распространения потенциалов действия у высших растений	30
Лабораторная работа №2. Исследование генерации и распространения переменных потенциалов у высших растений	32
Лабораторная работа №3. Исследование ионных механизмов генерации потенциала действия потенциометрическим методом	33
<b>Глава 3. Функциональная роль потенциалов возбуждения у растений</b>	37
Лабораторная работа №1. Исследование влияния распространяющихся электрических сигналов на фотосинтетическую активность высших растений	42
Лабораторная работа №2. Исследование влияния распространяющихся электрических сигналов на холодоустойчивость высших растений	47
<b>Глава 4. Математическое моделирование процессов биоэлектrogenеза у растений</b>	50
Лабораторная работа №1. Теоретический анализ роли систем активного и пассивного транспорта ионов через плазмалемму в формировании потенциала покоя и генерации потенциалов действия у растений	63
Лабораторная работа №2. Теоретический анализ процесса распространения потенциала действия у высших растений	65
<b>Список рекомендованной литературы</b>	66

## ***Введение***

Биоэлектрогенез, т.е. способность к генерации электрических потенциалов, является универсальным свойством всех живых организмов, включая растения. При этом биоэлектрические процессы не только являются результатом жизнедеятельности клеток, но и сами играют важную роль в функционировании живых систем, играя регуляторную, энергетическую, информационную и другие роли. Кроме того, биоэлектрические потенциалы могут служить весьма чувствительным диагностическим показателем функционального состояния живого организма, позволяющим, в частности, оценить влияние на него факторов окружающей среды.

Процессы биоэлектрогенеза связаны в первую очередь с наличием в клетках избирательно проницаемых для ионов мембранных структур, в частности – плазматической мембраны (ПМ). Именно потенциалы на ПМ (точнее трансмембранные разности электрических потенциалов между водными фазами, разделенными ПМ) и связанные с ними показатели (например, разность потенциалов между различными частями живого объекта) являются одними из наиболее традиционных объектов при исследованиях биоэлектрогенеза. В то же время, генерация электрических потенциалов может происходить и на других мембранных структурах клетки, в первую очередь – на сопрягающих мембранах (тилакоидные мембраны хлоропластов и мембраны митохондрий), разность электрических потенциалов которых участвует в синтезе АТФ.

Среди потенциалов ПМ могут быть выделены стационарные потенциалы и потенциалы возбуждения. К стационарным потенциалам относят постоянные или относительно медленно меняющиеся во времени потенциалы на ПМ. Так можно отметить потенциалы покоя (ПП) (трансмембранная разность потенциалов на ПМ в условиях покоя) и обусловленные ими потенциалы – метаболические потенциалы (разности потенциалов связанные с разной интенсивностью метаболизма в различных участках растения, например между освещенным и неосвещенным участками - фотоэлектрическая реакция), демаркационные потенциалы (между интактным и поврежденным участками) и др.

Потенциалы возбуждения представляют собой быстрые и обратимые изменения мембранного потенциала, вызванные обычно действием тех или иных факторов. К потенциалам возбуждения относятся в первую очередь потенциалы действия (ПД), наблюдающиеся как у животных (нервные и мышечные клетки), так и у растений. У растительных объектов наблюдается еще один специфический тип потенциалов возбуждения – переменные потенциалы (ВП), отличающиеся по ряду параметров от потенциалов действия.

Следует отметить, что разделение на стационарные потенциалы и потенциалы возбуждения не имеет абсолютного характера. Так, например, разность потенциалов между освещенным и не освещенным участками листа является, безусловно, метаболическим потенциалом, однако фотоэлектрич-

ская реакция, возникающая в ответ на освещение листа, имеет черты потенциала возбуждения – возникает в ответ на действие внешнего фактора (свет) и имеет сложную, колебательную кинетику. Учитывая относительно медленный характер изменений потенциала в ходе фотоэлектрической реакции (~мин и более), в рамках настоящей работы она будет рассматриваться как стационарный потенциал.

Кроме стационарных потенциалов и потенциалов возбуждения можно выделить еще одну группу биоэлектрических процессов – это осцилляции мембранного потенциала. Такие автоколебательные процессы не являются стационарными потенциалами, так как мембранный потенциал быстро и непрерывно меняет свою величину, однако их нельзя отнести и к потенциалам возбуждения, так как отсутствуют факторы, индуцирующие колебания. В качестве примера осцилляций потенциала ПМ у растений можно привести микроритмы – быстрые (частота ~ нескольких герц) и низкоамплитудные (менее 1 мВ) колебания мембранного потенциала в клетках растений.

В целом следует отметить, что если у животных процессы биоэлектrogenеза изучены достаточно полно, то у растений эта проблема находится в стадии активного изучения. При этом наиболее изученными остаются биоэлектрические процессы в клетках харовых водорослей, которые являются наиболее традиционным объектом исследования в электрофизиологии растений. Однако такие клетки являются значительно упрощенной системой по сравнению со сложными комплексами связанных клеток, которые характерны для высших растений, что делает проблему исследования биоэлектrogenеза у последних весьма важным направлением исследований. Поэтому изучение биоэлектрических свойств многоклеточных высших растений и освоение методических приемов таких исследований, наряду с освоением классических методов изучения биоэлектrogenеза харовых водорослей является основной задачей данного практикума.

## ***ГЛАВА 1. ПОТЕНЦИАЛ ПОКОЯ У РАСТЕНИЙ***

Как уже отмечалось, к стационарным потенциалам относят постоянные или относительно медленно меняющиеся во времени потенциалы на ПМ. Ключевая роль при этом принадлежит ПП – т.е. трансмембранной разности потенциалом на ПМ в покое. Именно существование ПП обеспечивает разность потенциалов между поврежденным и неповрежденным участками растительного организма при возникновении демаркационного потенциала, а разность между ПП (и как следствие – между поверхностными потенциалами) в зонах растения с различной интенсивностью метаболизма обеспечивает возникновение метаболических потенциалов. Изменения ПП, связанные с протекающими внутри клетки процессами, могут приводить к появлению медленно меняющихся стационарных потенциалов, например, к фотоэлектрической реакции.

ПП ( $E_m$ ) у растений, как, впрочем, и у животных, включает в себя две компоненты – диффузионную (пассивную) и метаболическую (активную),

насосную), в то же время, если у животных вкладом активной компоненты можно, как правило, пренебречь (менее 2%), то у растений она значительно выше (60-70%).

### **Диффузионная компонента ПП**

Диффузионная компонента ПП ( $E_D$ ) – может быть рассчитана по уравнению Гольдмана, учитывающему активность ( $a_{j,k}$ ) потенциалопределяющих ионов внутри (i) и снаружи (o) клетки:

$$E_D = \frac{RT}{zF} \ln \frac{\sum_j P_{j+} (a_{j+})_o + \sum_k P_{k-} (a_{k-})_i}{\sum_j P_{j+} (a_{j+})_i + \sum_k P_{k-} (a_{k-})_o}, \quad (1.1)$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура (в К),  $F$  – постоянная Фарадея,  $z$  – усредненная валентность,  $P_{j+}$  – проницаемость ПМ для катиона  $j$ ,  $P_{k-}$  – проницаемость ПМ для аниона  $k$ .

В реальных условиях обычно учитываются только три типа ионов  $K^+$ ,  $Cl^-$  и  $Na^+$  и уравнение (1.1) преобразуется в (1.2):

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}, \quad (1.2)$$

где  $P_K$ ,  $P_{Na}$  и  $P_{Cl}$  – проницаемости для  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ , соответственно.

Если принять во внимание, что проницаемость ПМ для ионов калия обычно существенно выше, чем для других потенциалобразующих ионов, то можно описать диффузионную компоненту уравнением Нернста для  $K^+$  ( $E_D$  – близок к калиевому равновесному потенциалу):

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}, \quad (1.3)$$

Учитывая тот факт, что концентрация калия внутри клетки, обычно, значительно (на 2-3 порядка) выше, чем его концентрация во внешней среде,  $E_D$  имеет отрицательную величину.

Однако следует отметить, что уравнения (1.1) – (1.3) могут быть использованы для оценки величины  $E_D$  в условиях подавленной метаболической компоненты (или когда она пренебрежимо мала, как, например, в нервных клетках животных). В том же случае, когда в ПП одновременно присутствует достаточно значительная метаболическая компонента, для учета  $E_D$  требуются более сложные подходы, которые мы рассмотрим чуть ниже.

До сих пор мы говорили о пассивной проницаемости ПМ, не касаясь вопроса об ее механизмах. Однако, учитывая тот факт, что проницаемость липидного бислоя, лежащего в основе биомембран, для ионов очень низка, высокая проницаемость ПМ для потенциалобразующих ионов должна быть связана со специальными структурами на мембране. Такими структурами являются основные системы пассивного транспорта для ионов – ионные каналы.

Ионные каналы представляют собой белковую структуру, состоящую из следующих частей: части интегрального белка, образующего пору в мембране, воротного механизма, селективного фильтра (центра) и сенсора, вос-

принимая внешнего сигнала. Пора делает возможным собственно движение иона через мембрану, селективный фильтр отвечает за высокую специфичность проведения у ионных каналов, воротный механизм и сенсор обеспечивают регуляцию канала, его управляемость.

### ***Метаболическая компонента ПП***

Метаболическая составляющая ПП ( $E_p$ ) – возникает в результате работы электрогенного насоса, роль которого в ПМ растений играет  $H^+$ -АТФаза. Доля метаболического компонента в ПП у растительных объектов может достигать 60-70% от общего  $E_m$ , что обеспечивает высокие значения ПП у растений (около -150 мВ, у некоторых водных растений он может быть отрицательнее -250 мВ).

$H^+$ -АТФаза является АТФазой типа  $E_1E_2$ , функционирование которых связано с переходами между двумя конформационными состояниями фермента ( $E_1$  и  $E_2$ ), различающимися по своему сродству к АТФ и  $H^+$ . Активный центр располагается с внутренней стороны ПМ, выделяющаяся в ходе гидролиза АТФ энергия расходуется на перенос  $H^+$  через мембрану против электрохимического градиента.

На одну молекулу АТФ, в зависимости от условий, может, по видимому, переноситься как 1 так и 2 протона. Общая скорость переноса протонов составляет  $10^5$ - $10^6$   $H^+$  в секунду, а концентрация молекул фермента составляет около  $10^4$  на  $\mu\text{м}^2$ . Высокая концентрация и активность  $H^+$ -АТФазы обеспечивает высокий поток протонов и – в конечном итоге - значительную величину метаболической компоненты. Следует также отметить, что помимо высокого электрического градиента,  $H^+$ -АТФаза создает на ПМ значительный химический градиент протонов, который играет существенную роль во вторичном транспорте на мембране.

### ***Взаимодействие диффузионной и метаболической компонент ПП***

Существование двух компонент ПП с разной природой делает актуальным вопрос об их взаимодействии, которое является достаточно сложным процессом. Так, например, высокий электрический градиент на мембране, созданный за счет функционирования  $H^+$ -АТФазы (т.е. за счет метаболической компоненты) способствует поступлению в клетку ионов калия, тем самым повышая  $[K^+]_i$  и снижая  $[K^+]_o$ , т.е. увеличивая абсолютную величину  $E_p$ . С другой стороны, создаваемые протонной помпой градиенты  $H^+$  также могут путем симпорта или антипорта с потенциалобразующими ионами влиять на их распределение, а значит – менять диффузионную компоненту.

Однако, даже рассматривая только электрическое взаимодействие между активной и пассивной компонентами  $E_m$ , мы не можем принимать ПП как алгебраическую их сумму, так как вклады каждой из составляющих в итоговый потенциал могут быть различными. Попробуем их рассчитать.

На основе уравнений Ходжкина-Хаксли в модели потенциала действия в нерве, изменение  $E_m$  является функцией суммы токов, текущих через мембрану:

$$\frac{dE_m}{dt} = \frac{1}{c} \sum_j i_j, \quad (1.4)$$

где  $c$  – удельная емкость мембраны,  $i_j$  – токи, участвующие в ПД (обычно принимается, что это токи ионов натрия и калия; для растений целесообразно рассмотреть также токи ионов хлора).

Величина тока ( $i_j$ ) описывается уравнением (1.5):

$$i_j = g_j (E_j - E_m), \quad (1.5)$$

где  $g_j$  – удельная проводимость для иона  $j$ ,  $E_j$  – его равновесный потенциал, который рассчитывается по уравнению Нернста (для ионов калия это уравнение (1.3)).

Если представить протонную помпу как источник тока, то ток через  $H^+$ -АТФазу ( $i_{Pu}$ ) можно описать близким уравнением (1.6):

$$i_{Pu} = g_{Pu} (E_{Pu} - E_m), \quad (1.6)$$

где  $g_{Pu}$  – удельная проводимость протонной помпы,  $E_{Pu}$  – ее ЭДС:

$$E_{Pu} = \frac{\Delta G_{AT\Phi}}{nF} - \frac{RT}{F} \ln \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i}, \quad (1.7)$$

где  $\Delta G_{AT\Phi}$  – энергия гидролиза АТФ (~50 кДж/моль),  $n$  – число протонов, переносимых при гидролизе 1 АТФ (примем, что  $n=1$ ).

Подставив в (1.4) – (1.5) (для ионов натрия, калия и хлора) и (1.6) и приравняв (1.4) к 0 (условия стационарности значений –  $E_m$  не должно меняться) можно легко выразить  $E_m$ :

$$E_m = \frac{g_{Pu} E_{Pu} + g_K E_K + g_{Cl} E_{Cl} + g_{Na} E_{Na}}{g_{Pu} + g_K + g_{Cl} + g_{Na}}. \quad (1.8)$$

Уравнение (1.8) позволяет учесть вклад метаболической и диффузионной компонент в итоговый мембранный потенциал. Если записать его в несколько ином виде, то можно получить их в явной форме:

$$E_m = \frac{g_{Pu} E_{Pu}}{g_{Pu} + g_K + g_{Cl} + g_{Na}} + \frac{g_K E_K + g_{Cl} E_{Cl} + g_{Na} E_{Na}}{g_{Pu} + g_K + g_{Cl} + g_{Na}} = E_P' + E_D', \quad (1.9)$$

где  $E_P'$  и  $E_D'$  – величины метаболического и диффузионного потенциалов при одновременном наличии и того, и другого.

### ***Лабильность ПП у растений***

Одной из важных особенностей ПП у растений является его лабильность, т.е. способность к изменению величины под действием тех или иных внешних факторов, которая связана, прежде всего, со значительным вкладом в него активной компоненты, которая зависит от общей интенсивности метаболизма в клетке. Реализация такой связи может осуществляться за счет изменения энергизации клетки. Так, например, при интенсификации метаболических процессов может происходить следующая последовательность событий: возрастание интенсивности метаболических процессов → повышение содержания АТФ в клетке → активация  $H^+$ -АТФазы, за счет увеличения концентрации ее субстрата → увеличение метаболической компоненты ПП. Сходная, но противоположено направленная последовательность событий



будет происходить при снижении активности метаболических процессов. В то же время, отметим, что связь между метаболическими процессами и  $E_p$  может реализовываться и другими путями, в частности, вследствие изменения рН цитоплазмы, которое, с одной стороны, тесно связано с метаболизмом клетки, а с другой – модулирует активность  $H^+$ -АТФазы, так как протоны также являются ее субстратом.

Помимо изменений  $E_p$  опосредованных индуцированными действиями тех или иных факторов на метаболизм растительных клеток, возможна и ситуация в которой влияние внешнего фактора на ПП реализуется непосредственно путем воздействия на активность протонной помпы. Так, например, являясь ферментом,  $H^+$ -АТФаза очень чувствительна к изменениям температуры и претерпевает значительную инактивацию при ее снижении. Возможно, что действие температуры при этом опосредуется фазовыми переходами в липидном матриксе.

Определенную роль в обеспечении лабильности метаболической компоненты ПП могут играть и регуляторные системы, обеспечивающие регуляцию функционирования систем активного транспорта. Примером такой регуляции может служить инактивация  $H^+$ -АТФазы под действием ионов кальция.

Наконец, следует отметить, что связь между индуцированными внешними факторами изменениями метаболизма клетки и величиной ПП может, по-видимому, реализовываться и посредством модификации пассивной компоненты ПП. Так, например, показано, что содержание АТФ может существенно влиять на кинетику инактивации хлорных каналов. Фактором, влияющим на активность канала, может служить и рН. Таким образом, нельзя исключать, что определенный вклад в обеспечение лабильности ПП, может вносить и изменчивость  $E_D$ .

Рассмотрим в качестве примеров, показывающих лабильность ПП, влияние на него постепенного охлаждения и освещения (фотоэлектрическая реакция).

При охлаждении наблюдается постепенная деполяризация мембранного потенциала, вплоть до величин близких к значениям диффузионной компоненты ПП. Такая деполяризация может осложняться появлением потенциалов возбуждения. Через 10-20 мин после снижения ПП наблюдается частичное восстановление его исходной величины – адаптивная реполяризация. Отметим, что и деполяризация, и адаптивная реполяризация связаны, по-видимому, с изменениями активности  $H^+$ -АТФазы. При этом деполяризация обусловлена как прямой инактивацией фермента при охлаждении, так и снижением его активности при фазовом переходе мембранных липидов из жидкокристаллического в твердое состояние. Нельзя исключать также, что определенный вклад в постепенную деполяризацию ПП вносит и инактивация протонной помпы, вызванная повышением содержания  $Ca^{2+}$  в цитоплазме, так как известно, что механочувствительные кальциевые каналы могут быть активированы фазовыми переходами в липидном бислое. Механизмы адаптивной реполяризации менее изучены, однако весьма вероятной представля-

ется их связь с адаптивным увеличением доли ненасыщенных жирных кислот в липидах плазмалеммы и снижение температуры фазового перехода.

Другим примером лабильности ПП у растений может служить фотоэлектрическая реакция – изменения мембранного потенциала, имеющие в общем случае сложную колебательную кинетику, в которой иногда выделяют следующие фазы: 1-я позитивная волна → 2-я негативная волна → 3-я позитивная волна (при переходе темнота → свет) или 1-я негативная волна → 2-я позитивная волна → 3-я негативная волна (при переходе свет → темнота). В конечном итоге при переходе темнота → свет величина ПП возрастает, а при переходе свет → темнота – снижается. С использованием ингибиторов и различных диапазонов возбуждающего света было показано, что такие изменения связаны с фотосинтетическими процессами. Последнее делает весьма актуальным вопрос о путях реализации связи между индукционными процессами в фотосинтетическом аппарате и изменениями ПП.

Опираясь на современные представления об индукционных процессах в фотосинтетическом аппарате, можно предположить возможную последовательность событий, обеспечивающих переходные процессы при освещении листа: включение света → начало движения электронов по электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) и реактивация  $H^+$ -АТФ-синтазы, которая инактивируется в темноте → перенос протонов из стромы в люмен (за счет функционирования ЭТЦ) и гидролиз стромальной АТФ  $H^+$ -АТФ-синтазой, которая до формирования достаточного электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране может функционировать как АТФаза → снижение  $[H^+]$  и  $[АТФ]$  в строме, а затем и в цитоплазме → снижение активности  $H^+$ -АТФазы → деполяризация ПП (формирование 1-й позитивной волны) → рост электрохимического градиента на тилакоидной мембране → переход  $H^+$ -АТФ-синтазы к синтетазной активности → повышение содержания АТФ в строме и цитоплазме → активация  $H^+$ -АТФазы → реполяризация ПП (формирование 2-й негативной волны) → реактивация цикла Кальвина, который инактивируется в темноте → увеличение потребления АТФ → снижение концентрации АТФ в строме и цитоплазме → деполяризация ПП (формирование 3-й позитивной волны). Качественно похожая, но реализующаяся в противоположенном направлении, последовательность событий, вероятно, имеет место и при обратном переходе: свет → темнота.

### ***Функциональная роль ПП***

Функциональная роль ПП достаточно многообразна, так можно отметить энергетическую, регуляторную, защитную и другие его функции.

Роль ПП как энергетического фактора заключается в том, что электрическая форма энергии может расходоваться на протекание тех или иных связанных с мембраной процессов, в первую очередь – транспортных. Так, в частности, показано, трансмембранный электрический потенциал может служить движущей силой для функционирования ряда систем вторичного активного транспорта (например, переносчика сахарозы в ПМ), при функционировании которых происходит некомпенсированный перенос ионов или пе-

ренос ионов и нейтрального вещества (электрогенные транспортные системы).

Регуляторная роль ПП связана с их участием в регуляции активности мембраносвязанных ферментов. Такое участие может реализовываться двумя путями – через влияние ПП непосредственно на ферменты и через их влияние на липидный матрикс ПМ. В качестве примера первого можно привести влияние ПП на активность ионных каналов, так деполяризация, в частности, может активировать потенциалзависимые кальциевые, хлорные и Д-калиевые каналы, гиперполяризация – Г-калиевые каналы. Предполагается, что такое влияние реализуется через специальный белковый сенсор, связанный с воротными механизмами. Влияние ПП на липидный матрикс обусловлено, по видимому, с их влиянием на структуры мембраны – это возрастание микровязкости при увеличении  $E_m$ , электрострикция (сжатие мембраны под действием градиента электрических потенциалов на ней) и др. Считается, что такие изменения также могут влиять на активность мембранных ферментов, например, механочувствительных ионных каналов.

Защитная роль ПП тесно связана с его лабильностью, так считается, что быстрая деполяризация мембранного потенциала при действии широкого спектра стресс-факторов связана с необходимостью понизить активность обменных процессов, а, значит, и интенсивность метаболизма в целом. Последнее, исходя из общих подходов к надежности сложных систем, должно повысить их устойчивость к повреждению (активно функционирующие элементы повреждаются в большей степени). С другой стороны, учитывая большую энергозатратность транспортных процессов на ПМ, такое снижение их интенсивности приведет к снижению затрат энергии; возникающий при этом избыток макроэргических соединений может быть использована в адаптационном процессе.

Следует отметить, что существуют и другие функции ПП. Так, например, различия в величине ПП в различных участках растительных организмов создают разность потенциалов, которая может играть свою роль в транспорте фитогормонов (ауксина) и регулировать процессы морфогенеза в растении.

### ***Общие требования к аппаратуре для регистрации биоэлектрических потенциалов у растений***

Стандартная система для электрофизиологических измерений включает в себя три части – электроды, усилитель и регистрирующее устройство.

Электроды непосредственно регистрируют значения разности потенциалов. В зависимости от типа отведения используют микро- и макроэлектроды. Микроэлектроды используются для внутриклеточной регистрации, вследствие чего диаметр их кончика не должен превышать 1 мкм, что позволяет вводить их в клетку без существенного повреждения ПМ. Макроэлектроды используются для внеклеточного, часто – поверхностного, отведения, поэтому жестких требований к их диаметру нет. И микро-, и макроэлектроды

не должны поляризоваться при работе, что требует использования специальных неполяризуемых электродов, например, хлорсеребряных.

Общим требованием к усилителю является возможность работы в милливольтовом диапазоне и высокое (порядка  $10^8$ - $10^9$  Ом и выше) входное сопротивление, так как оно, учитывая значительное сопротивление биообъектов ( $10^6$ - $10^7$  Ом), позволяет избежать шунтирования при измерении сигнала. Кроме того, для измерения быстрых реакций, большое значение может иметь постоянная времени усилителя.

Регистрирующее устройство преобразует сигнал с усилителя в ту или иную приемлемую для анализа форму, в этом качестве в настоящее время обычно используется ПК, сигнал на который подается через аналого-цифрового преобразователь.

### ***Лабораторная работа №1. Изучение потенциала покоя изолированных растительных клеток (харовых водорослей)***

Клетки водорослей имеют цилиндрическую форму и связаны друг с другом через плазмодесмы. В длину они достигают нескольких сантиметров, в диаметре – 0.5-0.7 мм. Сверху клетки покрыты плотной целлюлозной оболочкой, под которой располагается возбудимая ПМ. Центральную часть клетки занимает вакуоль (около 2/3 общего объема), окруженная тонопластом. Между тонопластом и ПМ находится слой цитоплазмы.

Значительные размеры клеток харовых водорослей делают их удобным объектом как для исследования биоэлектрических потенциалов, с использованием как микро-, так и макроэлектродов. Важной особенностью харовых водорослей является возможность использования макроэлектродов для прямого измерения ПП на ПМ.

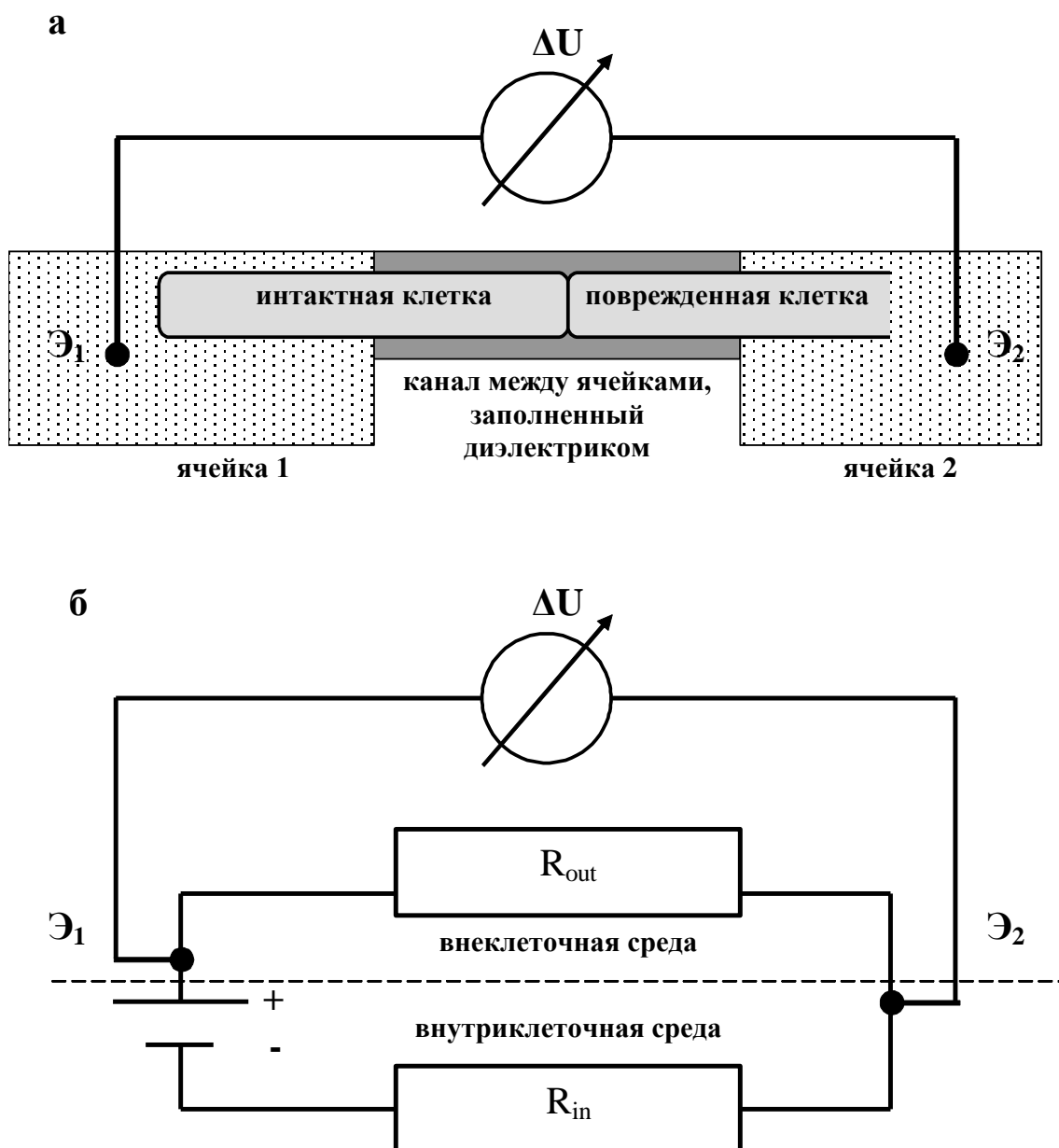
Схема такой регистрации приведена на рис 1.1 (Рис. 1.1а). При этом один из макроэлектродов контактирует с раствором, омывающим интактную клетку харовой водоросли (ячейка 1), т.е. регистрирует значение ее поверхностного потенциала. Второй электрод контактирует с раствором, омывающим клетку с нарушенной ПМ (ячейка 2), т.е. регистрирует значение потенциала внутри клетки. Учитывая тот факт, что клетки харовой водоросли соединены между собой плазмодесмами, разность потенциалом между электродами может быть описана формулой (1.11):

$$\Delta U = E_m \frac{R_{out}}{R_{in} + R_{out}} = E_m \frac{1}{1 + R_{in}/R_{out}}, \quad (1.10)$$

где  $\Delta U$  – регистрируемая разность электрических потенциалов,  $R_{out}$  – сопротивление внешней среды,  $R_{in}$  – сопротивление внутренней среды клеток (Рис. 1.1б). При  $R_{out} \gg R_{in}$ , выражение (1.10) трансформируется в (1.11)

$$\Delta U \approx E_m, \quad (1.11)$$

т.е. разность потенциалов, регистрируемая макроэлектродами, будет в этом случае приблизительно равной ПП. Для того чтобы увеличить  $R_{out}$ ,



**Рис. 1.1. Схема регистрация ПП у харовой водоросли (а) и эквивалентная схема растения при такой регистрации (б)**  
 $\Delta U$  – регистрируемая разность потенциалов,  $\mathcal{E}_1$  и  $\mathcal{E}_2$  – макроэлектроды,  $R_{in}$  и  $R_{out}$  – сопротивление внутриклеточной и внеклеточной среды, соответственно

необходимо изолировать содержащиеся в различных ячейках растворы, например, заполнив соединяющий ячейки канала диэлектриком (вазелин, ланолин и др.).

### **Экспериментальная часть**

**Оборудование и материалы:** харовая водоросль, макроэлектроды, усилитель биопотенциалов, компьютер, камера для измерения ПП, колбы, шприцы, стандартный раствор (1мМ KCl, 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ NaCl), хлориды натрия и калия, азид натрия (NaN<sub>3</sub>), вазелин.

#### **Задание 1. Исследование влияния различных концентраций ионов калия на потенциал покоя клеток харовой водоросли**

1. Подготовить по 10 мл 0.1, 1, 10 и 100 мМ растворов хлорида калия.
2. Предварительно заполнив канал между ячейками камеры вазелином, поместить в камеру участок харовой водоросли таким образом, чтобы одна из клеток находилась в ячейке 1, а другая – в ячейке 2.
3. Заполнить ячейку 1 стандартным раствором, а ячейку 2 – 100 мМ.
4. Разрезать клетку в ячейке 2 и подвергнуть растение часовой адаптации.
5. Откачать стандартный раствор из ячейки 1, дважды отмыть клетку дистиллированной водой и заполнить ячейку 0.1 мМ KCl.
6. Начать регистрацию ПП, продолжать ее до стабилизации значений потенциала на некотором стационарном уровне.
7. Последовательно увеличивать концентрацию KCl в ячейке 1, заменяя 0.1 мМ раствор KCl на 1, 10 и 100 мМ. После каждой замены продолжать запись до стабилизации значений ПП.
8. Построить график зависимости ПП от концентрации KCl в ячейке 1. Приняв, что ПП зависит только от пассивного калиевого и активного протонного токов на основе формулы (1.8) получить формулу для расчета  $g_K/g_{Pu}$  на основе изменения  $\Delta U$  при смене концентрации KCl в ячейке 1. Рассчитать отношение  $g_K/g_{Pu}$  для каждого изменения концентрации калия (0.1 мМ KCl → 1 мМ KCl, 1 мМ KCl → 10 мМ KCl, 10 мМ KCl → 100 мМ KCl). Определить будет ли отношение проводимостей зависеть от концентрации калия, построить график зависимости  $g_K/g_{Pu}$  от концентрации ионов калия.
9. Объяснить полученные результаты. Сделать выводы.

#### **Задание 2. Исследование влияния различных концентраций ионов натрия на потенциал покоя клеток харовой водоросли**

1. Подготовить по 10 мл 0.1, 1, 10 и 100 мМ растворов хлорида натрия.
2. Отмыть клетку в ячейке 1 дистиллированной водой и заполнить ячейку 0.1 мМ NaCl.
3. Начать регистрацию ПП, продолжать ее до стабилизации значений потенциала на некотором стационарном уровне.

4. Последовательно увеличивать концентрацию NaCl в ячейке 1, заменяя 0.1 мМ раствор NaCl на 1, 10 и 100 мМ. После каждой замены продолжать запись до стабилизации значений ПП.

5. Построить график зависимости ПП от концентрации NaCl в ячейке 1.

6. Сравнить величину изменений ПП при изменении концентрации хлорида натрия с изменением потенциала при повышении концентрации хлорида калия.

7. Объяснить полученные результаты. Сделать выводы.

### ***Задание 3. Исследование влияния ингибитора метаболизма – азидата натрия на потенциал покоя клеток харовой водоросли***

1. Подготовить 10 мл 2 мМ раствора азидата натрия в стандартном растворе.

2. Отмыть клетку в ячейке 1 дистиллированной водой и заполнить ячейку стандартным раствором

3. Начать регистрацию ПП, продолжать ее до стабилизации значений потенциала на некотором стационарном уровне.

4. Заполнить ячейку раствором азидата натрия. Записать изменения ПП вплоть до его стабилизации на новом уровне.

5. Как описано в заданиях 1 и 2 построить зависимость ПП от концентрации ионов калия и натрия в условиях подавленного метаболизма и, как следствия, неактивной H<sup>+</sup>-АТФазы. Сравнить с аналогичными зависимостями для интактных клеток.

6. Объяснить полученные результаты. Сделать выводы.

### ***Лабораторная работа №2. Исследование биоэлектрических потенциалов высших растений методом экстраклеточной регистрации***

Метод экстраклеточной регистрации широко используется при изучении процессов биоэлектrogenеза у высших растений. Он позволяет определить разность поверхностных потенциалов между двумя участками растения, которая может быть обусловлена различной интенсивностью метаболизма, различным состоянием ПМ клеток в исследуемых зонах и т.д. Отметим, что определение разности поверхностных потенциалов представляет интерес в первую очередь потому, что такие потенциалы тесно связаны с ПП плазматической мембраны растительных клеток

Перейти от разности поверхностных потенциалов к разности ПП в пределах одной клетки можно, используя формулу (1.12):

$$\Delta U = (E_m^1 - E_m^2) \frac{r_{in}}{r_{in} + r_{out}}, \quad (1.12)$$

где  $E_m^1$  и  $E_m^2$  – ПП на участках 1 и 2,  $r_{in}$  и  $r_{out}$  – сопротивление на единицу длины для внутри- и внеклеточной среды. В случае одной клетки  $r_{in}$  будет равняться сопротивлению цитоплазмы ( $r_{Cyt}$ ).

Однако, размеры клеток высших растений достаточно малы, поэтому одновременное измерение потенциала на различных участках одной и той же

клетки достаточно сложно и не всегда целесообразно. В то же время, учитывая тот факт, что растительные клетки объединены в единую проводящую систему – симпласт, связь между разностью поверхностных потенциалов на различных участках растения и разностью ПП может быть найдена не только в пределах одной клетки, но и для ткани (симпласта) в целом. Для этого в уравнении (1.12) необходимо учесть, что  $r_{in} = r_{cyt} + r_{pl}$ , где  $r_{pl}$  – сопротивление на единицу длины для плазмодесм.

Следует отметить, что метод экстраклеточного отведения не позволяет прямо исследовать величину ПП на ПМ клеток высших растений. Однако, если один из электродов (электрод сравнения) находится на участке растения с постоянным ПП, например, на корне, то этот метод может быть использован для изучения зависимости ПП от действия различных факторов – содержания ионов во внешней среде, обработки ингибиторами  $H^+$ -АТФазы и блокаторами ионных каналов, освещенности и т.д.

### **Экспериментальная часть**

**Оборудование и материалы:** проростки тыквы, макроэлектроды, усилитель биопотенциалов, компьютер, подставка для растения, колбы, шприцы, стандартный раствор (1мМ KCl, 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ NaCl), хлориды натрия и калия, азид натрия (NaN<sub>3</sub>), вазелин.

#### ***Задание 1. Исследование влияния различных концентраций ионов калия на потенциал покоя проростков тыквы***

1. Подготовить по 10 мл 0.1, 1, 10 и 100 мМ растворов хлорида калия.
2. Очистить участок проростка тыквы от эпидермиса. Поместить его в ячейку подставки, замазав пазы ячейки вазелином. Корень поместить в чашку Петри заполненную стандартным раствором.
3. Заполнить ячейку 0.1 мМ KCl. Привести измерительный электрод в контакт с содержимым ячейки, а электрод сравнения – со стандартным раствором в чашке Петри.
4. Начать регистрацию ПП, продолжать ее до стабилизации значений потенциала на некотором стационарном уровне.
5. Последовательно увеличивать концентрацию KCl в ячейке, заменяя 0.1 мМ раствор KCl на 1, 10 и 100 мМ. После каждой замены продолжать запись до стабилизации значений ПП.
6. Построить график зависимости ПП от концентрации KCl в ячейке. Приняв, что ПП зависит только от пассивного калиевого и активного протонного токов на основе формулы (1.8) получить формулу для расчета  $g_K/g_{Pu}$  на основе изменения  $\Delta U$  при смене концентрации KCl в ячейке. Рассчитать отношение  $g_K/g_{Pu}$  для каждого изменения концентрации калия (0.1 мМ KCl → 1 мМ KCl, 1 мМ KCl → 10 мМ KCl, 10 мМ KCl → 100 мМ KCl). Определить будет ли отношение проводимостей зависеть от концентрации калия, построить график зависимости  $g_K/g_{Pu}$  от концентрации ионов калия.
7. Объяснить полученные результаты. Сделать выводы.



***Задание 2. Исследование влияния различных концентраций ионов натрия на потенциал покоя клеток харовой водоросли***

1. Подготовить по 10 мл 0.1, 1, 10 и 100 мМ растворов хлорида натрия.
2. Отмыть гипокотиль в ячейке дистиллированной водой и заполнить ячейку 0.1 мМ NaCl.
3. Начать регистрацию ПП, продолжать ее до стабилизации значений потенциала на некотором стационарном уровне.
4. Последовательно увеличивать концентрацию NaCl в ячейке, заменяя 0.1 мМ раствор NaCl на 1, 10 и 100 мМ. После каждой замены продолжать запись до стабилизации значений ПП.
5. Построить график зависимости ПП от концентрации NaCl в ячейке.
6. Сравнить величину изменений ПП при изменении концентрации хлорида натрия с изменением потенциала при повышении концентрации хлорида калия.
7. Объяснить полученные результаты. Сделать выводы.

***Задание 3. Исследование влияния ингибитора метаболизма – азида натрия на потенциал покоя клеток харовой водоросли***

1. Подготовить 10 мл 2 мМ раствора азида натрия в стандартном растворе.
2. Отмыть гипокотиль в ячейке дистиллированной водой и заполнить ячейку стандартным раствором
3. Начать регистрацию ПП, продолжать ее до стабилизации значений потенциала на некотором стационарном уровне.
4. Заполнить ячейку раствором азида натрия. Записать изменения ПП вплоть до его стабилизации на новом уровне.
5. Как описано в заданиях 1 и 2 построить зависимость ПП от концентрации ионов калия и натрия в условиях подавленного метаболизма и, как следствия, неактивной  $H^+$ -АТФазы. Сравнить с аналогичными зависимостями для интактных клеток.
6. Объяснить полученные результаты. Сделать выводы.

***Лабораторная работа №3. Изучение фотоэлектрической реакции растений***

Одним из ярких примеров высокой лабильности ПП у высших растений является фотоэлектрическая реакция (ФЭР), которая представляет собой колебательные изменения потенциала плазматической мембраны, развивающиеся у фотосинтезирующих тканей растения при переходах от темноты к освещению (ТС-реакция) и от освещения к темноте (СТ-реакция) (Рис. 1.2).

Изучение особенностей ФЭР показало, что величина фотоиндуцированной реакции, а также последовательность и выраженность различных фаз ответа зависят от интенсивности и спектра возбуждающего света. На основании сравнительного анализа ФЭР, возникающих при действии

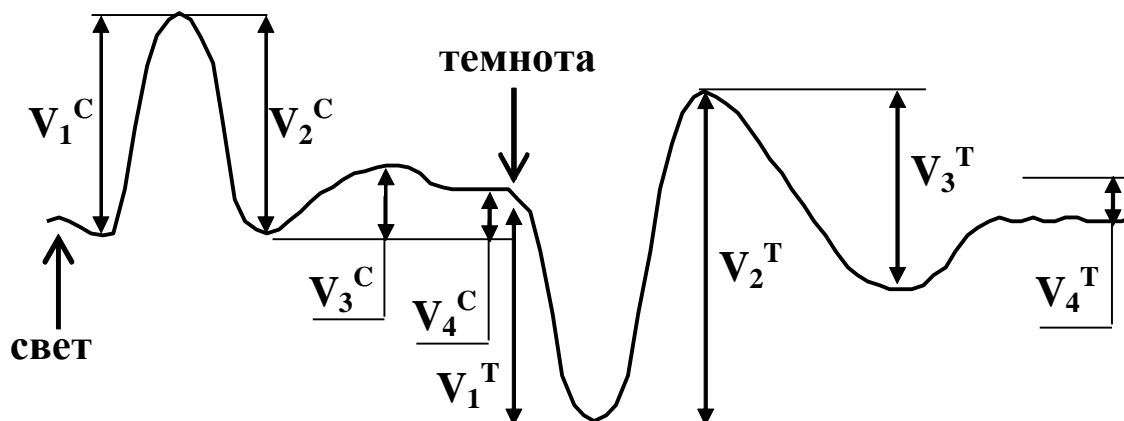


Рис. 1.2. Типичная форма ФЭР, возникающих при освещении (ТС-реакция) и затемнении (СТ-реакция) листа

$V_1^C$  – амплитуда первой, положительной волны ТС-реакции,  $V_2^C$  – амплитуда второй, отрицательной волны ТС-реакции,  $V_3^C$  – амплитуда третьей положительной волны ТС-реакции,  $V_4^C$  – разность потенциалов темного и светового стационарных состояний,  $V_1^T$  – амплитуда первой, отрицательной волны СТ-реакции,  $V_2^T$  – амплитуда второй, положительной волны СТ-реакции,  $V_3^T$  – амплитуда третьей, отрицательной волны СТ-реакции,  $V_4^T$  – разность потенциалов светового и темного стационарных состояний

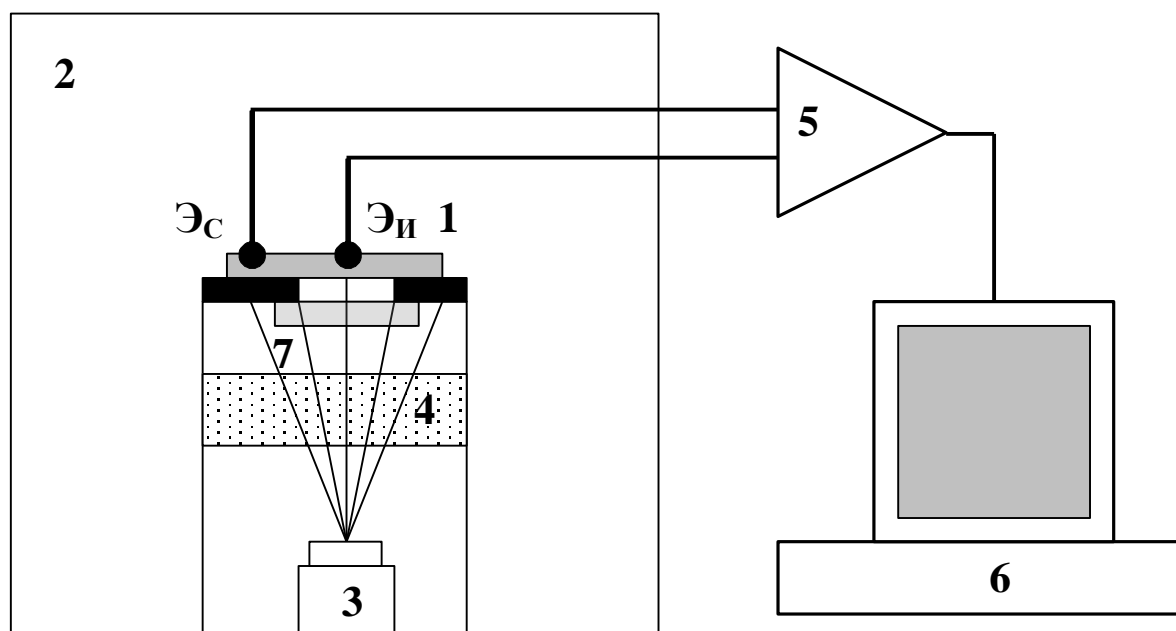


Рис. 1.3. Схема установки для регистрации ФЭР

1 – объект, 2 – затемненная камера, 3 – источник света, 4 – водяной фильтр, 5 – усилитель, 6 – компьютер, 7 – светофильтр, Эи и Эс – измерительный электрод и электрод сравнения, соответственно.

возбуждающего света различной длины волны, возникла гипотеза, связывающая развитие ФЭР с переходными процессами в фотосинтетическом аппарате. Гипотезу о связи ФЭР с фотосинтезом подтверждает также отсутствие фотоэлектрических реакций в этиолированных растениях и подавление их развития при действии ингибиторов фотосинтеза. В то же время, существуют данные о возможности прямого влияния освещения на активность некоторых хлорных и кальциевых ионных каналов, это позволяет предположить, что не связанные с фотосинтезом процессы могут вносить свой вклад в развитие ФЭР. Связь между ПП и процессами в фотосинтетическом аппарате, по-видимому, реализуется через модуляцию активности  $H^+$ -АТФазы, которая в свою очередь может быть обусловлена изменениями концентраций  $H^+$  и АТФ в цитоплазме (возможный механизм такой связи более подробно описан в начале главы 1). Ключевая роль  $H^+$ -АТФазы подтверждается ингибиторным анализом, в частности, подавлением развития ФЭР при ингибировании протонной помпы.

Для регистрации ФЭР обычно используют метод экстраклеточного отведения, когда один из электродов располагается на затемненном участке растения или участке с постоянным уровнем освещения (электрод сравнения), а второй – на участке, интенсивность освещения которого меняется (измерительный электрод) (Рис. 1.3). При исследовании ФЭР необходимо исключить влияние на объект других факторов, в частности нагрева, который также может модулировать активность  $H^+$ -АТФазы и, как следствие, ПП, поэтому освещение объекта обычно осуществляется через водяной фильтр, поглощающий тепло, но не свет.

## **Экспериментальная часть**

**Оборудование и материалы:** лист герани, макроэлектроды, усилитель биопотенциалов, компьютер, осветитель для микроскопа, водяной фильтр, светофильтры

### **Задание 1. Исследование особенностей ФЭР, индуцированных освещением разной длины волны**

1. Отделить лист герани, после часовой адаптации поместить его в затемненную камеру, выставив белый светофильтр. Привести лист в контакт с электродами, как показано на рис. 1.3.

2. После 18 мин затемнения начать запись биопотенциалов, еще через 2 минуты включить освещение.

3. Записать ФЭР (ТС-реакция), после стабилизации значений потенциала, выключить освещение и записать ФЭР (СТ-реакция) до стабилизации величины потенциала.

4. Поставить красный светофильтр и после 20-минутного затемнения записать ТС- и СТ-реакции с красным светофильтром.

5. Поставить зеленый светофильтр и после 20-минутного затемнения записать ТС- и СТ-реакции с зеленым светофильтром.

6. Построить графики зависимости потенциала от времени для всех зарегистрированных реакций.

7. Сделать выводы.

#### ***Лабораторная работа №4. Внутриклеточная регистрация потенциалов покоя клеток растения***

Внутриклеточная регистрация биоэлектрической активности с использованием микроэлектродов является одним из методов прямой регистрации ПП и потенциалов возбуждения в клетках растений. Общий принцип метода заключается во введении в клетку микроэлектрода, который служит измерительным электродом. В качестве электрода сравнения может быть использован обычный хлорсеребряный макроэлектрод, контактирующий с внешней по отношению к клетке средой.

Микроэлектрод представляет собой микропипетку, с кончиком малого диаметра, заполненную раствором электролита. При введении микропипетки, ее кончик прокалывает ПМ и клеточную стенку. В зоне прокола мембрана «залипает» вокруг стекла, образуя высокоомный контакт, поэтому замыкания внутриклеточной и внеклеточной среды, как правило, не происходит. Тем не менее, с увеличением повреждения биомембраны при введении микроэлектрода повышается вероятность шунтирования электрического потенциала клетки. С этой точки зрения, чем более тонким будет проникающий в клетку кончик микроэлектрода, тем меньшему повреждению подвергнется биомембрана. В то же время, слишком тонкий кончик микроэлектрода не сможет проткнуть клеточную стенку, поэтому диаметр кончика микроэлектрода составляет обычно 0.5-5 мкм. При исследовании клеток больших размеров с толстыми клеточными стенками (например, клеток харовых водорослей) целесообразно использовать микроэлектроды с большим диаметром кончика. При исследовании клеток малого размера (например, паренхимных клеток проводящих пучков высших растений) оптимальным является использование микроэлектродов с малым диаметром.

Еще одним, более надежным способом избежать шунтирования клетки является использования метода “patch-clamp”, который представляет собой модификацию микроэлектродного метода. При его использовании создается гигаомный контакт между микропипеткой и мембраной.

В целом, следует отметить, что микроэлектродная регистрация является достаточно эффективным методом исследования биоэлектrogenеза у растений. Основным ее недостатком является значительная сложность микроэлектродных измерений.

#### **Экспериментальная часть**

***Оборудование и материалы:*** харовая водоросль, проростки тыквы, трубки из стекла «пирекс» диаметром 1.2-1.6 мм, микроузнайка МЭ-4, электролит для заполнения – 3 М КСl, этанол, раствор азиды натрия ( $\text{NaN}_3$ ),

*микроскоп «Биолам» с 225-кратным увеличением, прибор «Микроэлус» для определения сопротивления электрода и потенциала кончика, микроманипулятор КМ-2 или ММ-1, держатель микропипетки, камера для объекта, бинокулярная лупа МБС-1, четырехканальный дифференциальный усилитель биосигналов DL314, система сбора данных NBL140P-4J, ПК*

**Задание 1. Изготовление стеклянных микроэлектродов для внутриклеточной регистрации биоэлектрической активности**

1. Изучить принцип работы микрокузницы МЭ-4 и при разных режимах нагрева, спирали времени разрыва и других параметрах работы прибора изготовить несколько вариантов стеклянных микропипеток из трубок-заготовок.

2. С помощью микроскопа «Биолам» осуществить визуальный контроль крутизны и диаметра кончика изготовленных микропипеток. Подобрать такой режим работы микрокузницы, при котором микропипетки имеют оптимальную крутизну (конусность 1:8, 1:10) и диаметр кончика в пределах 1-5 мкм для регистрации потенциалов у клеток харовой водоросли и не более 1 мкм для регистрации потенциалов у клеток проростков тыквы.

3. Заполнить микропипетки с внутренней капиллярностью 3 М КСl под вакуумом. Микропипетки без внутренней капиллярности заполнить под вакуумом этиловым спиртом, а затем этиловый спирт замещается раствором 3 М КСl. В последнем случае общая длительность заполнения составляет 12 ч.

4. Проверить потенциал кончика и сопротивление микроэлектродов с помощью прибора «Микроэлус». Потенциал кончика не должен превышать 10 мВ, а сопротивление – оставаться в пределах 5 – 20 МОм.

**Задание 2. Регистрация ПП у клеток харовой водоросли**

1. Взять водоросль пинцетом и с внешней стороны около междоузлий вырезать намеченную клетку.

2. Аккуратно перенести клетку в специальную камеру, закрепленную на предметном столике микроскопа.

3. Вставить микропипетки в держатель и с помощью микроманипулятора осторожно подвести электрод к прорези в камере.

4. Осуществить прокол клеточной оболочки и мембраны.

5. Оценить успешность введения микроэлектрода по скачку потенциала после введения: если такой скачок составил более 100 мВ и потенциал стабилизируется во времени, введение микроэлектрода в клетку можно считать успешным.

6. Определить величину ПП.

7. Исследовать лабильность ПП у растений, путем облучения клетки харовой водоросли светом и индукции фотоэлектрической реакции (ФЭР), записать фотоиндуцированные изменения ПП.

8. Исследовать особенности фотоэлектрической реакции харовой водоросли при различной темновой адаптации предшествующей освещению.

9. Сделать выводы.

### **Задание 3. Регистрация ПП у клеток высшего растения**

1. Укрепить стебель проростка в плексигласовой кювете на поверхности термоохлаждающего столика. Заполнить кювету стандартным раствором (1 мМ КСl, 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ NaCl).

2. Ввести микроэлектрод (диаметр кончика не более 1 мкм) в клетку эпидермиса с помощью механического микроманипулятора при визуальном наблюдении с помощью микроскопа «Биолам».

3. Оценить успешность введения микроэлектрода: по быстрому выходу мембранного потенциала на уровень до -130 мВ и выше и его стабилизации.

4. Определить величину ПП.

5. Через 10-15 мин стабильной регистрации ПП подвергнуть проросток постепенному охлаждению (1.5°С/мин) от 20-22°С до 5-6°С. После снижения ПП до более низкого уровня определить величину чувствительной к охлаждению компоненты потенциала.

6. Восстановить температуру в кювете до исходного уровня. Контроль температуры осуществить с помощью контактирующего с раствором в кювете миниатюрного термистора.

7. Ввести в содержащийся в кювете раствор NaN<sub>3</sub>, доведя его конечную концентрацию до 2 мМ.

8. Записать динамику снижения ПП. Найти величину компоненты ПП, чувствительной к действию азидата натрия.

9. Сравнить ее величину с величиной компоненты, чувствительной к охлаждению. Определить величину метаболической компоненты в ПП.

10. Рассчитать величину диффузионной компоненты.

11. Сделать выводы.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Особенности ПП у растений. Компоненты ПП.

2. Диффузионная компонента ПП у растительных клеток. Уравнение Нернста. Уравнение Гольдмана. Роль ионных каналов в формировании диффузионной компоненты ПП.

3. Метаболическая компонента ПП. Роль Н<sup>+</sup>-АТФазы.

4. Взаимодействие диффузионной и метаболической компонент. Уравнения, описывающие обе компоненты ПП.

5. Связь лабильности ПП с Н<sup>+</sup>-АТФазой. Изменения мембранного потенциала при постепенном охлаждении.

6. Фотоэлектрическая реакция. Ее механизмы

7. Функциональная роль ПП.

8. Особенности харовых водорослей как объекта для изучения биоэлектrogenеза.

9. Использование макроэлектродного отведения для регистрации ПП у клеток харовых водорослей.

10. Регистрации ПП у высших растений методом эстраклеточного отведения.

11. Особенности микроэлектродного отведения биопотенциалов у растений.

## ***ГЛАВА 2. ПОТЕНЦИАЛЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ У РАСТЕНИЙ***

Потенциалы возбуждения представлены у растений двумя типами электрических сигналов – потенциалом действия (ПД) и вариабельным потенциалом (ВП), которые различаются по ряду параметров. Кроме того, к потенциалам возбуждения могут быть отнесены и так называемые местные биоэлектрические реакции (МБЭР), которые возникают в зоне раздражения, приближаются по ряду характеристик к ПД, но не распространяются.

### ***Потенциал действия***

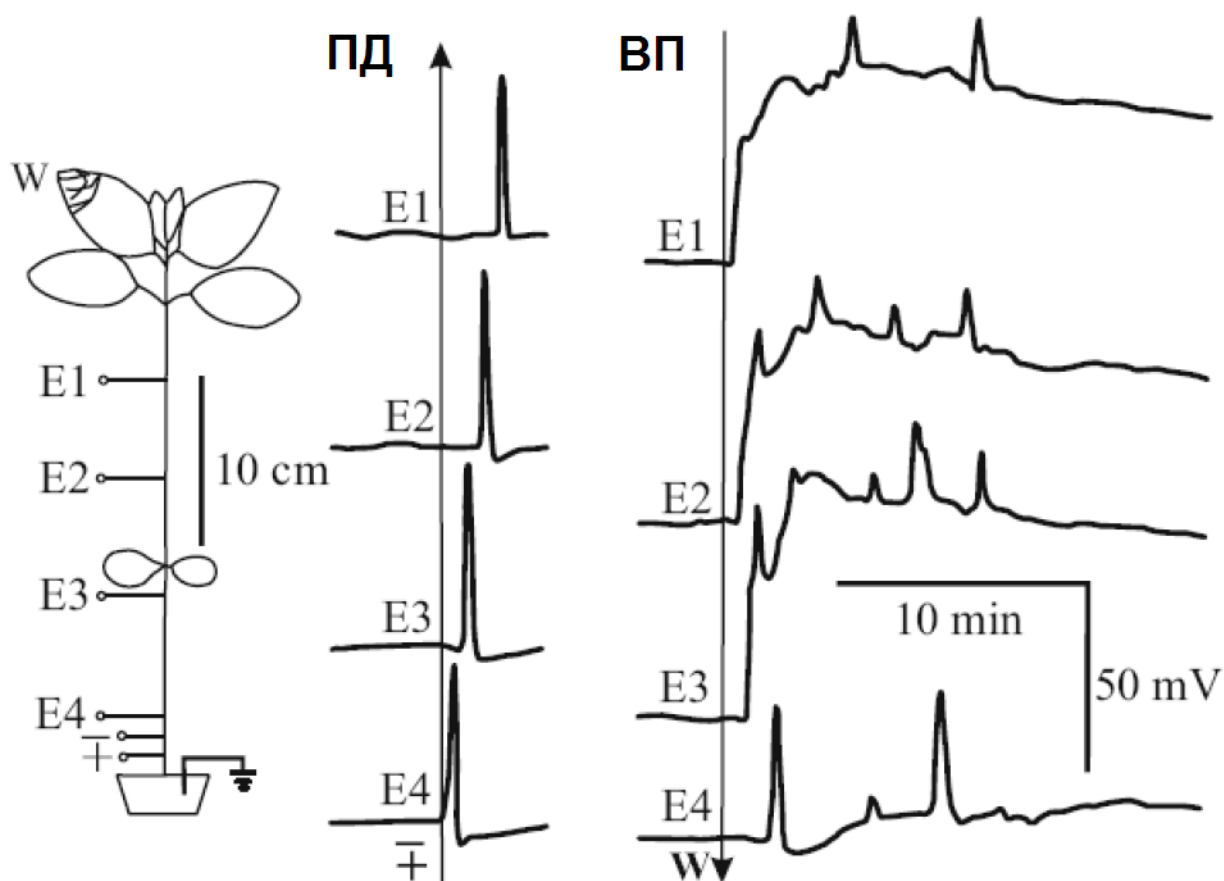
Потенциалы действия у растений представляют собой импульсную, распространяющуюся электрическую реакцию (Рис. 2.1), возникающую в ответ на действие неповреждающих раздражителей, таких как импульсное и постепенное охлаждение, механическое воздействие, действие раствора КСl на корни или участок стебля без эпидермиса и др.

Можно отметить следующие особенности ПД у растений, отличающие их от ПД, развивающихся в возбудимых клетках животных:

- большая продолжительность, которая варьирует от десятых долей секунды (локомоторные растения) до десятков секунд (нелокомоторные) и длительный (от десятков минут до часов) период рефрактерности.
- отсутствие овершута у большинства генерирующих ПД растений, максимум потенциала действия у которых лежит в области -60 – -40 мВ.
- сложная форма фазы реполяризации, включающая две компоненты.
- низкая скорость распространения, которая лежит в пределах от мм/с у нелокомоторных до десятков см/с у локомоторных.
- в стимулируемом участке могут формироваться серии импульсов, но распространяется при этом лишь одиночный ПД.

Можно полагать, что такие различия в характеристиках ПД у растений и у животных отражают существенные отличия в механизмах их генерации.

Наиболее изученными являются механизмы развития ПД у харовых водорослей. Так показано, что начальная деполяризация, вызванная действием раздражителей при генерации или местными токами при распространении, активирует потенциалзависимые кальциевые каналы и индуцирует тем самым вход ионов кальция в клетку, который происходит под действием направленного внутрь клетки электрохимического потенциала для ионов кальция. Повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в клетке активирует  $Ca^{2+}$ -чувствительные хлорные каналы, являющиеся также потенциалзависимыми. Электрохимический градиент для ионов хлора направлен наружу, что приводит к выходу  $Cl^-$  из клетки и развитию фазы деполяризации ПД. Далее происходит закрытие кальциевых каналов, что приводит к снижению концентрации  $Ca^{2+}$  в клетке и началу реполяризации.



**Рис. 2.1. Потенциал действия и переменный потенциал, зарегистрированные в стебле подсолнечника (Trebacz et al., 2006)**

исходному уровню, понижая тем самым проницаемость хлорных каналов. Снижение выхода хлора наряду с развивающейся одновременно потенциал-зависимой активацией Д-калиевых каналов и выходом ионов калия приводит к развитию фазы реполяризации и восстановлению исходных значений мембранного потенциала.

Таким образом, общие механизмы генерации ПД у харовых водорослей близки к аналогичным в нервных клетках, за исключением регуляторной роли ионов кальция и участия ионов хлора в качестве основного деполяризующего агента. В то же время, у водорослей рода *Acetabularia*, в плазмалемме которых присутствует Cl<sup>-</sup>-АТФаза, закачивающая ионы хлора, известен другой механизм формирования ПД: начальная инактивация транспорта Cl<sup>-</sup>, приводящая к развитию фазы деполяризации, и последующая его реактивация, вызывающая реполяризацию.

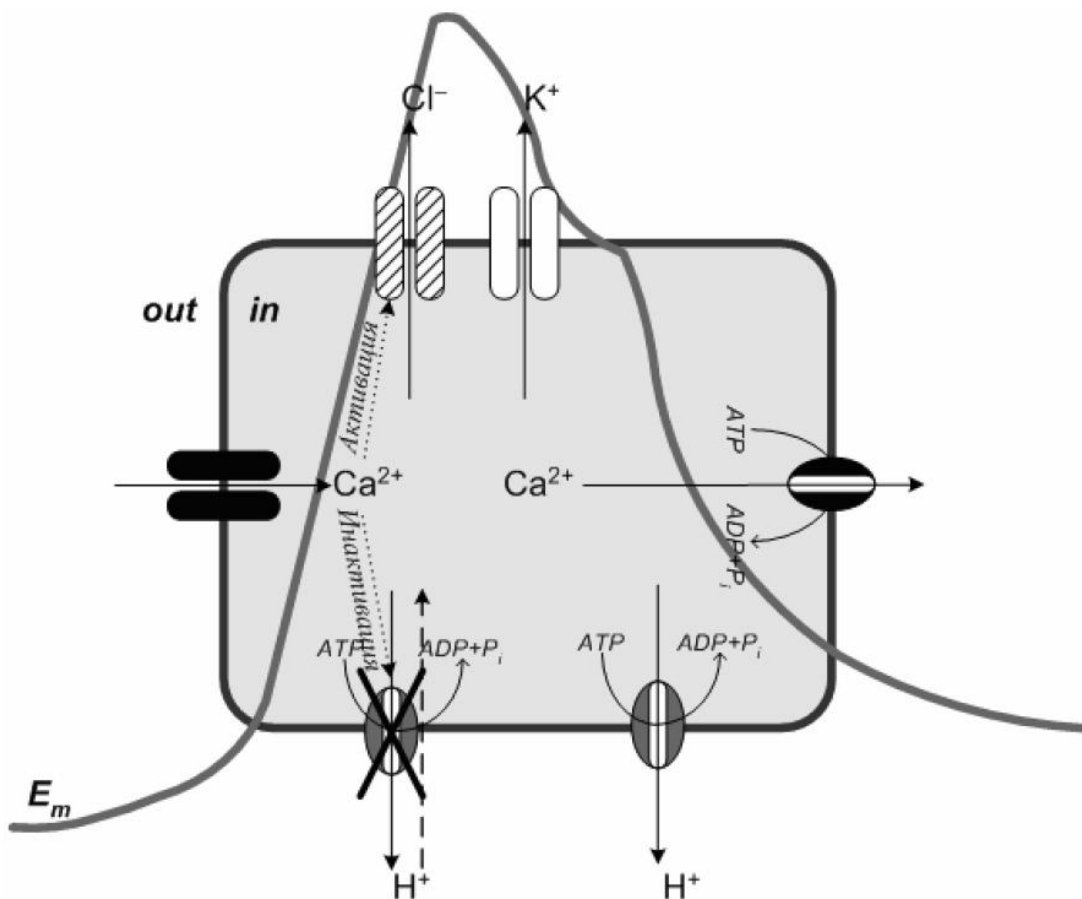
Механизмы генерации ПД у высших растений являются по-видимому более комплексными. С одной стороны, данные ингибиторного анализа и существенные (до десятков миллимолей) изменения концентраций хлора и калия во время генерации ПД показывают, что потоки Cl<sup>-</sup> и K<sup>+</sup> играют существенную роль в формировании электрического ответа. С другой стороны, имеется ряд данных (чувствительность ПД к действию ингибиторов метаболизма и H<sup>+</sup>-АТФазы, изменения внеклеточного pH, сопровождающие разви-



тие электрического ответа и т.п.), которые показывают, что  $H^+$ -АТФаза также должна участвовать в процессе генерации ПД.

Современные представления о механизмах генерации ПД у высших растений суммированы на рис. 2.2. В соответствии с ними, на первом этапе формирования электрического ответа происходит вход в клетку  $Ca^{2+}$ , которые активируют хлорные каналы и одновременно вызывают инактивацию  $H^+$ -АТФазы. Развивающиеся вследствие этого выходящий поток ионов хлора и входящий поток протонов формирует фазу деполяризации. Развитие фазы реполяризации связано, по-видимому, с закрытием кальциевых каналов, снижением концентрации  $Ca^{2+}$  в клетке и, как следствие, с инактивацией хлорных каналов и реактивацией  $H^+$ -АТФазы. В формировании фазы реполяризации также принимают участие Д-калиевые каналы, активированные сдвигом мембранного потенциала в положительную сторону.

Активно исследуемой является и проблема передачи ПД в растении. Как и у животных, распространение ПД по растительным тканям происходит электротонически, при участии местных токов. У харовых водорослей механизма распространения ПД максимально приближен к проведению потенциалов действия в немиелинизированном аксоне: длинные, имеющие большой



**Рис. 2.2.** Схема генерации ПД в возбудимой клетке высшего растения, учитывающая вклад в формирование импульса как пассивных потоков ионов так переходное изменение активности электрогенной  $H^+$ -АТФазы (Воденеев и др., 2006)

диаметр клетки, связанные между собой плазмодесмами, по своим электрическим свойствам качественно сходны с нервным волокном.

У высших растений проблема распространения ПД является более сложной. Существует два потенциальных канала для проведения электрических реакций. Один из них – это симпласт паренхимных клеток в проводящих пучках, который представляет собой единую структуру образованную отдельными клетками и плазмодесмами. Другой – это ситовидные элементы флоэмы. Имеются аргументы в пользу каждого из возможных путей распространения ПД. Так клетки симпласта являются, по-видимому, более возбудимыми, нежели ситовидные элементы. С другой стороны, структура ситовидных элементов (длинные клетки, большого диаметра, соединенные множеством плазмодесм) приближается к структуре аксона и способствует высокой электрической проводимости вдоль такой клетки. Анализ проблемы распространения ПД дополнительно осложняется тем фактом, что распространяющиеся потенциалы действия были зарегистрированы в обоих типах клеток. В связи с этим можно предположить, что распространение ПД является комплексным процессом, вовлекающим в себя как симпласт паренхимных клеток, так и ситовидные элементы, однако данная гипотеза требует дальнейшего анализа.

Для формального описания распространения ПД у растений часто используется кабельное уравнение (2.1), полученное изначально для проведения нервного импульса.

$$\frac{\partial^2 E_m}{\partial x^2} = \frac{E_m}{\lambda^2} + \frac{\tau_m}{\lambda} \frac{\partial E_m}{\partial t}, \quad (2.1)$$

где  $\lambda = \frac{R_m}{R_o + R_i}$  – кабельная постоянная (расстояние, на котором импульс затухает в  $e$  раз при пассивном распространении),  $\tau_m = R_m C_m$  – постоянная времени мембраны (время, за которое отклонение мембранного потенциала от стационарного уменьшается в  $e$  раз),  $R_m$  – сопротивление мембраны на единицу площади,  $C_m$  – емкость мембраны на единицу площади,  $R_o$  – сопротивление внеклеточной среды на единицу длины клетки,  $R_i$  – сопротивление внутриклеточной среды на единицу длины клетки.

В соответствии с (2.1), скорость распространения сигнала равняется:

$$V = \sqrt{\frac{dV/dt}{\Delta V C_m (R_o + R_i)}}, \quad (2.2)$$

где  $\Delta V$  – порог мембранного потенциала,  $dV/dt$  – скорость развития фазы деполяризации.

Учитывая, что величина кабельной постоянной составляет у растений порядка нескольких миллиметров (например, для стебля проростков тыквы характерны две кабельные постоянные 0.6 и 3.6 мм, по-видимому, соответствующие симпластам основной ткани и проводящих пучков), в ряде работ было показано, что уравнение (2.2) применимо к распространению ПД по растительным объектам.

Обобщая изложенное, можно отметить, что механизмы генерации и распространения ПД имеют у растений ряд важных особенностей, отличающих их от потенциалов действия у животных. При этом, если формирование ПД у харовых водорослей является относительно хорошо изученным, то проблема генерация и распространение потенциалов действия у высших растений остается актуальной и требует дальнейших исследований.

### ***Вариабельный потенциал***

В отличие от потенциала действия, вариабельный потенциал (ВП) является распространяющейся электрической реакцией специфичной для растительных организмов и возникающей в ответ на действие повреждающих раздражителей (термические или химические ожоги, механическое повреждение и т.п.) (Рис. 2.1).

Можно выделить следующие особенности ВП:

- зависимость параметров распространяющейся реакции, в частности, амплитуды, от природы и силы повреждающего стимула.
- вариабельная форма фазы де- и, особенно, реполяризации электрического ответа.
- большая длительность развития реакции (до получаса).
- способность проходить через участки невозбудимой и даже мертвой ткани.
- зависимость амплитуды и скорости реакции от расстояния до зоны повреждения.

Такие различия характеристик ПД и ВП, позволяют предположить существование специфичных для ВП механизмов генерации и распространения сигналов. Однако, единые представления о таких механизмах в настоящее время отсутствуют.

В рамках существующих гипотез, генерацию фазы деполяризации ВП связывают преимущественно с инактивацией  $H^+$ -АТФазы, а ее последующая реактивация формирует фазу реполяризации и восстанавливает мембранный потенциал до исходного уровня. Предположение об участии  $H^+$ -АТФазы в генерации ВП подтверждается рядом экспериментальных данных, в частности, влиянием внеклеточного рН на параметры вариабельного потенциала и обратимыми изменениями содержания протонов в апопласте во время генерации ответа. В то же время, имеются также данные о сопровождающих генерацию ВП изменениях внеклеточной концентрации ионов хлора и калия, что позволяет предположить возможность их участия в формировании ответа.

Дополнительная сложность в исследовании механизмов генерации ВП связана с комплексным характером электрического ответа. Так показано, что реакция называемая вариабельным потенциалом включает в себя так называемую «медленную волну» – плавная деполяризация мембранного потенциала, сменяющаяся длительной плавной реполяризацией (амплитуда – несколько десятков милливольт). С другой стороны, на фоне медленной волны могут возникать «ПД-образные спайки», которые по своей форме и длительности

близки к потенциалам действия. Можно предположить, что ПД-образные спайки представляют собой МБЭР, вызванные деполяризацией в ходе медленной волны, или, в некоторых случаях, собственно ПД. Исходя из этого, вопрос об ионных механизмах ВП, включает в себя две связанные проблемы: проблему механизмов медленной волны и проблему механизмов ПД-образных спайков.

В настоящее время отсутствуют также единые представления о механизмах распространения ВП. Можно выделить три основные гипотезы, объясняющие этот процесс. В рамках первой из них предполагается, что распространение ВП является электротоническим, а отличия его параметров от параметров распространения у ПД связано с участием в проведении других тканей растений (не симпласта проводящих пучков, а симпласта основной ткани растения). Данная гипотеза не объясняет часть свойств ВП, в том числе – связь амплитуды реакции с силой действия повреждающего фактора, ее зависимость от расстояния до зоны повреждения, способность проходить через мертвую ткань. Противоречивыми являются и данные о применимости к распространению ВП кабельного уравнения, что также ставит под сомнение электротонический механизм его распространения.

Вторая гипотеза – гидравлическая – предполагает, что ВП представляет собой местный электрический ответ, вызванный распространением гидравлической волны, которая возникает в результате действия повреждающего фактора. В пользу данного предположения свидетельствует обратимое увеличение толщины стебля, которое развивается после повреждения и, как полагают, отражает повышение гидростатического давления в растительном объекте. Другим аргументом в пользу гидравлического механизма служит развитие электрического ответа при действии на участок стебля повышенного давления, причем параметры такого ответа зависят от величины приложенного давления. С другой стороны, остается нерешенной проблема соответствия между относительно медленной скоростью распространения ВП (~мм/с) и большой скоростью распространения гидравлической волны, достигающей в пределе скорости звука в водной среде (1.3 км/с).

В рамках третьей гипотезы предполагается, что распространение ВП связана с диффузией особого химического агента (фактора Рикка или раневого вещества), которое может индуцировать развитие электрического ответа. В настоящее время существует несколько потенциальных кандидатов на эту роль – системин, жасмонат, олигосахариды клеточной стенки и т.д., однако ни для кого из них такая функция не является полностью доказанной. Аргументами в пользу химической гипотезы является способность ВП проходить через мертвые участки стебля и даже через разрезы, соединенные раствором, а также индукция электрических ответов под действием экстрактов из растительных тканей. Недостатком химической гипотезы является низкая скорость молекулярной диффузии в растворах, так как рассчитанное на ее основе распространение ВП будет на несколько порядков медленнее, чем наблюдаемое в эксперименте.

Одним из путей преодоления противоречий в механизмах распространения ВП является разработка гипотез о комплексном характере механизмов его распространения. В качестве примера такой гипотезы можно привести представления о совместном участии гидравлических и химических механизмов распространения ВП. В соответствие с ними, повышение гидравлического давления вызывает потоки воды, направленные от зоны раздражения, которые, в свою очередь, переносят индуцирующее электрический ответ вещество.

В целом, можно отметить, что ВП представляют собой специфические для растений электрические сигналы, механизмы генерации и распространения которых остаются окончательно не установленными.

### *Местные биоэлектрические реакции*

К потенциалам возбуждения можно отнести и МБЭР, которые представляют собой ответы в зоне воздействия стресс-фактора, обычно – неповреждающего. Такие реакции неспособны к распространению и, по-видимому, представляют собой совокупность изменений мембранного потенциала, прямо вызванных действием внешнего фактора (аналог рецепторных потенциалов клеток животных), и электрических ответов, механизмы которых близки к механизмам ПД или – возможно – ВП.

Особенностями МБЭР является развитие деполяризации на первом этапе ответа, преимущественно спайковый характер и связь параметров реакции с модальностью и параметрами раздражителя, в частности, амплитуда МБЭР может возрастать при увеличении интенсивности индуцирующего их стимула. Кроме того, длительность абсолютной и относительной рефрактерности для МБЭР существенно ниже, чем для ПД, и зависят от типа раздражителя. С такой особенностью связана еще одна характерная черта МБЭР – при их периодической индукции в зависимости от длительности интервала между стимуляциями может наблюдаться либо снижение амплитуды реакции, т.е. адаптация (для холодного раздражения при интервалах между ответами менее 15 мин), либо ее возрастание, т.е. сенситизация (для холодного раздражения при интервалах 30 мин и более).

Механизмы МБЭР остаются к настоящему времени до конца не установленными, однако можно предположить, что они будут варьировать при действии различных стресс-факторов. Так при механических воздействиях весьма вероятным является участие в развитии реакции механочувствительных кальциевых или анионных каналов, при охлаждении –  $H^+$ -АТФазы, которая отличается высокой температурной чувствительностью, и т.п. В то же время, помимо специфических черт, вызванных различными стресс-факторами МБЭР включают, по-видимому, и общие процессы. Так весьма вероятным является вход  $Ca^{2+}$ , изменение активности анионных каналов и  $H^+$ -АТФазы в ходе развития ответа.

В целом, развитие МБЭР можно рассматривать как процесс рецепции воздействия внешнего стимула, обеспечивающий трансформацию внешнего воздействия в распространяющийся электрический сигнал.

### ***Лабораторная работа №1. Исследование генерации и распространения потенциалов действия у высших растений***

Метод экстраклеточной регистрации потенциалов может быть использован и для исследования потенциалов возбуждения, в частности – ПД. При регистрации ПД целесообразно использование не менее двух каналов отведения. При этом один из измерительных электродов размещается в зоне воздействия и позволяет регистрировать МБЭР в зоне действия неповреждающего раздражителя (холод, механическая стимуляция и др.). Другие измерительные электроды располагаются на удалении от зоны воздействия и позволяют регистрировать распространяющиеся электрические сигналы, если они возникают.

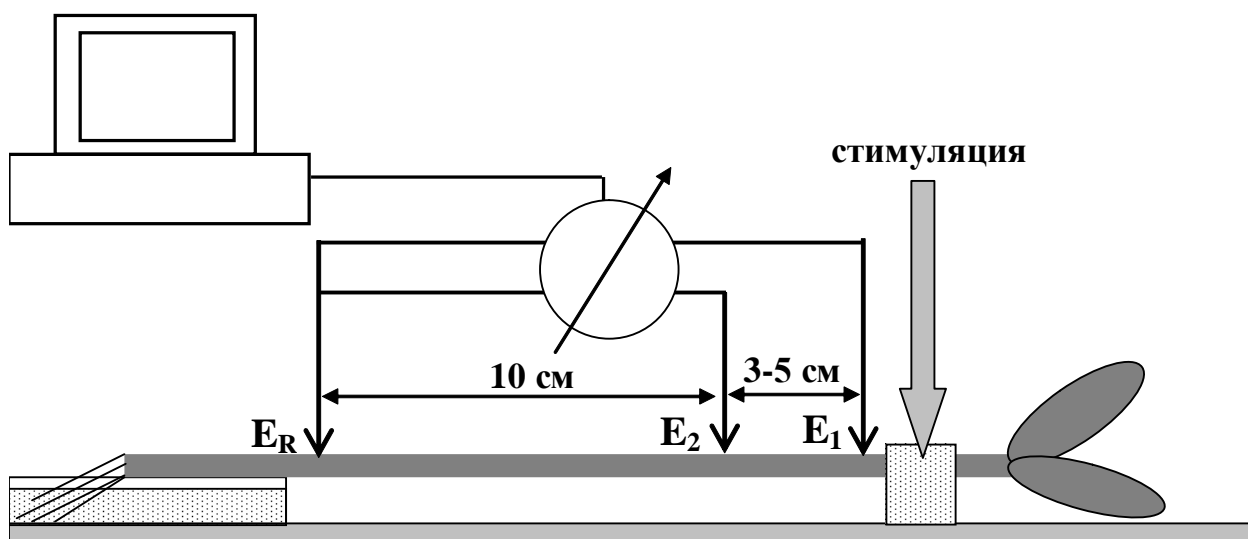
Для оценки скорости распространения можно использовать временной интервал между началом реакции в зоне воздействия и на удалении, однако такой метод приводит к определенным искажениям в силу комплексной природы МБЭР. Более точная оценка скорости может быть получена либо путем определения временного интервала между началом развития реакции для двух удаленных от зоны раздражения электродов, для чего требует не менее трех каналов отведения (один измерительный электрод – в зоне раздражения, два – на разном расстоянии от нее). При наличии только двух каналов отведения для более точного определения скорости может быть использован также вариант биполярного отведения, когда электрод сравнения также располагается на стебле, но на значительном удалении от измерительных (более 10 см). В этом случае регистрируемая реакция будет представлять собой сумму двух направленных в разную сторону ответов, которые сдвинуты во времени друг относительно друга.

Повышению точности определения параметров распространения ПД будет способствовать и использование электродов с малой площадью контакта с растением, что может быть реализовано путем использования электродов с заполненными элеткропроводящим гелем насадками или при применении в качестве электродов металлической проволоки, например, серебряной.

Следует отметить, что вероятность возникновения распространяющегося ПД сильно зависит от действия факторов среды и состояния растения и повышается по мере адаптации растения в экспериментальной установке. Как следствие, при изучении распространения потенциалов действия для растения необходим длительный период покоя (не менее 2 ч).

#### **Экспериментальная часть**

***Оборудование и материалы:*** проростки тыквы, макроэлектроды на основе серебряной проволоки, усилитель биопотенциалов, компьютер, подставка для растения, система для нанесения механического раздражения, ледяная вода.



**Рис. 2.3. Схема расположения электродов при регистрации ПД у проростка тыквы**

***Задание 1. Исследование параметров ПД, вызванных резким охлаждением***

1. Поместить проросток тыквы на подставку и погрузить в него электроды. При этом один из измерительных электродов должен располагаться на границе зоны раздражения ( $E_1$ ), второй – на расстоянии 3-5 см в базипетальном направлении ( $E_2$ ), а электрод сравнения ( $E_R$ ) – на расстоянии 10 см от второго измерительного, базипетально (Рис. 2.3).

2. Адаптировать растение в течении 2 часов.

3. Индуцировать генерацию ПД путем добавления в кювету ледяной воды на 1 мин., после чего вода откачивается. Регистрацию электрических потенциалов начать за 5 мин до раздражения и продолжать 10 мин после его окончания.

4. Через 10, 20 и 30 мин. после индукции первой реакции повторить раздражение ледяной водой. Регистрацию проводить аналогично.

5. При обработке результатов оценить параметры МБЭР (амплитуда, длительность), построить их зависимость от порядкового номера реакции. При возникновении распространяющихся ПД – определить их параметры и оценить скорость распространения.

6. Объяснить полученные результаты. Сделать выводы.

***Задание 2. Исследование параметров ПД, вызванных механическим воздействием***

1. Адаптировать растение в течении 1.5 часов.

2. Индуцировать генерацию ПД путем механического воздействия падающей стеклянной палочкой. Регистрацию электрических потенциалов начать за 5 мин до раздражения и продолжать 10 мин после его окончания

4. Через 10, 20 и 30 мин. после индукции первой реакции повторить механическое раздражение. Регистрацию проводить аналогично.

5. При обработке результатов оценить параметры МБЭР (амплитуда, длительность), построить их зависимость от порядкового номера реакции. При возникновении распространяющихся ПД – определить их параметры и оценить скорость распространения.

6. Объяснить полученные результаты. Сравнить с полученными при выполнении Задания 1. Сделать выводы.

### ***Лабораторная работа №2. Исследование генерации и распространения переменных потенциалов у высших растений***

При измерении ВП методом экстраклеточной регистрации используются те же подходы, что и при измерении ПД данным методом.

#### **Экспериментальная часть**

***Оборудование и материалы:*** проростки тыквы, макроэлектроды на основе серебряной проволоки, усилитель биопотенциалов, компьютер, подставка для растения, источник открытого пламени, паяльник.

#### **Задание 1. Исследование параметров ВП**

1. Поместить проросток тыквы на подставку и погрузить в него электроды (см. Лабораторная работа №1, Задание 1).

2. Адаптировать растение в течение 2 часов.

3. Индуцировать генерацию ВП ожогом семядольного листа тыквы открытым пламенем (5 сек). Регистрацию электрических потенциалов начать за 5 мин до раздражения и продолжать 20 мин после его окончания.

4. Адаптировать растение в течении 1.5 часов.

5. Определить параметры ВП (амплитуда, длительность) и скорость его распространения.

6. Индуцировать генерацию ВП точечным ожогом стебля тыквы (2-3 сек) рядом с первым измерительным электродом. Регистрацию электрических потенциалов начать за 5 мин до раздражения и продолжать 20 мин после его окончания.

7. Определить параметры ВП и скорость его распространения.

8. Сравнить реакции, вызванные точечным ожогом и открытым пламенем. Объяснить полученные результаты. Сделать выводы.

***Лабораторная работа №3. Исследование ионных механизмов генерации потенциалов возбуждения у высшего растения потенциометрическим методом***



Потенциометрическое определение концентрации ионов является важным методом, позволяющим исследовать ионные механизмы потенциалов возбуждения у растения.

В основе метода лежит определение потенциала измерительного ион-селективного электрода относительно электрода сравнения, не являющегося селективным. Ионселективный электрод в большинстве случаев представляет собой систему, состоящую из проницаемой для определенного типа иона мембраны и стандартного раствора данного иона внутри. Мембраны могут быть твердыми, жидкими и пленочными.

Твердые мембраны создаются на основе металлических систем типа Ag-AgCl, Hg-Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ионообменных смол, стекол различного состава, моно- и поликристаллов труднорастворимых в воде солей. Селективность кристаллических ионселективных электродов определяется способностью ионов под действием электрического поля перемещаться в кристаллической решетке по дефектам; стеклянные ионселективные электроды рассматривают как твердый электролит, который может вступать в ионообменное взаимодействие с исследуемым раствором. Стеклянные ионселективные электроды обладают высокой чувствительностью к ионам H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и др.

Селективность жидких мембран определяется, в первую очередь, избирательностью комплексообразования или ионного обмена между мембраной и раствором. Примерами таких ионселективных электродов могут служить Ca<sup>2+</sup>-электрод на основе раствора кальциевых солей диэфиров фосфорной кислоты и жидкостной электрод с одинаковой селективностью к ионам Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, используемый для определения жесткости воды.

Ионселективные электроды с пленочными мембранами, имеют те же активные вещества, что и в жидких мембранах, но они нанесены на полимерную матрицу, например, поливинил хлоридную.

Независимо от механизма, обеспечивающего полупроницаемые свойства мембраны, при погружении электрода в раствор исследуемый ион начинает диффундировать, формируя диффузионный потенциал. При достаточно высокой селективности мембраны, такой потенциал приближается к равновесному потенциалу для данного иона. В идеальном случае отрицательный логарифм концентрации иона (pI) мог бы быть рассчитан по формуле (2.3):

$$pI = pI_{st} - \frac{zF}{RT} E, \quad (2.3)$$

где pI<sub>st</sub> – отрицательный логарифм концентрации иона в стандартном растворе, E – потенциал на ионселективном электроде с идеально полупроницаемой мембраной, z – заряд данного иона, F, R и T – стандартные термодинамические величины.

Однако реальные ионселективные электроды всегда в той или иной степени проницаемы и для других ионов; кроме того, в измерениях получают не собственно потенциал ионселективного электрода, а его разность с потенциалом электрода сравнения. Как следствие, перед использованием ионселективных электродов всегда делается калибровка, т.е. проводится измерения

потенциалов для серии растворов заданной концентрации. При этом, учитывая (2.3) предполагается справедливость линейной функции (2.4):

$$pI = A - BE, \quad (2.4)$$

параметры которой (A и B), находятся в ходе калибровки и используются в дальнейших измерениях.

При использовании ионселективных электродов для изучения ионных механизмов потенциалов возбуждения у растений измерения концентраций ионов внутри клеток методически очень затруднено, так как требуется введение в клетку одновременно двух электродов – ионселективного и сравнения. Вследствие этого обычно исследуются изменения концентраций ионов вне клетки.

Один из вариантов такого измерения, представляет собой регистрацию концентрации ионов (в частности, протонов) в растворе в непосредственной близости к плазматической мембране, что достигается максимальным приближением ионселективного электрода к клеточной стенке. Такой подход применим для водных растений; в частности, он успешно используется при исследовании динамики pH вблизи плазматической мембраны у харовых водорослей. Дополнительным преимуществом данного метода является возможность изучения не только временной динамики, но и пространственной структуры распределения ионов.

Сложная структура тканей высших растений (многоклеточность, соединение клеток в симпласт, наличие эпидермиса, изолирующего от внешней среды) требует использования других подходов к измерению выхода ионов из клеток. Один из них базируется на введении ионселективных электродов в устьица, где они контактируют с водным раствором. Преимуществом такого подхода является максимальная близость измеряемых концентрации к концентрациям ионов в апопласте. В то же время он достаточно сложен методически и его применимость ограничена потенциалами возбуждения, которые генерируются и распространяются по тканям листа.

Другой подход к измерению выхода ионов базируется на измерении ионных концентрации в небольшом и постоянно перемешиваемом объеме стандартного раствора, который контактирует с внутренними тканями стебля через участок с удаленным эпидермисом. Данный метод существенно проще, нежели введение ионселективного электрода в устьице листа, однако он дает более опосредованные оценки динамики ионной концентрации. Так измерение динамики ионных концентраций в омывающем стебель растворе может быть использовано для качественного определения ионных потоков, сопровождающих развитие ПД или ВП, однако для количественной оценки требуется принять дополнительные допущения. В частности, если допустить, что выход ионов из стебля (и их обратное поглощение) происходит за время значительно меньшее, нежели время развития реакции (менее 1 с.), и растение имеет полый стебель приблизительно круглой формы, то изменения концентрации ионов в апопласте ( $\Delta[I]_{\text{ап}}$ ) могут быть рассчитаны с помощью уравнения (2.5):

$$\Delta[I]_{an} = \Delta[I]_{яч} \frac{V_{яч} + \pi l(r^2 - (r-h)^2)n_{an}}{\pi l(r^2 - (r-h)^2)n_{an}}, \quad (2.5)$$

где  $\Delta[I]_{яч}$  – изменение концентрации иона в ячейке,  $l$  – длина погруженного участка (с удаленным эпидермисом),  $r$  – радиус стебля,  $h$  – толщина стенки стебля,  $n_{ап}$  – объемная доля апопласта в стебле. Отметим, что для проростков тыквы могут быть использованы  $r \approx 6$  мм,  $h \approx 0.8$  мм и  $n_{ап} = 0.2$ .

Для оценки изменения концентраций ионов внутри клетки ( $\Delta[I]_{in}$ ) может быть использована формула (2.6):

$$\Delta[I]_{in} = \Delta[I]_{an} \frac{n_{an}}{n_{in}}, \quad (2.6)$$

где  $n_{in}$  – объем симпласта. Для проростков тыквы можно принять, что  $n_{in} = 0.8$ .

### **Экспериментальная часть**

**Оборудование и материалы:** проростки тыквы, макроэлектроды, рН-, рСl- и рК-чувствительные ионселективные электроды, иономер универсальный «Мультитест», компьютер, специальная подставка с кюветой, магнитная мешалка

#### **Задание 1. Исследование ионных механизмов формирования ПД**

1. Провести калибровку трех каналов иономера для рН-, рСl- и рК-чувствительного ионселективного электрода, соответственно.

2. Удалить участок эпидермиса со стебля проростка тыквы, поместить растение на подставку, так чтобы лишенный эпидермиса участок оказался в кювете для измерений.

3. Заполнить кювету стандартным раствором, поместить туда потенциал чувствительный и рСl-чувствительный электроды. Электрод сравнения поместить в корень.

4. Адаптировать растение в течение 1.5 часов, при этом после 1 часа адаптации сменить раствор в кювете.

5. Используя холодное (постепенное охлаждение) или механическое (удар стеклянной палочкой) раздражение, индуцировать генерацию ПД в участке стебля, погруженном в кювету. Записать изменения потенциала и концентрации ионов хлора.

6. Заменить рСl-чувствительный электрод на рН-чувствительный и адаптировать растение в течение 1 часа, при этом после 30 минут адаптации сменить раствор в кювете.

7. Используя холодное (постепенное охлаждение) или механическое (удар стеклянной палочкой) раздражение, индуцировать генерацию ПД в участке стебля, погруженном в кювету. Записать изменения потенциала и концентрации протонов.

8. Заменить рН-чувствительный электрод на рК-чувствительный и адаптировать растение в течение 1 часа, при этом после 30 минут адаптации сменить раствор в кювете.

9. Используя холодное (постепенное охлаждение) или механическое (удар стеклянной палочкой) раздражение, индуцировать генерацию ПД в участке стебля, погруженном в кювету. Записать изменения потенциала и концентрации ионов калия.

10. Обработать полученные результаты, рассчитать абсолютные изменения концентраций ионов в апопласте и цитоплазме. Сделать выводы.

### **Задание 2. Исследование роли протонов в формировании ВП**

1. Удалить участок эпидермиса со стебля проростка тыквы, поместить растение на подставку, так чтобы лишенный эпидермиса участок оказался в кювете для измерений.

2. Заполнить кювету стандартным раствором, поместить туда потенциал чувствительный и рН-чувствительный электроды. Электрод сравнения поместить в корень.

4. Адаптировать растение в течение 1.5 часов, при этом после 1 часа адаптации сменить раствор в кювете.

5. Используя ожег семядольного листа открытым пламенем, индуцировать распространение ВП по проростку. Записать изменения потенциала и концентрации протонов.

6. Обработать полученные результаты, рассчитать абсолютные изменения концентрации протонов в апопласте и цитоплазме, сравнить их с изменениями концентрации протонов, сопровождающими генерацию ПД. Сделать выводы.

### **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Потенциалы возбуждения у растений. Особенности ПД у растительных объектов.

2. Механизмы генерации ПД у растений (харовые водоросли, ацетабулярия, высшие растения).

3. Механизмы распространения ПД у растений. Кабельное уравнение.

4. Особенности ВП как специфического потенциала возбуждения у растений

5. Возможные механизмы генерации и распространения ВП. Аргументы «за» и «против».

6. Местные биоэлектрические реакции, их особенности и механизмы.

7. Применение метода экстраклеточного отведения для изучения ПД и ВП.

8. Принцип потенциометрического метода измерения концентраций ионов, типы ионселективных электродов.

9. Особенности применения ионселективных электродов в исследованиях механизмов потенциалов возбуждения.

### ***ГЛАВА 3. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПОТЕНЦИАЛОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ У РАСТЕНИЙ***

Существование у растений потенциалов возбуждения закономерно ставит вопрос об их функциональной роли. У локомоторных растений, способных к двигательным реакциям в ответ на то или иное воздействие, она достаточно очевидна. Более сложен вопрос о функциональной роли ПД и ВП у нелокомоторных. Ранние представления, в соответствии с которыми, распространяющиеся электрические сигналы у растений представляют собой своего рода артефакт, в настоящее время противоречат как теоретическим аргументам, так и данным многочисленных экспериментов.

В качестве теоретического аргумента можно привести высокую энергозатратность потенциалов возбуждения, так как они сопровождаются значительным выходом ионов, восстановление градиентов которых требует затрат АТФ. Очевидно, что если бы ПД и ВП не играли значимой роли в существовании растения, наличие таких сигналов не было бы эволюционно оправданным.

Широкий круг экспериментальных исследований показывает, что потенциалы возбуждения влияют на такие процессы как экспрессия ряда генов клетками растений, синтез фитогормонов, дыхание и фотосинтез, устойчивость растения к действию стресс-факторов и др. Рассмотрим некоторые из этих процессов подробнее.

#### ***Влияние потенциалов возбуждения на синтез фитогормонов***

В настоящее время имеется большое количество работ, посвященных исследованию влияния потенциалов возбуждения на синтез ряда фитогормонов, прежде всего – фитогормонов участвующих в адаптации растения к действию стресс-факторов (абсцизовая кислота, жасмонат, системин, этилен и др.). Так показано, что потенциалы возбуждения могут усиливать образование таких фитогормонов, причем активация их синтеза начинается в первые минуты после индукции сигнала и продолжает усиливаться в течение нескольких часов после этого.

В качестве возможного пути влияния потенциалов возбуждения на синтез фитогормонов предлагается следующая последовательность событий: генерация и распространение электрического сигнала → синтез абсцизовой кислоты → синтез жасмоната → синтез системина. Имеются также данные о способности жасмоната к индукции синтеза этилена, что объясняет возрастание последнего под действием потенциалов возбуждения.

#### ***Влияние потенциалов возбуждения на экспрессию генов***

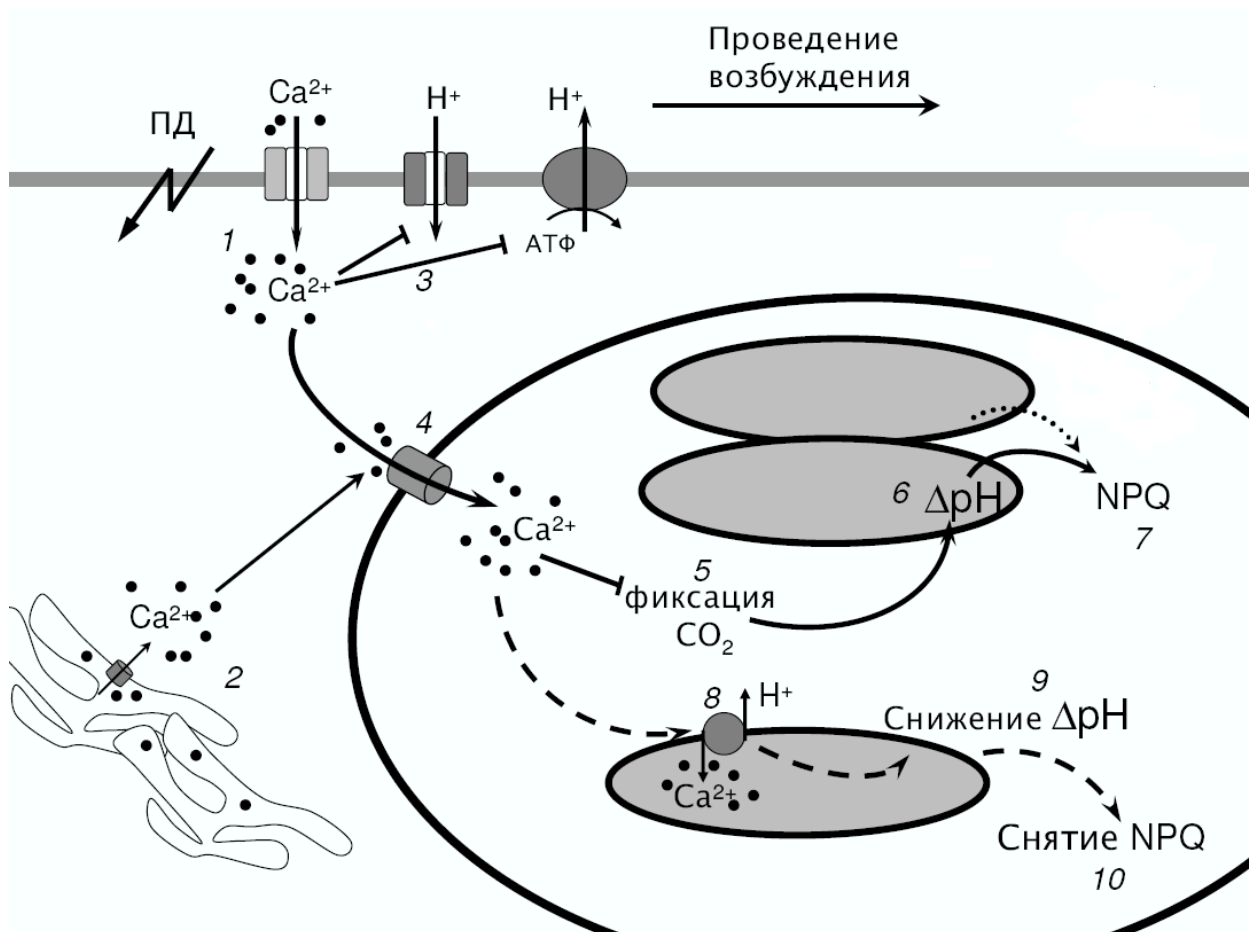
Потенциалы возбуждения оказывают существенное влияние и на экспрессию ряда генов, в том числе – генов-ингибиторов протеиназы, участвующих в защите растения от насекомых, а также генов, отвечающих за синтез

белков теплового шока, которые играют существенную роль в адаптации растения к действию стресс-факторов. Время развития ответа при этом может составлять не более 5 минут, а сами изменения экспрессии могут иметь сложный характер и включать в себя начальное усиление, последующее снижение и вторичное возрастание. Также показано, что в некоторых случаях ответ генетического аппарата может быть тесно связанным с фотосинтетическими процессами (отсутствует в темноте) и зависеть от типа раздражающего воздействия.

Механизмы влияния ПД и ВП на экспрессию остаются неизвестными, существует гипотеза, согласно которой ключевую роль в реализации влияния потенциалов возбуждения на генетический аппарат играют фитогормоны, в частности, жасмонат, синтез которого стимулирует процесс транскрипции ряда генов. В то же время, данные о быстром развитии генетического ответа (5 минут) свидетельствуют в пользу существования и других, более прямых механизмов влияния потенциалов возбуждения на экспрессию. Нельзя исключать, что в качестве такого механизма может выступать сопровождающий генерацию электрических сигналов вход ионов кальция, которые являются вторичным мессенджером очень широкого спектра действия. Учитывая тот факт, что вход ионов кальция играет важную роль и при реализации влияния фитогормонов, механизмы «прямого» и «непрямого» изменения экспрессии могут не отличаться слишком существенно. Наконец, данные о подавлении ответа экспрессии в условиях темноты свидетельствуют о вовлечении в его формирование фотосинтетических процессов.

### ***Влияние потенциалов возбуждения на фотосинтетические процессы***

Данные о влиянии ПД и ВП на фотосинтетические процессы являются достаточно противоречивыми. Можно выделить три различных типа ответа, показанных в литературе: (1) быстрая инактивация фотосинтеза (снижение поглощения  $\text{CO}_2$ , уменьшение квантового выхода ФСII), которая начинает развиваться менее чем через минуту после стимуляции и достигает максимума через 2-6 минут; (2) более медленная активация фотосинтетических процессов (увеличение поглощения  $\text{CO}_2$ ), которая достигает максимума через 10-25 минут после действия раздражителя; (3) медленно развивающаяся длительная инактивация фотосинтеза (снижение поглощения  $\text{CO}_2$ ), которая достигает максимальных значений через 20-25 минут после раздражения. При этом тип ответа зависит от природы стимуляции, особенностей электрического сигнала и вида растения. Кроме того, в одном растении могут последовательно развиваться ответы различных типов, тип которых также зависит от раздражителя



**Рис. 3.1. Предполагаемая схема влияния АД на фотосинтетические процессы у харовой водоросли (Крупенина, 2008)**

Механизмы влияния потенциалов возбуждения на фотосинтез остаются в целом недостаточно изученными. Наиболее исследованы механизмы формирования быстрой инактивации фотосинтетических процессов. Так, для клеток харовой водоросли показано, что ключевую роль в развитии быстрой инактивации фотосинтеза играет сопровождающий формирование АД вход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму, откуда ионы кальция поступают в строму и вызывают ингибирование реакций цикла Кальвина (Рис. 3.1). Весьма вероятно, что подобный механизм лежит в основе формирования быстрой инактивации фотосинтеза и у других растительных объектов, в частности, высших растений. С другой стороны, нельзя исключать участия в быстрой инактивации фотосинтеза и других процессов, в частности, вызванного электрическими сигналами закисления стромы, которое также может вызывать снижение активности реакций темновой стадии фотосинтеза.

Вопрос о механизмах вызванной АД и ВП активации фотосинтеза и длительной инактивации его остается открытым. Существуют гипотезы, связывающие развитие активации фотосинтеза с изменениями проницаемости тилакоидной мембраны для ионов, а развитие длительной инактивации – с накоплением абсцизовой кислоты, однако они требуют дальнейшего экспериментального и теоретического анализа.

В качестве отдельной проблемы может быть поставлен вопрос о физиологической роли вызванных ПД и ВП изменений фотосинтетической активности. Так развитие разных типов ответов позволяет предположить существование какого-то значимого для растения процесса, который является результатом всех вариантов ответа фотосинтеза. Нельзя исключать, что в качестве такого процесса может служить накопление АТФ в растении и рост его энергизации. Так при снижении поглощения  $\text{CO}_2$  и сохранении исходного уровня активности процессов световой стадии, что происходит при быстрой и, возможно, при длительной инактивации фотосинтеза, содержание АТФ в строме и цитоплазме должно возрастать. С другой стороны, если в основе активации фотосинтетических процессов под действием потенциалов возбуждения действительно лежит интенсификация процессов световой стадии фотосинтеза, то содержание АТФ в клетке также должно повышаться.

Предположение об АТФ как о конечном продукте ответов фотосинтетических процессов подтверждается данными о динамике ее содержания во флоэмном экссудате: сразу после прохождения ПД и ВП наблюдается снижение концентрации макроэрга, а через 5 минут и далее – ее возрастание. В дальнейшем, избыток АТФ может использоваться в качестве источника энергии для остальных функциональных ответов.

### ***Влияние потенциалов возбуждения на устойчивость растения к действию стресс-факторов***

С эволюционной точки зрения, вызванные потенциалами возбуждения функциональные ответы должны тем или иным способом повышать вероятность выживания растительного организма. В настоящее время считается, что ПД и ВП играют у растений сигнальную роль, обеспечивая быстрый и системный адаптационный ответ при локальном действии неблагоприятных факторов.

В частности, было показано, что ПД могут вызывать обратимое повышение холодоустойчивости растительного объекта, которое достигает максимума через 15-24 минуты после действия раздражителя, затем снижается, после чего следует развитие второго максимума устойчивости (40-50 минут после действия фактора). Дальнейшие исследования показали, что повышение устойчивости, по-видимому, имеет неспецифическую компоненту, так как вызванные действием на корни КС1 (химические раздражитель) ПД повышают устойчивость растения как к холоду, так и к прогреву.

Вопрос о возможности участия ПД в развитии специфических адаптационных процессов, т.е. адаптации к неблагоприятному фактору той же модальности, что и фактор, индуцировавший развитие электрического ответа, остается открытым. Существуют теоретические аргументы в пользу неспособности ПД передавать специфическую информацию о природе стимула, так как частотное кодирование информации у большинства растений невозможно (между распространениями ПД должно пройти не менее десятков минут), а форма, исходя из общих представлений об активном характере распространения ПД, не должна зависеть от природы стимула. В то же время,



существуют отдельные работы, в которых показано, что разные стимулы вызывают электрические сигналы с различными параметрами, а те, в свою очередь, индуцируют разные по своим характеристикам функциональные ответы. Механизмы такого явления неизвестны; в частности, остается открытым вопрос – являются ли измеренные реакции собственно ПД или они ближе к ВП.

Проблема влияния на устойчивость ВП остается слабо изученной экспериментально, существуют лишь отдельные работы, в которых показано положительное влияние электрических сигналов данного типа на устойчивость и выявлены отличия динамики и величины вызванных ПД и ВП ответов. Данная проблема порождает и серьезные теоретические трудности. Так генерация на фоне ВП ответов, сходных по своим параметрам с ПД, позволяет предположить, что вызванные переменными потенциалами изменения устойчивости не должны качественно отличаться, от изменений вызванных потенциалами действия. Однако, широко принятые представления о ВП как о местной реакции, развивающейся в ответ на распространение того или иного фактора (фактора Рикка, гидравлической волны), оставляют возможность для зависимости параметров реакции от природы и силы раздражителя. Такая зависимость действительно наблюдается в экспериментах. Таким образом, ВП потенциально могут передавать информацию не только о наличии стимула, но и о его природе и силе.

Еще одной интересной особенностью потенциалов возбуждения является тот факт, что в некоторых случаях генерация и распространение ПД может происходить при действии очень слабых факторов (например, при охлаждении на 3-4<sup>0</sup>С). Такая чувствительность объясняют с помощью гипотезы о преадаптации, в соответствии с которой слабое воздействие может являться предшественником более сильного и ПД позволяет растению заранее адаптироваться к этому возможному воздействию.

В рамках гипотезы преадаптации хорошо объясняются и очень высокая чувствительность распространения ПД к состоянию растения и условиям его выращивания. Например, при одинаковой интенсивности действующего фактора появление распространяющегося ПД более вероятно у освещенного растения (более энергизованного), нежели у затемненного (менее энергизованного). Можно предположить, что такая связь объясняется значительными энергозатратами адаптационного процесса. Так, растение в хорошем физиологическом состоянии (освещенное, выращенное на полноценной питательной среде и т.д.) имеет большие энергетические резервы и в силу этого может «позволить себе» реагировать даже на слабые воздействия, которые могут затем смениться более сильными, а могут и не смениться. С другой стороны, растение в плохом состоянии, реагируя на возможные, но маловероятные угрозы (о которых свидетельствуют слабые факторы), затратит слишком много ресурсов на адаптацию к таким потенциальным угрозам, что окажется скорее вредным для его выживания.

Вопрос о том, какие конкретно механизмы лежат в основе вызванной потенциалами возбуждения адаптации, остается открытым. Весьма вероятно,

что в этом процессе задействован процесс усиления экспрессии генов и синтеза необходимых белков, который наблюдается при распространении ПД и ВП. С другой стороны, любой адаптационный процесс требует затрат энергии, вследствие чего, логично предположить, что ответы фотосинтеза и усиление дыхания также вносят вклад в данный процесс. Вероятно, что свою роль в адаптации играют и другие функциональные ответы растения.

### ***Лабораторная работа №1. Исследование влияния распространяющихся электрических сигналов на фотосинтетическую активность высших растений***

Для исследования влияния потенциалов возбуждения на фотосинтетические процессы в растении может быть использован метод регистрации индукционных кривых замедленной флуоресценции (ЗФ), которые хорошо отражают процесс, протекающие в ходе световой стадии фотосинтеза.

ЗФ (или послесвечением) называется свечение фотосинтезирующих тканей, которое возникает после предварительного освещения объекта и может продолжаться в течение десятков секунд. В кривых затухания ЗФ обычно выделяют несколько компонент свечения, включая наносекундные, микросекундные, миллисекундные и секундные (со временем жизни 1,5 и 15 с) компоненты.

Спектр возбуждения и излучения ЗФ практически совпадает с аналогичными спектрами возбуждения флуоресценции (Фл) фотосистемы II (ФСII), что свидетельствует о близкой природе этих процессов и о ключевой роли ФСII в формировании свечения. При этом между ЗФ и Фл имеются существенные различия, так время жизни последней значительно короче и составляет  $0,4 \div 2,0$  нс.

По современным представлениям (Рис. 3.2) считается, что возникновение ЗФ обусловлено рекомбинационными процессами, протекающими в ФСII. При этом происходит следующая последовательность событий: поглощение кванта света светособирающим комплексом  $\rightarrow$  миграция энергии на реакционный центр ФСII ( $P_{680}$ ) и возникновение возбужденного состояния хлорофилла а в его составе ( $P_{680}^*$ )  $\rightarrow$  разделение зарядов и их миграция по электронно-транспортной цепи  $\rightarrow$  возвращение в результате обратных реакций части отрицательных и положительных зарядов на  $P_{680}$   $\rightarrow$  вторичная генерация  $P_{680}^*$   $\rightarrow$  высвечивание возбужденного состояния.

Рекомбинационная гипотеза может объяснить ряд важных особенностей ЗФ: сходство ее спектров со спектрами Фл ФСII (в обоих процессах участвуют одни и те же поглощающие и излучающие свет структуры); длительное время жизни (обратный перенос электронов в цепи является относительно медленным); низкую интенсивность ЗФ (в обычных условиях доля рекомбинирующих электронов мала); наличие нескольких компонент свечения, различных по времени жизни (рекомбинация происходит с различных участков ФСII) и др.

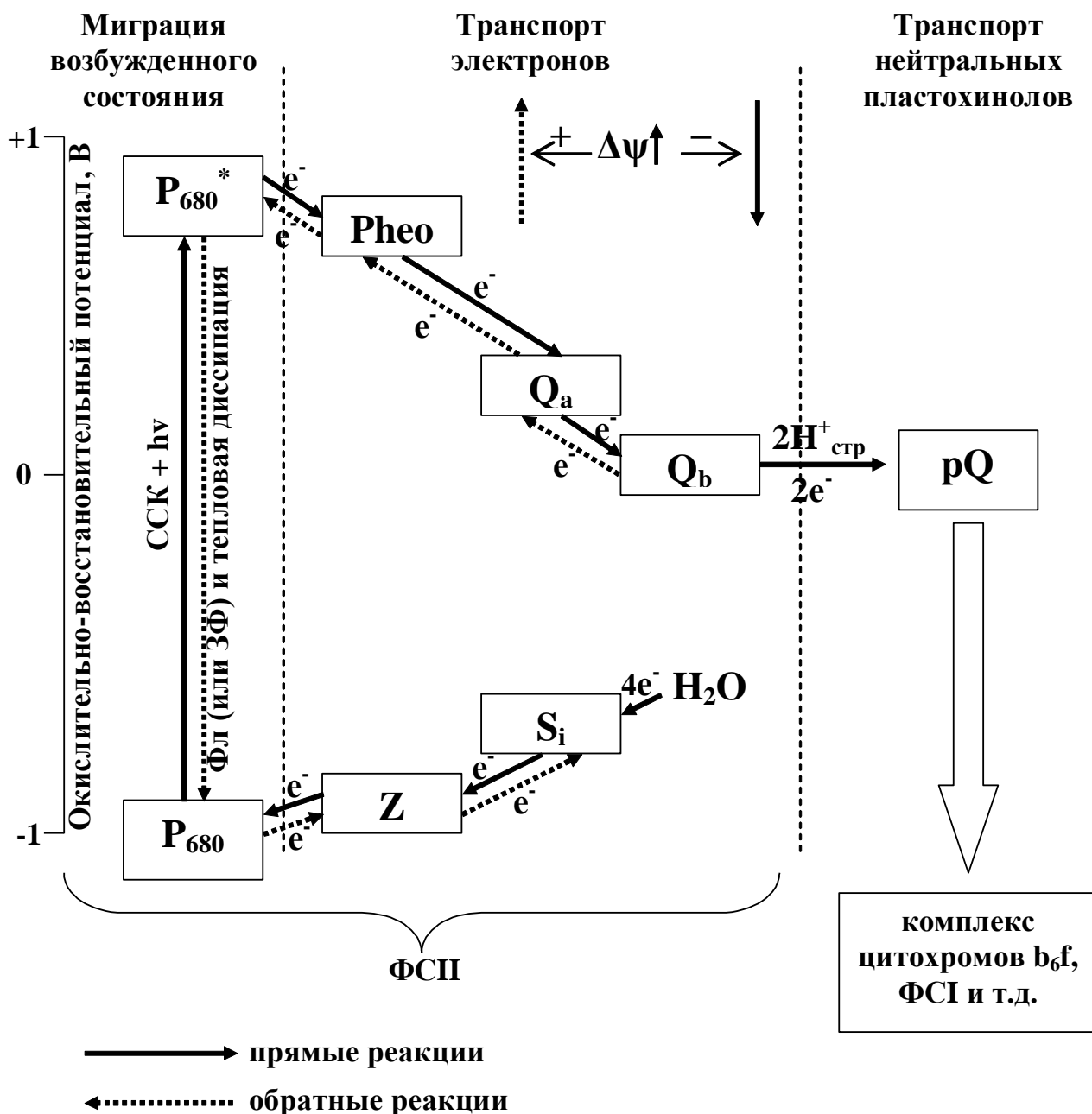


Рис. 3.2. Схема прямых и обратных реакций в фотосистеме II (ФСII), связанных с появлением ЗФ (на основе Goltsev et al., 2005)  
 Фл и ЗФ – флуоресценция и замедленная флуоресценция, ССК – светособиравший комплекс,  $P_{680}$  и  $P_{680}^*$  – невозбужденный и возбужденный реакционный центр ФСII, Pheo – феофитин,  $Q_a$  – пластохинон a,  $Q_b$  – пластохинон b, Z – первичный донор ФСII,  $S_i$  – состояние I кислородвыделяющего комплекса, pQ – пул пластохинонов, ФСI – фотосистема I,  $\Delta\psi$  – электрический потенциал на тилакоидной мембране,  $H^+_{стр}$  – протоны в строме,  $h\nu$  – свет

На интенсивность ЗФ значительное влияние могут оказывать такие факторы, как активность компонентов электронно-транспортной цепи, эффективность сопряжения световых и темновых стадий фотосинтеза, электрический и протонный градиенты на тилакоидной мембране.

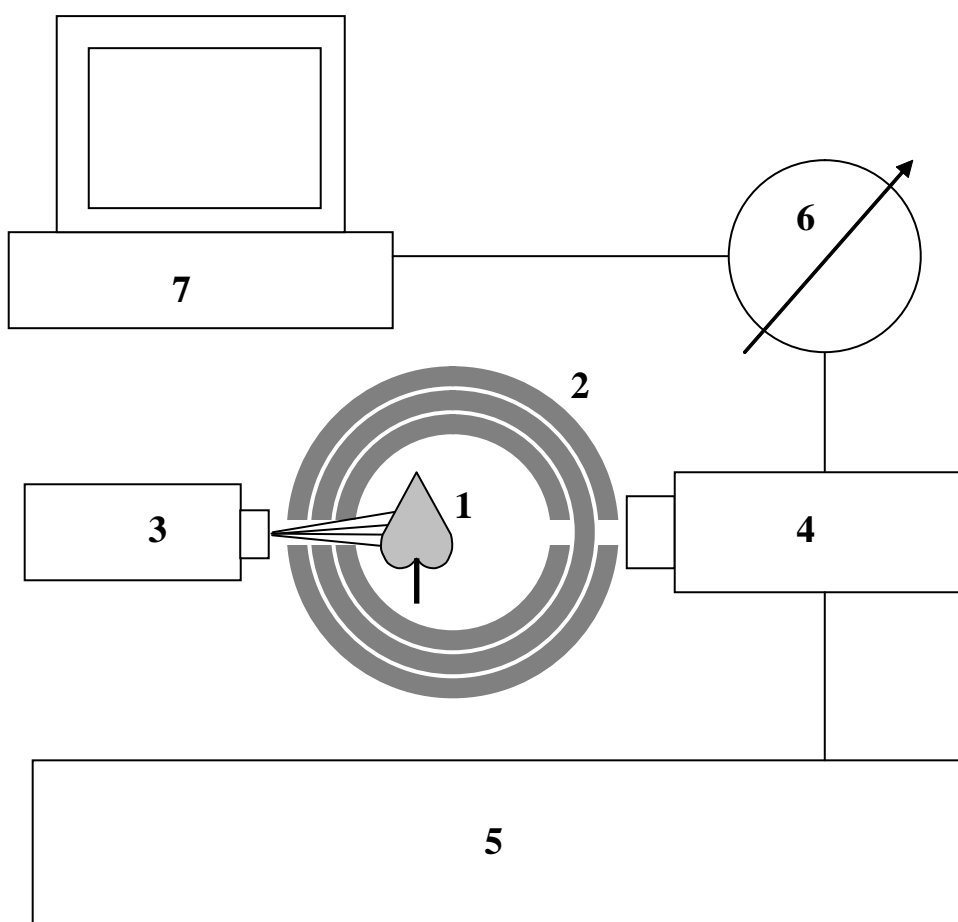
Снижение активности компонентов электронно-транспортной цепи в большинстве случаев приводит к увеличению интенсивности ЗФ, так как в условиях замедления прямых реакций переноса электронов повышается вероятность обратных, т.е. усиливаются рекомбинационные процессы и, как следствие, увеличивается послесвечение. В случае инактивации переносчиков в самой ФСII изменения ЗФ могут иметь более сложный характер: усиливаются короткоживущие компоненты свечения и гасятся долгоживущие, что обусловлено снижением доли состояний ФСII, способных к генерации долгоживущих компонент ЗФ. Этот эффект может быть показан на примере влияния диурона – ингибитора ФСII, нарушающего перенос электронов от пластохинона а ( $Q_a$ ) к пластохинону b ( $Q_b$ ), который подавляет секундные компоненты ЗФ, связанные с рекомбинацией электронов от  $Q_b^- / Q_b^{2-}$ , и повышает свечение компонент, связанных с рекомбинацией электронов от  $Q_a^-$ .

Снижение сопряжения темновой и световой стадии фотосинтеза также усиливает ЗФ, что связано с замедлением прямых реакций в электронно-транспортной цепи, по мере накопления не утилизированных в темновой стадии продуктов световых реакций.

Влияние электрического градиента ( $\Delta\Psi$ ) на тилакоидной мембране на интенсивность ЗФ связано с изменением констант скорости процессов переноса электронов. Так повышение  $\Delta\Psi$  (в положительную сторону) облегчает возвращение электронов с акцепторной стороны ФСII на  $P_{680}$ , т.е. увеличивает константы скорости рекомбинационных процессов ( $k_{рек} \sim \exp[-\Delta\Psi F/RT]$ , где  $k_{рек}$  – константа скорости рекомбинационных процессов, F, R и T – стандартные термодинамические величины), а значит и послесвечение.

Усиление ЗФ, индуцированное возрастанием протонного градиента ( $\Delta pH$ ) на тилакоидной мембране, связано, вероятно, с двумя процессам. С одной стороны, сопровождающее рост  $\Delta pH$  защелачивание стромы хлоропласта, должно приводить к замедлению протонирования  $Q_b^{2-}$ , т.е. снижать скорость прямых реакций в электронно-транспортной цепи, тем самым, увеличивая вероятность обратных реакций. С другой стороны, увеличение  $\Delta pH$ , вероятно, меняет поверхностный заряд тилакоидной мембраны, что также может модулировать константы прямых и обратных реакций.

При исследованиях ЗФ используются два основных подхода: (1) регистрация кривых затухания послесвечения и (2) регистрация индукционных кривых ЗФ. В первом случае, предварительно освещенный фотосинтезирующий объект помещают в темноту и регистрируют кинетику затухания различных компонент послесвечения. Во втором – объект адаптируют к темноте, после чего возбуждают его серией вспышек, после каждой из которых следует измерение ЗФ (обычно миллисекундные компоненты), для чего используют специальное устройство – фосфороскоп (Рис. 3.3). Метод регистрации индукционных кривых послесвечения позволяет исследовать переход-



**Рис. 3.3. Схема фосфороскопа. 1 – объект исследования, 2 – камера фосфороскопа, 3 – источник света, 4 – ФЭУ 104, 5 – высоковольтный источник питания, 6 – высокоомный милливольтметр, 7 – ПК.**

ные процессы, протекающие в электронно-транспортной цепи при переходе «темнота→свет» и является более информативным, нежели регистрации кривых затухания ЗФ.

В индукционных кривых ЗФ выделяют до трех пиков, развивающихся через различные интервалы времени после начала освещения. При этом первый пик ( $M_1$ ), появляющийся в первые секунды после начала освещения, связывают с быстрой генерацией  $\Delta\Psi$  на тилакоидной мембране и последующей его трансформацией в  $\Delta pH$ . Второй пик ( $M_2$ ), развивающийся через 5-10 или более секунд после начала освещения, вероятно обусловлен темновой инактивацией и последующей реактивацией (на свету) фермента акцепторной стороны фотосистемы I ферредоксин-НАДФ-редуктазы, который, восстанавливая НАДФ<sup>+</sup>, участвует в нециклическом потоке электронов. Третий пик ( $M_3$ ) наблюдается приблизительно через минуту после начала освещения, и связан с темновой инактивацией и последующей реактивацией ферментов цикла Кальвина. Необходимо отметить, что дифференцированные максимумы наблюдаются далеко не всегда, и во многих случаях при регистрации ин-

дукционной кривой ЗФ фиксируется лишь один, общий максимум, который связан преимущественно с изменениями  $\Delta\Psi$ , однако определенный вклад в его развитие может вносить и инактивация ферредоксин-НАДФ-редуктазы.

Стационарный уровень ЗФ, формирующийся после окончания индукционных процессов, также несет определенную информацию о фотосинтетических процессах. В частности, он, по-видимому, является достаточно чувствительным показателем интенсивности реакций темновой стадии фотосинтеза – чем она выше, тем ниже стационарный уровень послесвечения, и наоборот.

Таким образом, регистрация индукционных кривых ЗФ является достаточно информативным методом исследования фотосинтетических процессов у растений.

### **Экспериментальная часть**

***Оборудование и материалы:** листья герани, фосфороскоп, макроэлектроды на основе серебряной проволоки, усилитель биопотенциалов, компьютер, источник открытого пламени.*

Регистрация индукционных кривых ЗФ осуществляется после 15 мин темновой адаптации объекта в камере фосфороскопа (Рис. 3.3) приблизительно в центральной части листовой пластинки и продолжается 15 мин. В качестве источника возбуждающего белого света используется галогеновая лампа (10000 люкс). Темновой интервал между импульсом возбуждающего света и регистрацией ЗФ составляет 16 мс.

#### ***Задание 1. Исследование влияния ожога черешка листа на стационарный уровень индукционной кривой ЗФ листа герани***

1. Не менее чем за час до начала работы отделить листья герани, замазав срез черешка вазелином.
2. Включить фосфороскоп: установить рабочее напряжение на ФЭУ (фотоэлектронный умножитель) – 1600 В, установить скорость вращения цилиндра – 200 рад/с.
3. Поместить контрольный лист в камеру фосфороскопа, затем закрыть камеру, дополнительно изолировав ее черной тканью. Открыть заслонку к ФЭУ. Запустить программу регистрацию сигнала на компьютере.
4. После 5 минут записи включить освещение, в течение 15-30 минут (до стабилизации уровня послесвечения) продолжать регистрацию.
5. **Закрывать** заслонку ФЭУ, открыть камеру фосфороскопа, нанести ожог на черешок герани (~5 с.), закрыть камеру, открыть заслонку. Прodelать все это за время не более 1 минуты.
6. Записывать изменения ЗФ еще не менее чем 30 минут.
7. **Закрывать** заслонку ФЭУ, извлечь лист, выключить систему.
8. Погрузить в лист проволочные макроэлектроды (измерительный – около черешка, электрод сравнения – в край листовой пластинки).
9. Адаптировать лист не менее 1.5 часов.

10. Начать регистрацию биопотенциалов и нанести ожог на черешок (ниже зоны предыдущего ожога), записать электрические сигнал.

11. Обработать результаты, построить график динамики ответа ЗФ, оценить параметры ответа. Сделать выводы.

### ***Лабораторная работа №2. Исследование влияния распространяющихся электрических сигналов на холодоустойчивость высших растений***

Для оценки влияния потенциалов возбуждения на устойчивость растительных объектов может быть использован метод ее электрофизиологической диагностики, который применяется, в частности, для оценки холодоустойчивости.

В основе метода лежит зависимость основных параметров МБЭР (амплитуда, величина порога, скорость деполяризации и др.) от состояния растения. Так, по мере возрастания повреждения растительного объекта факторами разной природы (например, при использовании более глубоко охлаждения или нагрева до более высокой температуры) происходит снижение амплитуды электрического ответа, возрастание порога для его генерации, уменьшение скорости развития фазы деполяризации и т.д. При этом, чем более устойчивым к данному фактору является растение, т.е. чем меньшее повреждение у него происходит, тем слабее выражены изменения параметров МБЭР. Для формальной оценки степени повреждения (D) по угнетению амплитуды (A) можно использовать формулу

$$D = 1 - A_2 / A_1 \quad (3.1)$$

где  $A_1$  – амплитуда МБЭР до действия исследуемого благоприятного фактора,  $A_2$  – амплитуда МБЭР того же растения после действия такого фактора.

Связь между величиной повреждения и МБЭР, по-видимому, может реализовываться несколькими путями: через повреждение плазматической мембраны, которая является первичной мишенью многих повреждающих воздействий и состояние которой существенно влияет на электрический ответ, через энергизацию клеток, которая падает при повреждении и приводит к инактивации  $H^+$ -АТФазы и др.

На основании факта влияния повреждения на параметры МБЭР, для электрофизиологической оценки устойчивости растительного объекта обычно используется следующая схема эксперимента: у растений индуцируют первую тестовую МБЭР (например, охлаждением или механическим стимулом) → растение адаптируют в течение длительного времени для устранения возможного влияния МБЭР на устойчивость → растение подвергают действию повреждающего фактора → растение адаптируют в течении определенного времени, необходимого для восстановления способности генерировать МБЭР → у него индуцируют вторую тестовую МБЭР. Оценка устойчивости осуществляется по отношению величины параметра после повреждения к его величине до повреждения (для уменьшающихся при повреждении показателей, например, амплитуды или скорости деполяризации) или –

наоборот (для растущих показателей, таких как порог генерации электрического ответа).

Следует отметить, что при определении влияния на устойчивость того или иного модулирующего фактора (в нашем случае – ПД и ВП) оптимальным является вариант одновременного сравнения контрольного и опытного вариантов, так как такой подход позволяет снизить влияние естественной вариабельности устойчивости живой системы на процесс.

## **Экспериментальная часть**

**Оборудование и материалы:** проростки тыквы, макроэлектроды, усилитель биопотенциалов, компьютер, специальная подставка, паяльник.

### **Задание 1. Исследование ПД И ВП на холодоустойчивость проростков тыквы**

1. Поместить три проростка тыквы на подставку (Рис. 3.4), адаптировать их в течении 1.5 часов.

2. Начать регистрацию биоэлектрических потенциалов, последовательно меняя позиции электродов и раздражая соответствующее растение ледяной водой (или прикосновением льдом), записать первую тестовую МБЭР для каждого из растений.

3. Адаптировать растения еще в течении 1.5 часов.

4. Соответствующим образом расположив электроды индуцировать и зарегистрировать у одного из опытных растений ПД (ледяная вода или лед), а у другого опытного растения – ВП (точечный ожог гипокотилея).

5. Через 20 минут поместить подставку с растениями в морозильную камеру на 12 минут.

6. Адаптировать растения в течение часа к комнатным условиям.

7. Снять вторую тестовую МБЭР у каждого из растений, методом описанным в пункте 2.

8. По отношениям амплитуд второй и первой тестовых МБЭР оценить устойчивость каждого из растений. Сравнить контрольное и опытные растения. Сделать выводы.

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ**

1. Функциональные ответы, вызванные потенциалами возбуждения у растений.

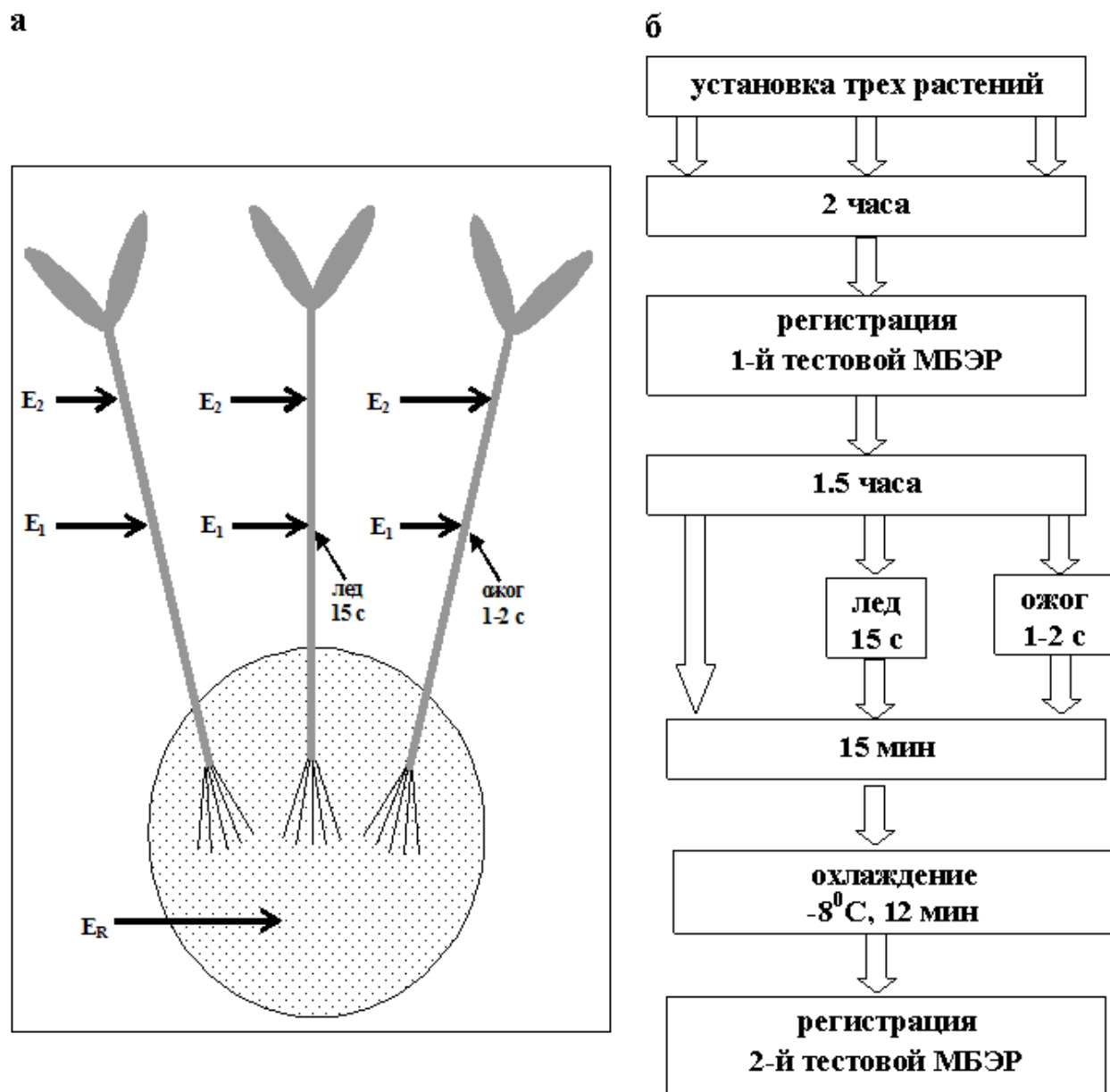
2. Влияние ПД и ВП на синтез фитогормонов и экспрессию генов.

3. Влияние потенциалов возбуждения на фотосинтетические процессы, возможные механизмы такого влияния.

4. Влияние ПД и ВП на устойчивость растений к действию стресс-факторов. Сигнальная или информационная роль?

5. Возможные механизмы влияния потенциалов возбуждения на устойчивость растений.





**Рис. 3.4. Схема расположения растений (а) и эксперимента (б) при исследовании влияния ПД и ВП на холодоустойчивость проростков тыквы**

6. Замедленная флуоресценция, ее механизмы, связь с фотосинтетическими процессами.

7. Использование метода регистрации ЗФ для исследования влияния потенциалов возбуждения на фотосинтез.

8. Метод биоэлектрической оценки устойчивости растений и его использования для оценки влияния ПД и ВП на холодоустойчивость проростков тыквы.

## **ГЛАВА 4. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОЭЛЕКТРОГЕНЕЗА У РАСТЕНИЙ**

Математическое моделирование является одним из активно развивающихся методов теоретического исследования живых систем. Основным преимуществом его применения является возможность описания сложной системы как единого целого, с учетом взаимодействия между элементами системы и синергического (неаддитивного) характера таких взаимодействий. Кроме того, наличие корректной математической модели исследуемого процесса может значительно ускорить его экспериментальное изучение, в частности, позволив выявить ключевые эксперименты для проверки того или иного теоретического предположения.

Сложный характер генерации ПД (участие систем активного и пассивного транспорта, регуляторная роль  $\text{Ca}^{2+}$ , изменения ионных концентраций и буферные свойства цитоплазма и апопласта) и неоднозначные данные о путях его распространения делают теоретический анализ этих процессов весьма актуальным. В настоящее время существуют два основных подхода к моделированию ПД у растительных объектов, один из которых базируется на модифицированной модели Ходжкина-Хаксли, а другой опирается на более детализированное описание процессов транспорта ионов в клетке.

### ***Использование модели Ходжкина-Хаксли для описания генерации ПД у растений***

Модель Ходжкина-Хаксли исторически является первой математической моделью процесса генерации и распространения ПД, которая описывала электрические сигналы в нерве. С теми или иными модификациями, данная модель активно используется для описания нервных импульсов и ПД в миоцитах по настоящее время.

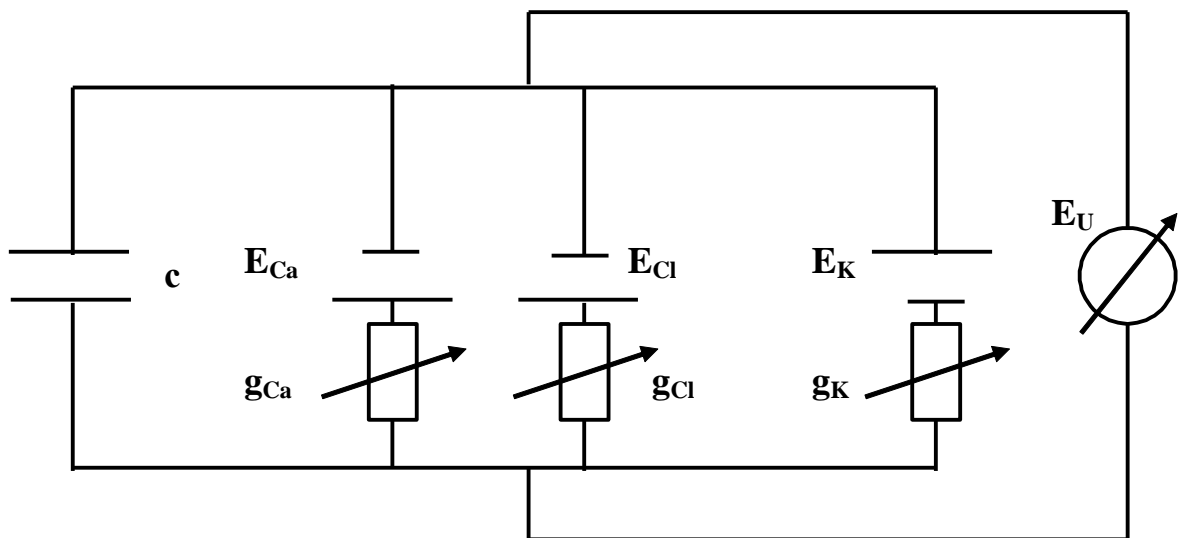
В литературе имеются работы, в которых модель Ходжкина-Хаксли адаптирована для описания процесса генерации ПД в харовой водоросли. На рис. 4.1 приведена эквивалентная схема, описывающая основные транспортные системы, которые были учтены в рамках этого подхода – хлорные, кальциевые и калиевые каналы. При этом каналу каждого типа соответствует отдельный источник постоянного тока, на эквивалентной схеме.

Описание динамики мембранного потенциала (уравнение (4.1)) аналогично ее описанию для клеток животных с ионами  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^+$  в качестве потенциалформирующих:

$$\frac{dE_m}{dt} = \frac{1}{c} (g_{\text{Cl}}(E_{\text{Cl}} - E_m) + g_{\text{Ca}}(E_{\text{Ca}} - E_m) + g_{\text{K}}(E_{\text{K}} - E_m) + I_{\text{ss}}), \quad (4.1)$$

где  $c$  – удельная емкость мембраны,  $g_{\text{Cl}}$ ,  $g_{\text{Ca}}$  и  $g_{\text{K}}$  – удельные проводимости для ионов хлора, кальция и калия,  $E_{\text{Cl}}$ ,  $E_{\text{Ca}}$  и  $E_{\text{K}}$  – равновесные потенциалы для ионов хлора, кальция и калия,  $I_{\text{ss}}$  – постоянный ток, заданной величины.

В рамках описания Ходжкина-Хаксли проводимости для ионных каналов не являются постоянной величиной, а представляют собой произведение максимальной удельной проводимости для каналов данного типа и воротных



**Рис. 4.1.** Эквивалентная схема, использованная при адаптации модели Ходжкина-Хаксли к описанию ПД у харовых водорослей (на основе Beilby, 1982)

переменных, которые зависят от потенциала и определяют долю каналов в открытом состоянии.

При использовании модели Ходжкина-Хаксли для описания ПД у растений принимается, что хлорные и кальциевые каналы могут быть описаны аналогично натриевым у животных (уравнения (4.2) и (4.3)):

$$g_{Cl} = m_{Cl}^3 h_{Cl} G_{Cl}, \quad (4.2)$$

$$g_{Ca} = m_{Ca}^3 h_{Ca} G_{Ca}, \quad (4.3)$$

где  $m_{Cl}$  и  $m_{Ca}$  – активационные воротные переменные для хлорных и кальциевых каналов, где  $h_{Cl}$  и  $h_{Ca}$  – инактивационные воротные для хлорных и кальциевых каналов, где  $G_{Cl}$  и  $G_{Ca}$  – максимальные удельные проводимости для  $Cl^-$  и  $Ca^{2+}$ , соответственно. Отметим, что все воротные переменные меняются в диапазоне от 0 до 1 и являются безразмерными (вероятность перехода воротной частицы в состояние, способствующее открытию канала).

Динамика изменений величин воротных переменных упрощенно описывается уравнением (4.4) для активационной и уравнением (4.5) для инактивационной:

$$m = m_{\infty} - (m_{\infty} - m_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right), \quad (4.4)$$

$$h = h_{\infty} - (h_{\infty} - h_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_h}\right), \quad (4.5)$$

где  $m_0$  и  $m_{\infty}$  – значения активационной воротной переменной на момент начала генерации ПД и после прохождения длительного времени (стационарное значение), где  $h_0$  и  $h_{\infty}$  – аналогичные значения для инактивационной воротной переменной,  $\tau_m$  и  $\tau_h$  – характерные времена активации и инактивации каналов,  $t$  – время от начала генерации ПД.

Калиевые каналы описываются без изменений (4.4):

$$g_K = n_K^4 G_K, \quad (4.6)$$

где  $n_K$  и  $G_K$  – активационная воротная переменная и максимальная удельная проводимость для калиевых каналов. Динамика  $n$  описывается уравнением (4.7):

$$n = n_\infty - (n_\infty - n_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right), \quad (4.7)$$

где  $n_0$  и  $n_\infty$  – значения активационной воротной переменной на момент начала генерации ПД и после прохождения длительного времени (стационарное значение),  $\tau_n$  – характерное время активации каналов.

Следует отметить, что использование уравнений (4.4), (4.5) и (4.7) вместо дифференциальных уравнений, применяемых в классическом варианте модели Ходжкина-Хаксли, имеет как положительные так и отрицательные стороны. Преимуществом такого подхода является упрощение модели в результате его применения (уменьшается количество дифференциальных уравнений в системе). С другой стороны, отказ от дифференциального описания препятствует возможности анализа повторных импульсов в рамках одного вычислительного эксперимента, т.е. ограничивается возможность исследования таких процессов как рефрактерность, пороговые эффекты и др.

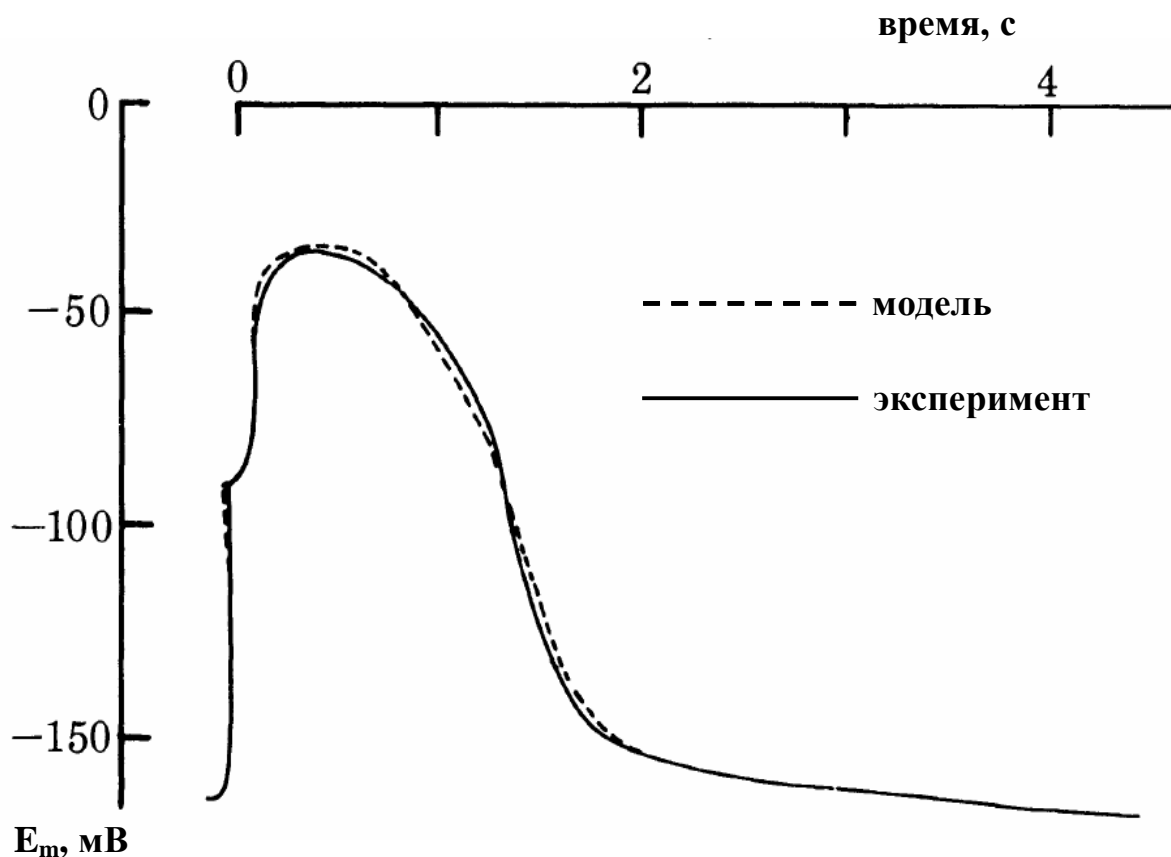
Дополнительная сложность данного вопроса связана с ограничениями применимости использованных Ходжкиным и Хаксли дифференциальных уравнений для описания динамики воротных переменных у растений, так как они были получены путем аппроксимации динамики токов различных ионов через мембрану нерва. В качестве альтернативных путей описания такой динамики можно отметить применения уравнения Аррениуса (см. следующий раздел) или опирающихся на него уравнений вида (4.8):

$$\frac{dm}{dt} = \frac{1}{\tau} \left( \frac{1}{1 + \exp\left(F \frac{E_m^{1/2} - E_m}{RT}\right)} - m \right) \quad (4.8)$$

где  $E_m^{1/2}$  – потенциал, при котором  $m = 0.5$ . Аналогичное описание может быть использовано и для других воротных частиц, при этом для инактивационной частицы выражения для экспоненты следует брать со знаком «-».

Имитированные модифицированной моделью Ходжкина-Хаксли изменения мембранного потенциала достаточно хорошо соответствуют экспериментальным ПД у харовых водорослей (Рис. 4.2). В частности, они хорошо описывают форму ответа, имитируют его амплитуду и длительность. Весьма вероятно, что при переходе к дифференциальному описанию динамики воротных переменных, модель Ходжкина-Хаксли может быть использована и для изучения подпороговых изменений и серий импульсов.

В то же время, для модели Ходжкина-Хаксли характерен ряд существенных ограничений, которые являются следствием ее изначальной



**Рис. 4.2. Сравнение экспериментального и теоретического ПД у харовой водоросли (Veilby, 1982)**

«заточенности» под описание нервного импульса. Так, данная модель совершенно не учитывает активный транспорт, который не вносит существенного вклада в трансмембранный потенциал нерва, однако значительно влияет на процессы биоэлектrogenеза у растений. Другое важное ограничение модели, заключается связано с тем, что она не учитывает изменения концентраций потенциалформирующих ионов в ходе развития импульса. Такие изменения незначительны при генерации ПД у животных, однако они могут достигать нескольких десятков мМ у растений.

Существуют отдельные работы, в которых предпринимается попытка преодолеть эти ограничения. В частности,  $H^+$ -АТФаза учитывается в модели путем введения в эквивалентную схему еще одного источника тока и применения уравнения (1.6), а изменения концентраций могут быть найдены из величин токов, обусловленных ионами каждого типа. Однако, возможности таких модификаций ограничены. Так, например, изменения концентрации могут, в свою очередь, менять величину проводимости ( $G$ ) и, как следствие, влиять на динамику потенциала. С другой стороны, описание  $H^+$ -АТФазы на основе уравнения (1.6) не позволяет учесть ряд важных свойств этого фермента – зависимость активности от концентрации протонов, насыщение, нелинейный характер зависимости от мембранного потенциала и др.

В целом, несмотря на существенные результаты, достигнутые с применением модели Ходжкина-Хаксли, теоретический анализ механизмов ПД требует более детализированной модели электрического ответа. Это особен-

но актуально для высших растений, у которых, по-видимому, генерация ПД сопровождается обратимой инактивацией  $H^+$ -АТФазы.

### *Детализированные модели генерации ПД у высших растений*

Следствием ограниченной применимости модели Ходжкина-Хаксли к описанию процесса генерации ПД у растений, стала разработка других, более детализированных моделей биоэлектrogenеза у растительных объектов. Первой из таких моделей, стала математическая модель ПД у Ацетабулярии, которая описывала детально описывала калиевые и хлорные ионные токи, хлорной помпы, а также зависимость проницаемости ионных каналов и активности помпы от величины мембранного потенциала. Однако, уникальный характер «метаболического» ПД у Ацетабулярии (основная роль в формировании ответа принадлежит обратимой инактивации протонной помпы) ограничивает применимость данной модели к другим растительным объектам.

В дальнейшем рядом авторов были разработаны детализированные математические модели, позволяющие описать процессы биоэлектrogenеза у более широкого круга растений. При этом такие модели имитировали как автоколебательные изменения мембранного потенциала, так и процесс генерации ПД под действием внешних факторов. Рассмотрим их общие особенности.

Начальным этапом построения модели является разработка электрофизиологической схемы клетки, которая будет служить основой для описания. Решение такой задачи связано с определенными трудностями, так как, с одной стороны, слишком большое упрощение модели может привести к потере важной информации при ее анализе и даже искажению результатов. С другой стороны – при введении в модель малосущественных элементов усложнит ее анализ и увеличит число параметров модели, что повышает вероятность возникновения ошибок.

Можно выделить следующие процессы, учет которых при разработке модели генерации ПД представляется целесообразным (Рис. 4.3): изменения мембранного потенциала, активности потенциалзависимых кальциевых, Г- и Д-калиевых и хлорных каналов,  $H^+$ - и  $Ca^{2+}$ -АТФаз,  $H^+/K^+$ -антипортера и  $2H^+/Cl^-$ -симпортера, регуляторную роль  $Ca^{2+}$ , изменения концентраций потенциал-формирующих ионов ( $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ ,  $K^+$  и  $Cl^-$ ) и буферные свойства цитоплазмы и апопласта.

Как и в модели Ходжкина-Хаксли, изменения мембранного потенциала описываются в детализированных моделях как функция суммы потоков потенциал-формирующих ионов (4.9):

$$\frac{dE_m}{dt} = \frac{1}{C} \cdot F \sum j_r \quad r \in (K^+, Cl^-, H^+, Ca^{2+}) \quad (4.9)$$

где  $j_r$  – трансмембранный поток иона  $r$ .

Описание пассивного транспорта ионов основано на уравнении Гольдмана-Ходжкина-Катца согласно Градманну (4.10):

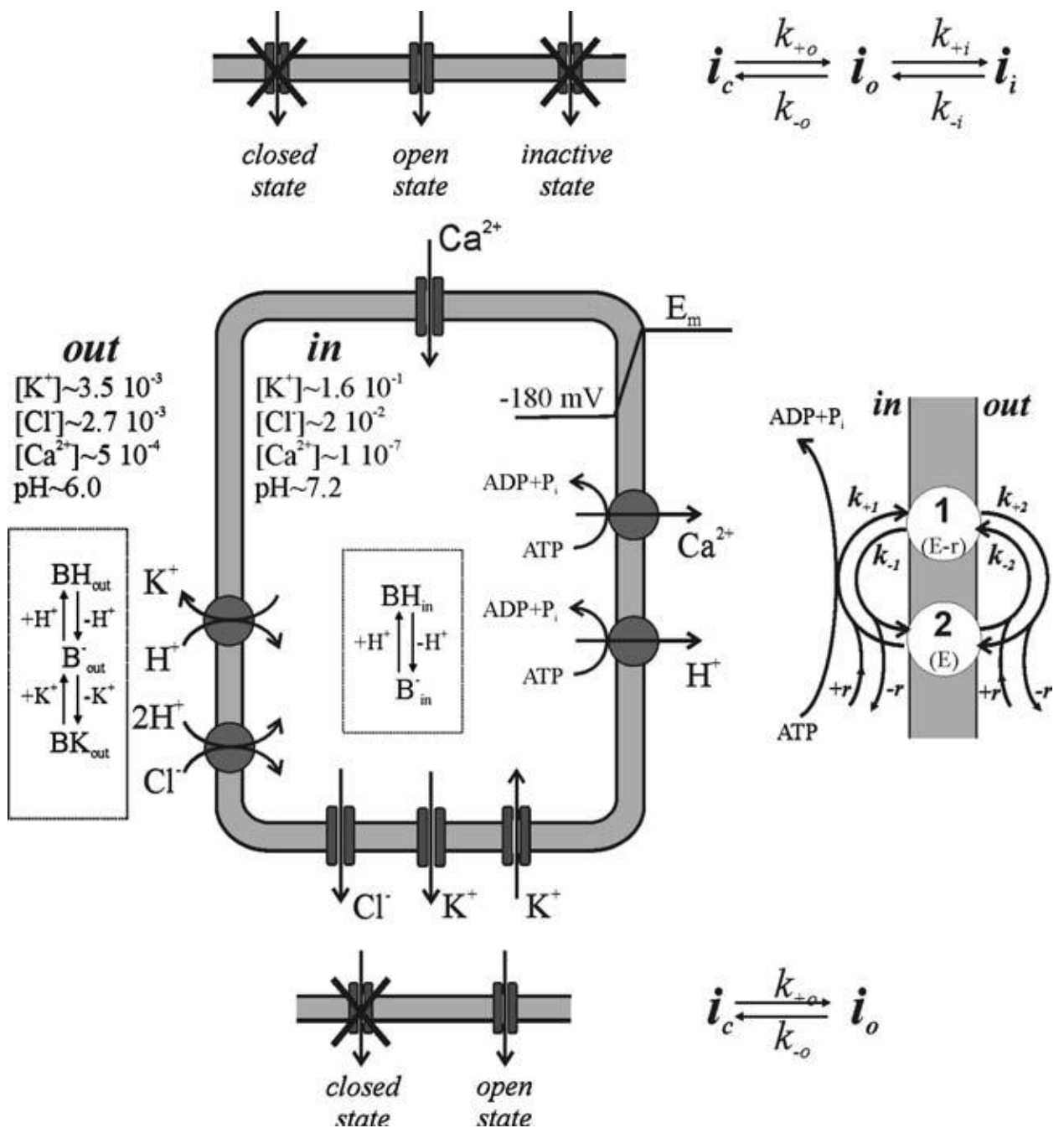


Рис. 4.3. Схема электрофизиологической модели растительной клетки.  $E_m$  – электрический потенциал на плазматической мембране;  $[K^+]$ ,  $[Cl^-]$  и  $[Ca^{2+}]$  – концентрации ионов калия, хлора и кальция, соответственно (М);  $B_{in}^-$  и  $BH_{in}$  – свободные и связанные с  $H^+$  молекулы протонного буфера в клетке;  $B_{out}^-$ ,  $BH_{out}$  и  $BK_{out}$  – свободные, связанные с  $H^+$  и связанные с  $K^+$  молекулы буфера в апопласте. *Выше* – схема состояний  $Ca^{2+}$ -канала; *ниже* – схема состояний  $Cl^-$  и  $K^+$ -каналов; *справа* – схема “two-state” модели первичного активного транспорта в системе (Sukhov, Vodenev, 2009)

$$j = p_o P_{\max} \frac{zFE_m}{RT} \frac{[r]_{in} - [r]_{out} \exp\left(-\frac{zFE_m}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{zFE_m}{RT}\right)} \quad (4.10)$$

где  $p_o$  – вероятность открытого состояния канала для иона  $r$ ,  $P_{\max}$  – максимальная проницаемость для данного иона,  $[r]_{in}$  и  $[r]_{out}$  – концентрации свободного иона  $r$  в цитоплазме и апопласте, соответственно.

В отличие от модели Ходжкина-Хаксли вероятность открытого состояния ионного канала описывается не как произведение воротных переменных, отражающее положение определенного количества независимых воротных частиц, а как единую переменную, отражающую конформационное состояние канала. При этом принималось, что  $K^+$  канал и  $Cl^-$  каналы имеют два состояния: закрытое и открытое, а  $Ca^{2+}$  каналы – три состояния: закрытое, открытое и инактивированное (Рис. 4.3). Переходы между состояниями описываются на основе уравнения Аррениуса: (4.11) – для каналов с двумя состояниями, (4.12) – для каналов с тремя состояниями.

$$\frac{dp_o}{dt} = k_{+o}(1 - p_o) - k_{-o}p_o \quad (4.11)$$

$$\frac{dp_o}{dt} = k_{+o}(1 - p_o - p_i) - k_{-o}p_o + k_{-i}p_i - k_{+i}p_o \quad (4.12)$$

$$\frac{dp_i}{dt} = k_{+i}p_o - k_{-i}p_i$$

где  $p_i$  – вероятность инактивированного состояния канала для иона  $r$ ,  $k_{+o(i)} = k_{o(i)}^r \exp\left(\frac{c_{o(i)}FE_m}{2RT}\right)$  и  $k_{-o(i)}^r = k_{o(i)} \exp\left(\frac{c_{o(i)}F(E_{o(i)} - E_m)}{2RT}\right)$  – константы скорости переходов из закрытого состояния в открытое и из открытого в закрытое (индекс «o») или из открытого состояния в инактивированное и из инактивированного в открытое (индекс «i»),  $c_o$  и  $c_i$  – константы, которые отражают долю мембранного потенциала действующую на воротные механизмы и их заряд,  $E_o$  и  $E_i$  – потенциальный барьер для переходов канала из закрытого состояния в открытое и из открытого в инактивированное, соответственно,  $k_o$  и  $k_i$  – константы, которые отражают скорость переходов между закрытым и открытым состоянием и между открытым состоянием и инактивированным при  $E_m$ ,  $E_o$  и  $E_i$  равных «0».

Так как в модели учитывается вход ионов кальция, которые играют преимущественно регуляторную роль, необходимо учесть их влияние на  $Cl^-$  каналы:

$$A = \frac{[Ca^{2+}]_{in}^2}{K^2 + [Ca^{2+}]_{in}^2} \quad (4.13)$$

где  $A$  – доля  $Cl^-$  каналов, которые активированы  $Ca^{2+}$ ,  $[Ca^{2+}]_{in}$  – концентрация  $Ca^{2+}$  в цитоплазме,  $K$  – константа, равная  $[Ca^{2+}]_{in}$  для  $A=0.5$ , степень «2» отражает активацию  $Cl^-$ -канала двумя  $Ca^{2+}$ .



Первичный активный транспорт ионов ( $H^+$ -АТФаза and  $Ca^{2+}$ -АТФаза) может быть описан с помощью так называемой “two-state model” которая учитывала два состояния помпы – с ионом (1) и без иона (2) (Рис. 4.2).

$$j_p = E_o \frac{k_{+1}k_{+2} - k_{-1}k_{-2}}{k_{+1} + k_{-1} + k_{+2} + k_{-2}} \quad (4.14)$$

где  $E_o$  – общая концентрация фермента,  $k_{+1}$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_{+2}$  and  $k_{-2}$  – константы скорости прямых (+) и обратных (-) переходов между двумя состояниями помпы (индекс “1” был использован для потенциалнезависимых констант, index “2” – для потенциалзависимых констант).

Уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца может быть использовано для описания зависимости констант ( $k_{+2}$  и  $k_{-2}$ ) от мембранного потенциала. Так, константы ( $k$ ) для  $H^+$ -АТФазы рассчитываются с помощью уравнений (4.15):

$$\begin{aligned} k_{+1} &= k_1 [H^+]_{in} \\ k_{-1} &= k_1 \exp(-|\Delta G_{ATP}|/RT) \end{aligned} \quad (4.15)$$

$$k_{+2} = k_2 \frac{FE_m}{RT} \frac{1}{1 - \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)}$$

$$k_{-2} = k_2 [H^+]_{out} \frac{FE_m}{RT} \frac{\exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)}$$

где  $k_1$  и  $k_2$  – константы скорости при  $E_m=0$  и  $[H^+]_{in} = [H^+]_{out} = 1$  М,  $[H^+]_{in}$  и  $[H^+]_{out}$  – концентрации  $H^+$  в цитоплазме и апопласте, соответственно,  $\Delta G_{ATP}$  – энергия гидролиза АТФ.

Зависимость активности помпы от концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме была учитывается в описании  $H^+$ -АТФазы с помощью уравнения (4.16):

$$A = \frac{K^n}{K^n + [Ca^{2+}]_{in}^n} \quad (4.16)$$

где  $A$  – доля  $H^+$ -АТФаз, которые были инактивированы  $Ca^{2+}$ ,  $K$  – константа, которая равна  $[Ca^{2+}]_{in}$  для  $A=0.5$ ,  $n$  – число  $Ca^{2+}$ , которое необходимо для инактивации одной молекулы фермента. Так как зависимость активности фермента от концентрации ионов кальция нелинейная, принимается, что  $n = 2$ .

$Ca^{2+}$ -АТФаза описывается как система, которая обменивает  $Ca^{2+}$  и  $H^+$ , с константами:

$$\begin{aligned} k_{+1} &= k_1 [Ca^{2+}]_{in} [H^+]_{in} \\ k_{-1} &= k_1 \exp(-|\Delta G_{ATP}|/RT) \end{aligned} \quad (4.17)$$

$$k_{+2} = k_2 \frac{FE_m}{RT} \frac{1}{1 - \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)}$$

$$k_{-2} = k_2 [Ca^{2+}]_{out} [H^+]_{in} \frac{FE_m}{RT} \frac{\exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)}$$

где  $[Ca^{2+}]_{in}$  и  $[Ca^{2+}]_{out}$  – концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и апопласте, соответственно.

Ионные потоки, которые связаны с вторичным активным транспортом, описываются как разность между потоками, направленными в апопласт ( $j_{in}$ ), и потоками, направленными в цитоплазму ( $j_{out}$ ):  $j_p = j_{in} - j_{out}$ . Скорости этих потоков были пропорциональны концентрациям транспортируемых ионов (уравнения (4.18) и (4.19)). Электрогенный активный поток  $Cl^-$  зависит также от мембранного потенциала (4.18).

$$j_p^{Cl} = V^{Cl} \frac{\frac{FE_m}{RT}}{1 - \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right)} \left( [Cl^-]_{in} [H^+]_{in}^2 - [Cl^-]_{out} [H^+]_{out}^2 \exp\left(-\frac{FE_m}{RT}\right) \right) \quad (4.18)$$

$$j_p^K = V^K \left( [K^+]_{in} [H^+]_{out} - [K^+]_{out} [H^+]_{in} \right) \quad (4.19)$$

где  $j_p^{Cl}$  и  $j_p^K$  – потоки  $Cl^-$  и  $K^+$ ,  $V^{Cl}$  и  $V^K$  – общие константы скорости  $2H^+/Cl^-$ -симпортера и  $H^+/K^+$ -антипортера, соответственно. Для иона  $r$ :  $V^r = k^r E^r$ , где  $E^r$  – концентрация фермента, который переносит ион  $r$ ,  $k^r$  – константа скорости при  $u=0$  и  $[r]_{in} = [r]_{out} = 1$  М.

Влияние температуры на системы первичного и вторичного активного транспорта описывается с помощью температурного коэффициента  $Q_{10}$ , который был введен в уравнения (4.14), (4.18) и (4.19), которые принимаются равным трем.

Изменения ионных концентраций в цитоплазме и апопласте описываются на основе уравнений (4.10), (4.14), (4.18) и (4.19), путем добавления коэффициентов  $S_{cell}/V_{cel}$  (отношение между поверхностью клетки и ее объемом) и  $V_{cell}/V_{ap}$  (отношение между объемом клетки и апопласта).

Буферные свойства цитоплазмы для протонов (рис. 4.3) могут быть описаны уравнением (4.20):

$$[H^+]_{in} = \frac{[H]_{in} - B_{in} - K_{in}^H}{2} + \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{[H]_{in} - B_{in} - K_{in}^H}{2}\right)^2 + 4K_{in}^H [H]_{in}} \quad (4.20)$$

где  $B_{in}$  – концентрация буфера,  $[H]_{in}$  – общая концентрация протонов (свободных и связанных с буфером) в цитоплазме,  $K_{in}^H$  – константа диссоциации молекул буфера и протонов.

Буферные свойства апопласта для протонов и ионов калия (рис. 4.3) описываются уравнением (4.21):

$$[H^+]_{out} = \frac{[K]_{out} + [H]_{out} - B_{out} - K_{out}^H}{2} \frac{K_{out}^H / K_{out}^K [H]_{out}}{K_{out}^H / K_{out}^K [H]_{out} + [K]_{out}} + \quad (4.21)$$

$$+ \frac{1}{2} \sqrt{\left( \frac{[K]_{out} + [H]_{out} - B_{out} - K_{out}^H}{2} \frac{K_{out}^H / K_{out}^K [H]_{out}}{K_{out}^H / K_{out}^K [H]_{out} + [K]_{out}} \right)^2 + 4K_{out}^H [H]_{out} \frac{K_{out}^H / K_{out}^K [H]_{out}}{K_{out}^H / K_{out}^K [H]_{out} + [K]_{out}}}$$

$$[K^+]_{out} = [H^+]_{out} \frac{[K]_{out}}{[H]_{out}} \frac{K_{out}^H}{K_{out}^K}$$

где  $B_{out}$  – концентрация буфера,  $[K]_{out}$  и  $[H]_{out}$  – общая концентрация ионов калия и протонов в цитоплазме,  $[K^+]_{out}$  и  $[H^+]_{out}$  – концентрация свободных ионов калия и протонов,  $K_{out}^K$  и  $K_{out}^H$  – константа диссоциации между молекулами буфера и ионами калия и протонами, соответственно. Выражение (4.21) корректна при условии  $[H]_{out} \frac{K_{out}^H}{K_{out}^K} \gg [H^+]_{out} (1 + \frac{K_{out}^H}{K_{out}^K})$

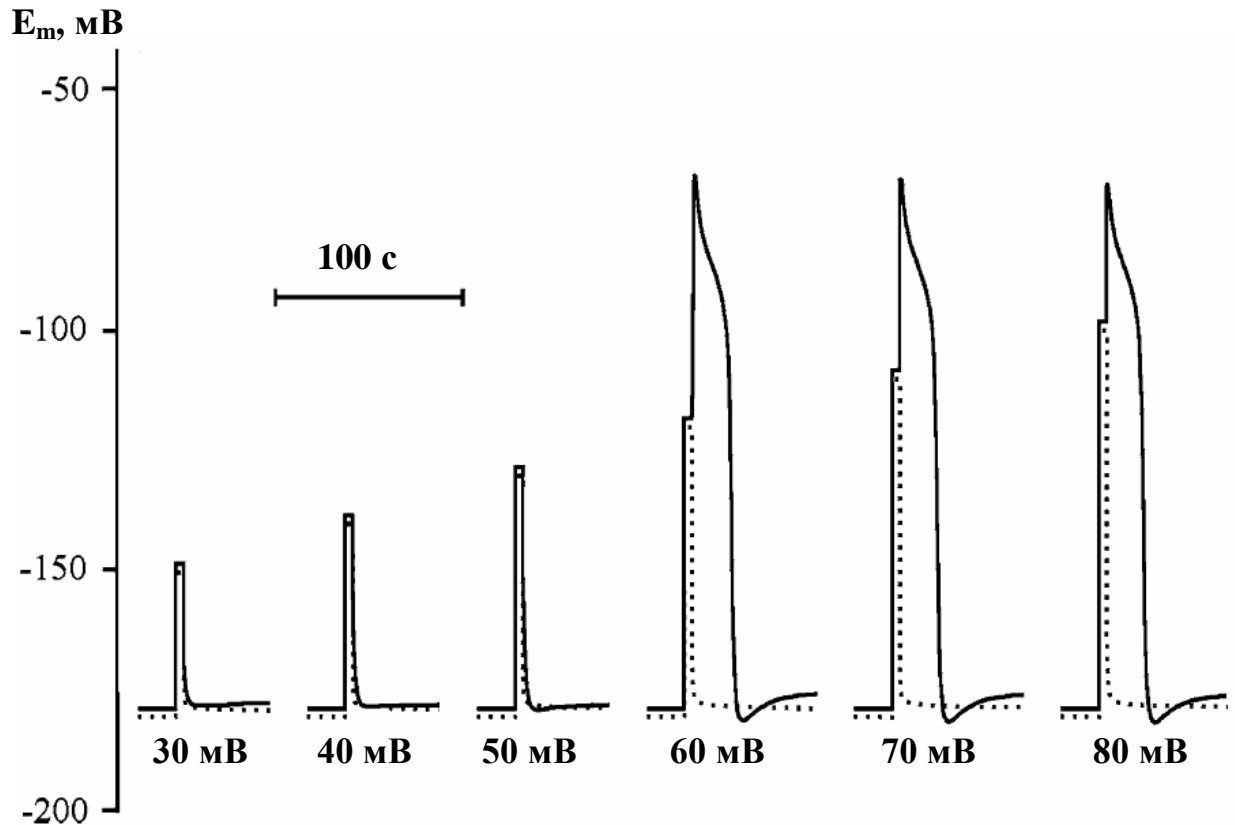


Рис. 4.4. Потенциалы действия, индуцированные электрической стимуляцией с  $Ca^{2+}$  в апопласте ( $5 \cdot 10^{-4}$  М) (сплошная линия) и без него (пунктирная линия). Электрическая стимуляция моделировалась как повышение  $E_m$  до постоянного уровня (величина изменений  $E_m$  показана под кривой; продолжительность стимулов равна 4 с) (Sukhov, Vodeneev, 2009)

Объединяя уравнения (4.9) – (4.21), можно получить модель, достаточно полно описывающую процесс генерации потенциала действия у высших растений. В частности, данная модель может имитировать такие важные свойства ПД, как подчинение закону «все или ничего», зависимость генерации от концентрации ионов кальция вне клетки и активности  $H^+$ -АТФазы, изменение концентрации ионов в цитоплазме и апопласте на фоне генерации ПД и др. Пример, ПД описанного детализированной моделью приведен на рис. 4.4. Кроме описания ПД, детализированные модели могут быть также использованы для описания автоколебаний (периодической генерации ПД без действия внешнего стимула) и для анализа влияния тех или иных факторов на ПП.

### ***Подходы к моделированию распространения ПД у растений***

Теоретическое описание процесса распространения ПД у растений представляет собой отдельную сложную задачу, решение которой далеко от завершения. В первую очередь это связано со сложным характером среды, по которой распространяется ПД у растений – симпласт проводящих пучков, который может включать в себя клетки разных типов (ситовидный элементы, паренхимные клетки и др.).

Наиболее простым вариантом решения проблемы теоретического описания распространения ПД является использование кабельного уравнения (см. (2.1) и (2.2)). Действительно, в ряде работ было показано, что как активное, так и пассивное распространение ПД происходит в соответствии с ним. Однако, вопрос о пределах такого соответствия остается открытым. В частности, следует отметить, что симпласт представляет собой двумерную (для мхов) или трехмерную (проводящие пучки высших растений) систему, которая существенно отличается от нервного волокна, который может быть описан как одномерная система. При этом, модели синцития кардиомиоцитов, качественно сходного с симпластом растительных тканей, показывают, что для выявления принципиальных свойств распространения в трехмерной среде нужна, как минимум, двумерная модель.

Рассмотрим основные подходы к описанию распространения ПД с привлечением двумерной системы. Один из них заключается в том, что каждый элемент поверхности такой системы описывается как источник электрического поля, и итоговый его потенциал находится на основе суммирования электрических полей всех элементов поверхности. Недостатком такого метода является, с одной стороны, сложность решения такой задачи, а с другой стороны – значительные упрощения, которые принимаются при таком подходе (крайне сложно учесть гетерогенную среду, с сильно варьирующей диэлектрической проницаемостью – от 80 в водном растворе, до 2-3 в липидных мембранах).

Более перспективным является использование для описания распространения ПД у растений моделей, имитирующих проведение ПД по синцитию мышечных клеток. В общем случае, такие модели представляют собой дву- или трехмерные системы, состоящие из возбудимых клеток, каждая из кото-

рых электрически связана с соседними (с четырьмя или восемью для двумерной и с шестью или двадцатью шестью для трехмерной системы). Пример такой системы приведен на рис. 4.5.

При этом, модель генерации ПД может сильно варьировать, в зависимости от задачи, стоящей перед разрабатываемым теоретическим описанием. Если требуется установить наиболее общие особенности распространения ПД по структуре, подобной симпласту, то возможно использование простых точечных моделей, в том числе – разработанных для кардиомиоцитов. Среди таких моделей, может быть названа модель ФитцХью-Нагумо.

Для двумерной системы, она может быть записана, например, следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dx_{ji}}{dt} &= x_{ji} - \frac{1}{3}x_{ji}^3 - y_{ji} + \sum_{k=j-1}^{j+1} \sum_{l=i-1}^{i+1} g_{jkl} (x_{kl} - x_{ji}) \\ \frac{dy_{ji}}{dt} &= \varepsilon(x_{ji} + a) \end{aligned} \quad (4.22)$$

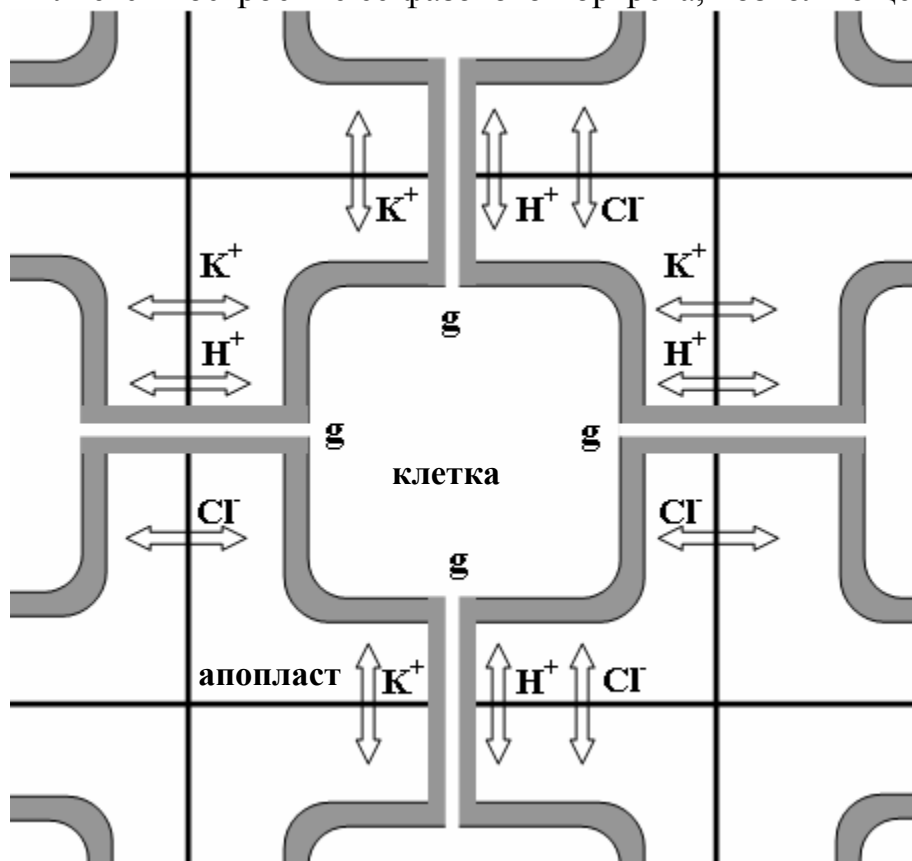
где  $a$  – пороговый параметр,  $\varepsilon$  – постоянный малый параметр,  $g_{jkl}$  – проводимость между клетками  $(k;l)$  и  $(j;i)$ ,  $(k;l)$  равняется  $(j-1;i)$ ,  $(j+1;i)$ ,  $(j;i-1)$  и  $(j;i+1)$ . Варьируя величину  $g_{jkl}$  можно описать различные структуры. В частности, для описания однородной системы, можно принять, что  $g_{jkl}=g$ , где  $g$  – одинакова для всех элементов. Для описания системы, имитирующей распространение ПД по системе из паренхимных клеток и ситовидных элементов, можно задать два варианта  $g_{jkl}$  – меньший по величине, связывающий паренхимные клетки между собой и с ситовидными элементами, и больший, отражающий связь между ситовидными элементами. При этом общая структура модели может иметь следующий вид: системы паренхимных клеток, в которой имеется одни или несколько линий клеток, имитирующих ситовидные элементы.

При необходимости более глубокого анализа распространения ПД в качестве точечного уравнения может быть использована описанная в предыдущем разделе модель генерации электрического ответа. В этом случае, необходимо описать не только электрические взаимодействия между клетками, но и диффузионные потоки между ними (Рис. 4.5.). Это может быть сделано, например, путем описания окружающего клетку апопласта, как некоторого единого объема, а потоков – как диффузионных потоков между такими объемами, подчиняющимися уравнению Фика.

### ***Методы анализа моделей ПД***

Можно выделить три варианта решения систем дифференциальных уравнений. Это аналитическое, качественное и численное решение. Аналитическое решение представляет собой решение в явном виде, т.е. некую явную зависимость зависимых переменных модели от времени и других независимых переменных (например, координаты в пространстве). Такое решение возможно для достаточно ограниченной группы уравнений, в основном для

линейных дифференциальных уравнений. Качественным решением системы уравнения является построение ее фазового портрета, позволяющего



**Рис. 4.5. Пример схемы электрических и диффузионных взаимодействий клетки с соседними, используемой при моделировании распространения ПД у растений (Sukhov et al., 2011)**

определить особые точки системы, их устойчивость/неустойчивость и вид. Однако применимость такого подхода также ограничена преимущественно системами двух или трех дифференциальных уравнений. Таким образом, для решения сложных систем уравнений, к которым и относится большинство моделей ПД, необходимо использование численных методов.

Результатом применения численных методов является зависимость переменных модели от времени и (или) других независимых переменных, полученная в численной форме, для определенных значений параметров и начальных и граничных условий. Для получения такой зависимости используются рекуррентные вычисления, когда результат предыдущего «шага» является основой для следующего.

Одним из простейших численных методов является метод Эйлера, в рамках которого кривая зависимости переменной аппроксимируется ломаной, длина звена которой определяется «шагом» модели, а угол наклона – значением производной в предыдущей точке. Т.е. при решении системы уравнений таким методом, бесконечно малые приращения заменяются на ко-

нечные. Так для нахождения зависимости переменной  $X$  от времени методом Эйлера (для уравнения  $\frac{dX}{dt} = f(X)$ ) можно использовать уравнение (4.23):

$$X_i = X_{i-1} + f(X_{i-1})\Delta t \quad (4.23)$$

где  $X_i$  и  $X_{i-1}$  – величина переменной  $X$  в момент времени  $t_0+i\Delta t$  и  $t_0+(i-1)\Delta t$ , соответственно,  $t_0$  – начальный момент времени,  $\Delta t$  – временной шаг,  $i=1,2,3,\dots$ . Ключевым условием корректности использования метода Эйлера, является применение достаточно малого шага независимой переменной, величина которого подбирается в зависимости от конкретного вида уравнений.

Так как численные методы дают решение, описывающее поведение системы лишь при определенных условиях, то особое значение приобретает проблема выбора адекватных параметров модели. Предпочтительным при этом является использование значений параметров прямо показанных в эксперименте, однако такая возможность есть далеко не всегда. Другой подход заключается в подборе таких параметров, при которых наблюдается максимальное соответствие между теоретическими и экспериментальными результатами, что, однако, повышает вероятность возникновения артефактов. При разработке детальных моделей обычно применяют оба подхода. На таблице 1 приведены значения параметров модели, использованные при детализированном описании процесса генерации ПД.

С определенными сложностями связано и численное описание процесса распространения ПД. Так прямое использование разработанных для кардиомиоцитов подходов при моделировании проведения ПД с детальной моделью генерации применимо лишь для качественного, но не для количественного анализа параметров процесса распространения, так как необходимые для этого вычисления будут иметь слишком длительный характер. Преодоление этих ограничений возможно путем одновременно двух (или более) временных шагов при анализе. Один из них используется при вычислении изменений в пределах точечной модели, а другой – существенно более короткий – описывает процесс электротонического распространения ПД, т.е. электрические взаимодействия между клетками.

Непосредственно для проведения вычислений могут быть использованы математические программы (например, Matlab, Maple, Mathcad, Mathematica и др), программы для разработки кинетических моделей (например, Model Vision Studium), равно как и специально написанные для решения той или иной задачи программы.

***Лабораторная работа №1. Теоретический анализ роли систем активного и пассивного транспорта ионов через плазмалемму в формировании потенциала покоя и генерации потенциалов действия у растений***

### **Практическая часть**

***Оборудование и материалы:*** компьютер, программа для анализа модели

### **Задание 1. Анализ роли хлорных и калиевых каналов в генерации ПД**

1. Построить, используя модель, кривую изменения мембранного потенциала и концентраций хлора и калия в клетке и в апопласте при постепенном охлаждении при исходных значениях параметров (ПД в нормальных условиях).

2. Исследовать влияние на ПД и концентрации ионов увеличения и уменьшения максимальной хлорной проницаемости в модели. Шаг и количество точек определить из соображений максимального полного описания поведения модели в разных условиях.

3. Исследовать влияние на ПД и концентрации ионов увеличения и уменьшения максимальной калиевой проницаемости в модели, отдельно для Г- и Д-калиевых каналов. Шаг и количество точек определить из соображений максимального полного описания поведения модели в разных условиях.

4. Обобщить полученные результаты. Сделать выводы о роли каналов каждого типа.

### **Задание 2. Анализ $H^+$ -АТФазы в генерации ПД**

1. Построить, используя модель, кривую изменения мембранного потенциала и рН в клетке и апопласте при постепенном охлаждении при исходных значениях параметров.

2. Исследовать влияние на ПД и рН увеличения и уменьшения активности  $H^+$ -АТФазы в модели (для этого можно менять параметр, соответствующий ее концентрации). Шаг и количество точек определить из соображений максимального полного описания поведения модели в разных условиях.

3. Обобщить полученные результаты. Сделать выводы о роли  $H^+$ -АТФазы.

### **Задание 3. Анализ роли $Ca^{2+}$ в генерации ПД**

1. Построить, используя модель, кривую изменения мембранного потенциала, концентрации кальция в клетке и рН в клетке и апопласте при постепенном охлаждении при исходных значениях параметров.

2. Исследовать влияние на ПД и концентрацию ионов кальция увеличения и уменьшения максимальной кальциевой проницаемости в модели. Шаг и количество точек определить из соображений максимального полного описания поведения модели в разных условиях.

3. Исследовать влияние на ПД и концентрацию ионов кальция содержания кальция в апопласте.

4. Исследовать влияние на ПД и рН снижения и повышения чувствительности хлорных каналов к  $Ca^{2+}$ .

5. Исследовать влияние на ПД и рН снижения и повышения чувствительности  $H^+$ -АТФазы к  $Ca^{2+}$ .

6. Обобщить полученные результаты. Сделать выводы о роли  $Ca^{2+}$  в генерации ПД.



## *Лабораторная работа №2. Теоретический анализ процесса распространения потенциала действия*

### **Практическая часть**

*Оборудование и материалы:* компьютер, программы, разработанные для описания распространения ПД у растений

**Задание 1. Анализ общих закономерностей распространения ПД по симпласту и по системе паренхимные клетки и ситовидные элементы с использованием модели ФитцХью-Нагумо**

1. Запустить программу, имитировать распространение ПД при исходных условиях (однородная система). Сохранить профиль волны при распространении. Записать параметры распространения – пороговое время и скорость.

2. Построить зависимость параметров распространения от величины проводимости между клетками.

3. На основе результатов предыдущего этапа выбрать высокое и низкое значение проводимости между клетками. Использовать первое для описания ситовидных элементов, а второе – для описания паренхимных клеток. Имитировать распространение ПД по неоднородной системе. Сохранить рисунок волны. Записать параметры распространения и сравнить их с параметрами для однородной системы.

4. Обобщить полученные результаты. Сделать выводы о связи проводимости между клетками с возбудимостью и скоростью распространения.

**Задание 2. Описание распространения ПД по симпласту с использованием детализированной модели ПД**

1. Запустить программу, описывающую распространение ПД при исходных значениях межклеточной проводимости. Через 30 с. модельного времени начать охлаждение стимулируемой зоны, записывать ответ в течение 80 с. модельного времени и открыть полученный файл.

2. Провести анализ параметров генерации ПД (порог, длительность, амплитуда, скорость де- и реполяризации, выход ионов из клетки и др.) в зоне воздействия и на удалении от нее. Также оценить скорость распространения ПД для разных пар ответов (на разных расстояниях от зоны стимуляции).

3. Уменьшить содержание  $Ca^{2+}$  в апопласте в 1000 раз для клеток вне зоны стимуляции (сделать их невозбудимыми). Повторить расчет модели.

4. Для параметров генерации провести анализ аналогичный описанном в пункте 2, но уже для пассивного распространения ПД. Вместо скорости распространения оценить затухание ответа, определить описывается ли этот процесс на основе кабельного уравнения, оценить кабельную постоянную.

5. Обобщить полученные результаты. Сравнить с экспериментом. Оценить степень соответствия модели эксперименту.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Необходимость математического моделирования потенциалов возбуждения у растений.
2. Применимость модели Ходжкина-Хаксли к описанию ПД у растений.
3. Ограничения использования модели Ходжкина-Хаксли при описании ПД у растений.
4. Детализированные модели генерации ПД у высших растений. Преимущества и ограничения.
5. Подходы к моделированию распространения ПД у высших растений.
6. Методы анализа уравнений модели ПД.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веселовский В. А., Веселова Т. В. Люминесценция растений. М.: Наука, 1990. 200с.
2. Воденеев В.А., Опритов В.А., Пятыгин С.С. Обратимое изменение внеклеточного рН при генерации потенциала действия у высшего растения *Cucurbita pepo* // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 583-545.
3. Воденеев В.А., Опритов В.А., Мысягин С.А., Пятыгин С.С. Дистанционные электрические сигналы у растений. Н.Новгород: 2007. 97 с.
4. Воденеев В.А., Акинчиц Е.К., Орлова Л.А., Сухов В.С. Анализ роли ионов  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$  и  $Cl^-$  в генерации переменного потенциала у растений тыквы // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 826-833.
5. Крупенина Н.А. Пространственная организация фотосинтетической активности и транспорта протонов в возбудимой растительной клетке // Автореф. дисс... канд. биол. наук. М: Из-во МГУ, 2008. 26 с.
6. Медведев С.С. Электрофизиология растений. СПб.: Изд-во СпбГУ, 1998. 184 с.
7. Опритов В.А. Функциональные аспекты биоэлектrogenеза у высших растений: 59-е Тимирязевское чтение. Н.Новгород: Изд-во ННГУ, 1998. 46 с.
8. Опритов В.А., Пятыгин С.С., Ретивин В.Г. Биоэлектrogenез у высших растений. М.: Наука, 1991. 216 с.
9. Пятыгин С.С., Опритов В.А., Воденеев В.А. Сигнальная роль потенциала действия у высших растений // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 312-319.
10. Пятыгин С.С. Электrogenез клеток растения в условиях стресса // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123. С. 552-562.

- 11.Пятыгин С.С. Распространяющиеся электрические сигналы в растениях // Цитология. 2008. Т. 50. С. 154–159.
- 12.Ретивин В.Г., Опритов В.А., Федулина С.Б. Преадаптация тканей стебля *Cucurbita* перо к повреждающему действию низких температур, индуцированная потенциалами действия // Физиология растений. 1997. Т. 44, №4. С. 499-510.
- 13.Сухов В.С., Пятыгин С.С., Опритов В.А., Крауз В.О. Влияние распространяющихся электрических сигналов на замедленную флуоресценцию листьев герани. I. Экспериментальный анализ // Биофизика. 2008. Т. 53. С. 470-474.
- 14.Сухов В.С., Пятыгин С.С., Опритов В.А., Крауз В.О. Влияние распространяющихся электрических сигналов на замедленную флуоресценцию листьев герани. II. Теоретический анализ // Биофизика. 2008. Т. 53. С. 672-678.
- 15.Сухов В.С., Неруш В.Н., Воденеев В.А. Исследование путей распространения потенциала действия у высших растений с использованием модели ФитцХью-Нагумо // Компьютерные исследования и моделирование. 2011. Т. 3. С. 77–84.
- 16.Beilby M.J. Action potential in charophytes // Int. Rev. Cytol. 2007. V. 257. P. 43-82.
- 17.Beilby M.J. Cl<sup>-</sup> channels in *Chara* // Phil. Trans. R. Soc. London B. 1982. V. 299. P. 435-445.
- 18.Bulychev A.A., Turovetsky V.B. Light-triggered changes of membrane potential in cells of *Anthoceros punctatus* and their relation to activation of chloroplast ATPase // J. Exp. Bot. 1983. V. 34. P. 1181-1188.
- 19.Communication in Plants. Neuronal Aspects of Plant Life / Eds Baluska F., Mancuso S., Volkmann D. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 2006. 438 p.
- 20.Felle H.H., Zimmermann M.R. Systemic signaling in barley through action potentials // Planta. 2007. V. 226. P. 203-214.
- 21.Fromm J., Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants // Plant, Cell and Environ. 2007. V. 30. P. 249–257.
- 22.Goltsev V., Chervov P., Zaharieva I., Lambrev P., Strasser R.J. Kinetics of delayed chlorophyll a fluorescence registered in milliseconds time range // Photosynth. Res. 2005. V. 84. P. 209-215.
- 23.Gradmann, D. Models for oscillations in plants // Aust. J. Plant. Physiol. 2001. V. 28. P. 577-590.

24. Krupenina N.A., Bulychev A.A. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1767. P. 781–788.
25. Pavlovic A., Slovakova L., Pandolfi C., Mancuso S. On the mechanism underlying photosynthetic limitation upon trigger hair irritation in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula Ellis*) // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 1991-2000.
26. *Plant Electrophysiology. Theory and Methods* / Ed. Volkov, A.G. Springer, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 2006. 508 p.
27. Sibaoka T. Rapid plant movements triggered by action potentials // *Bot. Mag. Tokyo*. 1991. V. 104. P. 73-95.
28. Sukhov V., Nerush V., Orlova L., Vodeneev V. Simulation of action potential propagation in plants // *J. Theor. Biol.* 2011. V. 291. P. 47-55.
29. Sukhov V., Vodeneev V. A mathematical model of action potential in cells of vascular plants // *J. Membr. Biol.* 2009. V. 232. P. 59-67.
30. Zimmermann M.R., Felle H.H. Dissection of heat-induced systemic signals: superiority of ion fluxes to voltage changes in substomatal cavities // *Planta*. 2009. V. 229. P. 539-547.

**БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ: БИОЭЛЕКТРОГЕНЕЗ У  
РАСТЕНИЙ.**

**Раздел большого практикума по биофизике**

Авторы:

Владимир Сергеевич **Сухов**  
Владимир Николаевич **Неруш**  
Веналий Александрович **Калинин**  
Владимир Олегович **Крауз**  
Владимир Анатолиевич **Воденеев**

Учебно-методическое пособие

Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования «Нижегородский государственный  
университет им. Н.И. Лобачевского».  
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Подписано в печать . Формат 60x84 1/16.  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.  
Усл. печ. л. . Уч.-изд. л. .  
Заказ № . Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии Нижегородского госуниверситета  
им. Н.И. Лобачевского  
603600, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37  
Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01