

Санкт-Петербургский государственный университет

С. С. МЕДВЕДЕВ

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ  
РАСТЕНИЙ

Учебное пособие

версия для сайта биолого-почвенного факультета СПбГУ

2012

Сведения об издании на физическом носителе:

УДК 577.3+581.1

ББК 28.57

М 32

Р е ц е н з е н т ы: канд. биол. наук, доцент В.Л.Журавлев (СПбГУ), канд. биол. наук И.Н.Ктиторова (Агрофизический НИИ РАСХН)

Аннотация

Медведев С.С. Электрофизиология растений: учебное пособие.-

СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета, 1997.

ISBN 5-228-01758-1

В учебном пособии представлено современное состояние знаний в области электрофизиологии растительного организма. Анализируются физико-химические основы электрогенеза клетки, механизмы активного и пассивного транспорта потенциалобразующих ионов. Приводятся основные электрофизиологические методы исследования растений. Рассматриваются различные формы биоэлектрической активности и роль электрических процессов в жизнедеятельности растительных организмов. Даются представления о раздражимости и возбудимости, о механизмах распространения возбуждения в проводящих тканях растений.

Учебное пособие предназначено для студентов биологических факультетов университетов, для специалистов в области физиологии растений, биофизики, ботаники.

## Оглавление

Введение: Формы электрической активности растений.....	5
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОГЕНЕЗА В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ .....	6
1.Электрохимический потенциал.....	6
2.Потенциал Нернста .....	7
3.Подвижность ионов и их потоки.....	8
4.Диффузионный потенциал .....	9
5.Мембранные потоки.....	11
6.Мембранный диффузионный потенциал - уравнение Гольдмана.....	12
7.Потенциал Доннана.....	14
8.Уравнение Уссинга-Теорелла.....	16
ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ .....	18
1.Транспортные АТФазы .....	18
2.Электрогенные и электронейтральные ионные насосы.....	21
3.Использование мембранных везикул для изучения ионного транспорта.....	22
4.Исследование пассивного транспорта ионов $K^+$ и $Na^+$ на мембранных везикулах .....	24
5.Изучение активного транспорта ионов $H^+$ и $Ca^{2+}$ на мембранных везикулах.....	25
6.Ионные каналы .....	27
7. $K^+$ -каналы .....	31
8. $Ca^{2+}$ -каналы .....	33
9.Анионные каналы.....	38
10. $Na^+$ -каналы .....	39
11.Механочувствительные ионные каналы .....	40
12.Ионофоры.....	41
13.Участие ионных каналов и насосов в сигнальной трансдукции.....	43
ПОТЕНЦИАЛЫ ПОКОЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ.....	47
1.Измерение потенциала покоя клетки .....	47
2.Зависимость потенциала покоя от ионной среды и энергетики клетки.....	49
3.Трансцеллюлярные градиенты электрических потенциалов .....	52
4.Суммация электрических свойств клеток в ткани .....	55
5. Градиенты электрических потенциалов органов и тканей растений .....	57
6. Электрокинетический потенциал течения .....	60
МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ ИОННЫХ ТОКОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ .....	62
1.Проводимость и электрическое сопротивление клетки.....	62
2.Метод фиксации потенциала.....	65

3.Метод внутриклеточной перфузии .....	67
4.Метод петч-кламп.....	68
ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ ПРОЦЕССОВ РОСТА, ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ И .....	72
РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ .....	72
1 .Эмбриогенез и дифференциация.....	72
2. Гравитропизм.....	75
3.Фототропизм .....	79
4.Электротропизм.....	80
5.Регенерация и корнеобразование.....	82
4.Действие фитогормонов на электрические характеристики растений .....	82
7.Участие градиентов биоэлектрических потенциалов в регуляции ростовых процессов..	86
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ХЛОРОПЛАСТАХ И МИТОХОНДРИЯХ.....	92
1.Светозависимая электрическая реакция растительных клеток и тканей.....	92
2. Методы исследования фотоэлектрических процессов в хлоропластах .....	94
3.Методы изучения электрохимических процессов в митохондриях .....	96
ИМПУЛЬСНАЯ ФОРМА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ .....	100
1.Процессы раздражимости и возбудимости у растений .....	100
2.Вариабельный потенциал .....	101
3.Потенциал действия .....	103
4.Электрические сигналы насекомоядных растений .....	109
5.Функциональная роль потенциала действия .....	113
6.Ритмические колебания биоэлектрических потенциалов .....	115
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА .....	122

## Введение: Формы электрической активности растений

В процессе жизнедеятельности растительные организмы обычно ориентируются на такие факторы внешней среды, как свет, температура, содержание  $\text{CO}_2$  уровень углекислоты в атмосфере, содержание минеральных элементов в почве и ее влагоемкость почвы. Наиболее важным фактором для процессов роста и развития растений, конечно же, является свет, его направление, качественные и количественные характеристики. Существуют, однако, еще по крайней мере два фактора внешней среды, которым до сих пор уделяется мало внимания и которые как правило не учитываются при анализе физиологии растительного организма. Имеются в виду электрическое поле атмосферы и электромагнитное поле Земли.

Все растительные организмы находятся под постоянным воздействием электрического поля атмосферы, которое при обычных погодных условиях характеризуется в основном положительным потенциалом, возрастающим в среднем на 130 В/м. Поскольку воздух является хорошим диэлектриком и содержит мало носителей электрических зарядов, плотность тока, определяемая электрическим полем атмосферы, невелика и составляет  $3 \cdot 10^{-16}$  А/см<sup>2</sup>. Экранирование растений от внешнего электрического поля при помещении их под сетку Фарадея приводит к замедлению ростовых процессов.

При изучении влияния магнитных полей на жизнедеятельность растений оказалось, что значительное ослабление геомагнитного поля Земли существенно снижает скорость ростовых процессов. При помещении растений в очень слабое магнитное поле (например, в 4000 раз слабее магнитного поля Земли) происходит резкое торможение их развития. Аналогичным образом действуют и магнитные поля высокой напряженности (1000-25000 эрстед), которые сильно угнетают рост растений или вызывают ростовые изгибы. Напротив, магнитные поля низкой напряженности стимулируют ростовые процессы, особенно в корневой системе растений. При этом важна ориентация (главным образом, корневой системы) относительно вектора магнитного поля: ориентированные по вектору магнитного поля корни растут быстрее, особенно по направлению к южному магнитному полюсу (Земли или магнита). Ритмичность протекания некоторых физиологических процессов в растениях в ряде случаев совпадает с изменениями электромагнитного поля Земли. Не исключено, что действие магнитного поля на биологические объекты может осуществляться через ферромагнитные включения, вероятно такие, как Fe-содержащие ферменты или, например, через белок ферритин, в состав которого входит несколько сотен атомов железа.

Основной электрической характеристикой растительной клетки является ее мембранный потенциал, который соответствует состоянию клетки во время физиологического покоя, когда обмен веществ находится в равновесном состоянии. Потенциал покоя представляет собой разность электрических потенциалов живой структуры (внутреннего содержимого клетки или ткани, существующих вне дополнительного воздействия на них каких-либо факторов) и окружающей нейтральной среды. Живые структуры всегда имеют более отрицательный заряд, чем среда. Мембранный потенциал определяет все типы электрической активности живых организмов.

Градиенты электрических потенциалов, регистрируемые между различными участками растительных тканей или между тканями и отражающие различный уровень обмена веществ на этих участках или в этих тканях, часто называют метаболическими потенциалами. Они представляют собой разности потенциалов покоя отдельных структурных звеньев ткани или тканей. По величине и по знаку метаболические потенциалы обычно изменяются медленно, хотя иногда можно наблюдать их скачки. Характерная особенность этих потенциалов - генерация их в процессе основного обмена

веществ, не искаженного явлениями возбуждения или повреждения. Метаболические потенциалы регистрируются между противоположными поверхностями тканей, между различными органами, расположенными вдоль продольной оси растения, и обуславливаются различной интенсивностью физиологических процессов. При этом участок с более интенсивным обменом становится более электроотрицательным по отношению к окружающим тканям (например, фотосинтезирующие органы, апикальные меристемы и т.д.). Однако апикальные части электроотрицательны только при незначительных расстояниях между точками измерения вдоль продольной оси, т.е. у невысоких растений. У древесных же, имеющих протяженную сосудистую систему, вершина электроположительна. Причина кроется в том, что у длинностебельных растений на разность потенциалов метаболического происхождения накладывается другой потенциал противоположного знака, вызванный электрокинетическими явлениями и называемый электрокинетическим потенциалом течения. Поэтому разность потенциалов, которая регистрируется вдоль продольной оси растения, представляет собой результат суммирования электрических потенциалов, формируемых не одним, а несколькими электрофизиологическими процессами, происходящими в растительном организме.

Потенциал течения возникает при токе электролита (транспирационном токе, токе метаболитов через проводящую систему растения). Он пропорционален перепаду гидростатического давления между апикальной и базальной частями растения и зависит от концентрации электролита и длины сосудов. Электрический потенциал, инициируемый потенциалом течения, будет всегда иметь положительное значение в направлении потока электролита.

Потенциал повреждения (вариабельный или демаркационный потенциал) представляет собой колебание электрических потенциалов, возникающее между поврежденным и неповрежденным (интактным) участком живого организма. Поврежденный участок всегда электроотрицателен по отношению к неповрежденному. По своему биологическому смыслу потенциал повреждения (вариабельный потенциал) напрямую связан с потенциалом действия, являясь причиной возникновения последнего.

Потенциал действия представляет собой изменения электрических потенциалов, возникающие в раздраженной ткани при появлении в ней волны возбуждения и переходе в активное состояние. Участок, где в данный момент времени находится волна возбуждения, электроотрицателен по отношению к участку, находящемуся в покое. В связи с перемещением волны возбуждения ток действия является переменным по направлению и по величине и образует двухфазную кривую, поэтому потенциал действия оценивают по временным и амплитудным параметрам. Он возникает только при воздействии пороговых и сверхпороговых раздражений. Амплитуда потенциала действия не зависит от силы раздражения, а длительность - от действия дополнительной стимуляции.

## Глава 1.

# ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОГЕНЕЗА В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

## 1. Электрохимический потенциал

Свободная энергия некоторого иона  $j$  определяется величиной его электрохимического потенциала  $\mu_j$  и зависит от активности иона  $a_j$  и электрического потенциала  $E$  системы:

$$\mu_j = \mu_j^* + RT \ln a_j + z_j F E. \quad (1)$$

Где  $\mu_j^*$  - электрохимический потенциал иона  $j$  в стандартных условиях;  $z_j$  - заряд иона;  $F$  - число Фарадея;  $E$  - электрический потенциал системы, содержащей данный ион (величина  $E$  не является характеристикой иона, а зависит от общего электролитного состава данного участка системы);  $R$  - газовая постоянная;  $T$  - абсолютная температура, К. Электрохимический потенциал имеет размерность энергии на единицу количества вещества и обычно выражается в Дж/моль.

Активность вещества  $a_j$  связана с его концентрацией  $c_j$  с помощью коэффициента активности  $\gamma_j$ :

$$a_j = \gamma_j C_j. \quad (2)$$

Коэффициент активности можно рассматривать как поправочный коэффициент, оценивающий отклонения свойств вещества от его свойств в идеальном растворе, поскольку термодинамическая активность иона обычно меньше его концентрации. Для идеальных растворов  $\gamma_j = 1$ , и активность вещества равна его концентрации (такая ситуация может наблюдаться в случае очень разбавленных водных растворов). В клетках живых организмов активность ионов обычно больше, чем в наружном растворе, поэтому составляющая  $RT \ln a_j$ , описывающая вклад активности в электрохимический потенциал является движущей силой, например, для ионов  $K^+$  в сторону внешней среды.

Электрический потенциал  $E$  системы в некоторой ее точке используется для описания относительного количества электрической энергии, которой обладает заряженное вещество в этой точке. Это энергия, необходимая для переноса положительного заряда из этой точки в область нулевого потенциала. Если выразить заряд в кулонах (Кл), а потенциал в вольтах (В), то количество работы (Дж) по переносу иона равно произведению его заряда на разность электрических потенциалов (конечный потенциал минус начальный). Протон, например, имеет заряд  $1,6021 \cdot 10^{-19}$  Кл. 1 моль протонов, т.е. число протонов, равное числу Авогадро ( $6,02252 \cdot 10^{23}$ ), будет иметь заряд равный  $(1,6021 \cdot 10^{-19}) \cdot (6,02252 \cdot 10^{23}) = 96487$  Кл. Эта величина называется числом Фарадея (см. уравнение (1)).

Переносимый ионом  $j$  заряд  $z_j$  выражается положительным или отрицательным целым числом, которое обозначает число элементарных электрических зарядов, присущих одному иону. Например,  $z_j$  равно +1 для катиона  $K^+$  и -2 для сульфат-иона ( $SO_4^{2-}$ ).

Цитоплазма живых клеток заряжена отрицательно по отношению к наружной среде, т.е. существует разность электрических потенциалов, которая может служить движущей силой ионного транспорта. При этом облегчается поступление катионов (в том числе и калия) внутрь клетки и выход из нее анионов. Поэтому в клетках существуют специальные механизмы поддержания ионного гомеостаза, которые будут рассмотрены в следующих главах.

Таким образом, в уравнение (1) входят две составляющие: химическая ( $RT \ln a_j$ ) и чисто электрическая ( $z_j FE$ ). В состоянии равновесия эти двесоставляющие сбалансированы, и суммарный поток ионов отсутствует. Обычно концентрации, а следовательно, и химические потенциалы большинства ионов в клеточных компартментах неодинаковы, что является причиной их пассивного диффузного перемещения в сторону более низкого электрохимического потенциала.

## 2. Потенциал Нернста

Проанализируем взаимосвязь между разностью потенциалов с обеих сторон мембраны и соответствующим этой разности распределением ионов при равновесии.

Если концентрации ионов некоторого вещества  $j$  по обе стороны мембраны одинаковы, то их электрохимические потенциалы внутри (i) и снаружи (o) равны:  $\mu_j^i = \mu_j^o$ . Используя уравнение (1), условие равновесия ионов  $j$  по обе стороны мембраны будет выглядеть следующим образом:

$$\mu_j^* + RT \ln a_j^i + z_j F E^i = \mu_j^* + RT \ln a_j^o + z_j F E^o. \quad (3)$$

Член  $\mu_j^*$  в уравнении (3) является константой, относящейся к одному и тому же стандартному состоянию вещества  $j$ , находящегося по обе стороны мембраны, поэтому его можно исключить. Решив уравнение (3) относительно трансмембранной разности потенциалов  $E^i - E^o$  при равновесии получаем:

$$z_j F (E^i - E^o) = RT (\ln a_j^o - \ln a_j^i), \quad (4)$$

$$E_{N(j)} = E^i - E^o = \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{a_j^o}{a_j^i} \quad (5)$$

Разность электрических потенциалов  $E_{Nj}$  в уравнении (5) называется потенциалом Нернста для вещества  $j$ . Уравнение Нернста справедливо для равновесных условий и показывает, как связана активность ионов вещества  $j$  в наружном и внутреннем растворе с разностью потенциалов на мембране, которая эти растворы разделяет. Для удобства расчетов натуральный логарифм  $\ln$  часто заменяют на десятичный ( $2,303 \lg$ ). Величина  $2,303 RT/F$  при  $20^\circ\text{C}$  равна  $58,16$  мВ, при  $25^\circ\text{C}$  -  $59,25$  мВ и при  $30^\circ\text{C}$  -  $60,2$  мВ. Используя эти численные значения, потенциал Нернста можно выразить в более удобной форме. Например, если при температуре  $25^\circ\text{C}$   $a_j^o/a_j^i=10$ , то разность потенциалов равна  $59,25$  мВ.

Потенциал Нернста для ионов  $K^+$  во многих растительных клетках близок к разности потенциалов, измеренной, например, на плазматической мембране. В этом случае калий действительно находится в равновесных условиях по обе стороны мембраны, и его мембранный транспорт может осуществляться пассивно по градиенту электрического потенциала. Сравнение мембранного потенциала  $E_M$ , измеренного на какой-либо мембране, с потенциалом Нернста, рассчитанным на основе измерения концентраций иона по обе стороны мембраны, позволяет вычлнить пассивный транспорт ионов. Когда ионы не могут проникать через мембрану или активно перемещаться,  $E_{Nj}$  будет значительно отличаться от  $E_M$ . В этом случае минимальное количество энергии, необходимое для транспорта ионов через мембрану, пропорционально разности  $E_{Nj}-E_M$ .

Возможность использования уравнения Нернста для растительных объектов хорошо иллюстрируют данные Воробьева, полученные на *Chara australis* с помощью сконструированного им  $K$ -селективного электрода.

Активность ионов  $K^+$  в среде ( $a_K^o$ ) была равна  $0,096$  ммоль/л, активность калия в клетке ( $a_K^i$ ) составила  $48$  ммоль/л. Потенциал Нернста для ионов калия при температуре  $20^\circ\text{C}$  равен:

$$E_N = 58,2 \lg(0,096/48) = 58,2 \lg 0,002 = 157 \text{ мВ.}$$

Фактически измеренный мембранный потенциал был равен  $155$  мВ, что очень близко к вычисленному потенциалу Нернста для ионов калия. Таким образом, калий, по-видимому, находится в равновесии между наружным раствором и вакуолью.

### 3.Подвижность ионов и их потоки

Через биологические мембраны постоянно проходят потоки различных растворенных веществ. Поток  $I_j$  вещества  $j$  будет направлен в область с более низким электрохимическим потенциалом. В качестве движущей силы при этом будет выступать градиент химического потенциала вещества  $j$  ( $\frac{d\mu_j}{dx}$ ). Величина потока пропорциональна



также локальной концентрации вещества  $j$  ( $C_j$ ) и его подвижности ( $u_j$ ). Подвижность вещества есть отношение скорости перемещения вещества к силе, вызывающей его движение. Для одномерного случая пересечения плоскости, перпендикулярной к оси  $x$ , поток  $I_j$  можно выразить следующим образом:

$$I_j = u_j C_j \left( \frac{-d\mu_j}{dx} \right). \quad (6)$$

Знак "минус" означает, что суммарный положительный поток направлен в сторону уменьшающегося электрохимического потенциала.

Продифференцируем уравнение (1) по  $x$

$$\begin{aligned} \frac{d\mu_j}{dx} &= RT \frac{d \ln a_j}{dx} + z_j F \frac{dE}{dx} = RT \frac{1}{a_j} \cdot \frac{da_j}{dx} + z_j F \frac{dE}{dx} = \\ &= RT \frac{1}{\gamma_j C_j} \cdot \frac{d\gamma_j C_j}{dx} + z_j F \frac{dE}{dx} \end{aligned}$$

и подставим это выражение в уравнение потока (6):

$$\begin{aligned} I_j &= u_j C_j \left( -RT \frac{1}{\gamma_j C_j} \cdot \frac{d\gamma_j C_j}{dx} - z_j F \frac{dE}{dx} \right) = \\ &= -\frac{u_j RT}{\gamma_j} \cdot \frac{d\gamma_j C_j}{dx} - u_j C_j z_j F \frac{dE}{dx}. \end{aligned} \quad (7)$$

Соотношение (7) называется уравнением общего потока, движущими силами этого потока являются градиенты активности и электрического потенциала. Если коэффициент активности  $\gamma_j$  изменяется при переходе через мембрану, можно считать, что  $\frac{d\gamma_j}{dx}$  представляет собой движущую силу, действующую на вещество  $j$ . Если  $\gamma_j$  величина постоянная, первый член уравнения (7) превращается просто в  $u_j RT \frac{dC_j}{dx}$ , т.е. пропорционально градиенту концентрации.

В отсутствие градиентов электрического потенциала ( $\frac{dE}{dx}=0$ ) или для нейтральных растворенных веществ ( $z_j=0$ ) поток будет равен

$$I_j = u_j RT \cdot \frac{dC_j}{dx}$$

Легко заметить, что этот тип потока описывается 1 законом Фика

$$I_j = D \frac{dC_j}{dx}$$

и  $u_j RT$  есть коэффициент диффузии  $D$ .

В отличие от нейтральных веществ, поток заряженных частиц зависит также и от электрической движущей силы  $\frac{dE}{dx}$ . При наличии градиента электрического потенциала заряженные частицы будут спонтанно перемещаться.

#### 4. Диффузионный потенциал

Если в некоторой области присутствует определенный вид ионов, а в соседней области они отсутствуют или концентрация их мала, то ионы будут диффундировать в эту область. По мере того, как заряженные частицы диффундируют в область более низкой концентрации, возникает разность потенциалов, которую называют диффузионным потенциалом. Мембранные потенциалы в значительной мере являются диффузионными, возникающими вследствие различия скоростей передвижения различных ионов через мембрану.

Используем теперь уравнение потока для вывода разности потенциалов, создаваемой ионами, диффундирующими в соответствии с градиентом концентрации в растворе, который содержит один вид катионов и один вид анионов. Предположим, что вначале катионы и анионы сконцентрированы в одной части раствора. Со временем они диффундируют в область раствора с более низкой концентрацией. Как правило один из ионов обладает большей подвижностью, чем другой, и эти ионы диффундируют быстрее, чем противоположно заряженные. В результате будет происходить микроскопическое разделение зарядов и возникнет диффузионный потенциал. Рассчитаем возникающую при этом разность потенциалов.

Для удобства рассмотрим случай, когда в некотором растворе присутствуют только два одновалентных иона - катион (+) и анион (-). Примем, что коэффициенты активности этих ионов постоянны, и будем оперировать их концентрациями  $c$ . Известно, что растворы электронейтральны, поэтому концентрация катионов  $c_+$  равна концентрации  $c_-$  и может быть выражена через  $c$ . Поскольку со временем не развивается никакого дисбаланса зарядов, то поток катионов через некоторую плоскость в растворе равен потоку анионов. В действительности же очень небольшой дисбаланс зарядов, который собственно и порождает градиент электрических потенциалов, все же развивается, но этот несбалансированный поток скоропреходящ и пренебрежимо мал по сравнению с  $I_+$  и  $I_-$ . Оба потока  $I_+$  и  $I_-$  можно выразить с помощью уравнения общего потока(7), а затем приравнять друг к другу.

$$-u_+ RT \frac{dC}{dx} - u_+ CF \frac{dE}{dx} = -u_- RT \frac{dC}{dx} + u_- CF \frac{dE}{dx}, \quad (8)$$

откуда

$$\begin{aligned} u_- RT \frac{dC}{dx} - u_+ RT \frac{dC}{dx} &= u_- CF \frac{dE}{dx} + u_+ CF \frac{dE}{dx} \\ RT \frac{dC}{dx} (u_- - u_+) &= CF \frac{dE}{dx} (u_- + u_+) \end{aligned}$$

Окончательно получим

$$\frac{dE}{dx} = \frac{(u_- - u_+)}{(u_- + u_+)} \cdot \frac{RT}{FC} \cdot \frac{dC}{dx}, \quad (9)$$

т.е.  $\frac{dE}{dx} \neq 0$  в том случае, когда отличаются подвижности аниона  $u_-$  и катиона  $u_+$ . Если больше  $u_- > u_+$ , анионы диффундируют быстрее катионов, и возникает разность потенциалов, стремящаяся ускорить движение катионов и замедлить движение анионов. Для расчета этой разности потенциалов необходимо выражение (9) проинтегрировать. При переходе из области I раствора в область II изменение электрического потенциала равно  $\int_I^{II} \frac{\partial E}{\partial x} dx$  или  $E^I - E^{II}$ , а изменение концентрации равно  $\int_I^{II} \frac{1}{C} \cdot \frac{\partial C}{\partial x} dx$  или  $\ln(c^{II}/c^I)$ . Используя эти два соотношения, получаем уравнение диффузионного потенциала (при 25°C) в следующем виде:

$$E_D = E^I - E^{II} = 59,2 \frac{u_- - u_+}{u_- + u_+} \lg \frac{C^{II}}{C^I} \text{ [мВ]}. \quad (10)$$

В общем случае катионы и анионы имеют различные подвижности. Поэтому, когда ионы диффундируют в область раствора с более низким электрохимическим потенциалом, на градиент концентрации накладывается разность потенциалов, выражающаяся уравнением (10) и называемая диффузионным потенциалом.

Диффузионный потенциал всегда возникает на открытых концах солевых мостиков, которые используют для измерения электрических потенциалов. Для того чтобы оценить величину этого нежелательного в эксперименте, но всегда присутствующего потенциала, представим себе ситуацию, когда концентрации электролита на концах солевого мостика

различаются в 100 раз. Рассчитаем величину диффузионного потенциала электролита NaCl. Отношение подвижностей  $u_{Cl}/u_{Na} = 1,52$ , отсюда  $(u_- - u_+)/ (u_- + u_+) = 0,52/2,52 = 0,21$ . Диффузионный потенциал при переходе из раствора NaCl с концентрацией 100 ммоль/л к раствору с концентрацией 1 ммоль/л, рассчитанный по уравнению (10), будет равен:  $59,2 \cdot 0,21 \lg 1/100 = -25$  мВ.

При измерении мембранных потенциалов биологических мембран такое значение диффузионного потенциала на концах солевого мостика недопустимо велико, поэтому NaCl не может использоваться в качестве электролита при изготовлении электродов.

При использовании такого электролита, как KCl, отношение подвижностей  $u_{Cl}/u_K = 1,04$  и, следовательно,  $(u_- - u_+)/ (u_- + u_+) = 0,04/2,04 = 0,02$ . Стократный градиент концентрации KCl приведет к диффузионному потенциалу  $59,2 \cdot 0,02 \lg (1/100) = -2$  мВ. Таким образом KCl является более подходящим электролитом для заполнения микроэлектродов, поскольку позволяет сводить диффузионный потенциал до минимума при измерении мембранных потенциалов биологических мембран.

## 5. Мембранные потоки

Мембранный потенциал так же, как и диффузионный, зависит от различной подвижности ионов в растворе, только в этом случае раствором, в котором происходит диффузия, является сама мембрана. Для того чтобы рассчитать диффузионный мембранный потенциал были сделаны следующие допущения (на основании этих допущений затем Гольдман вывел уравнение диффузионного потенциала для мембраны).

Во-первых, электрический потенциал  $E_M$  находится в обратной линейной зависимости от толщины мембраны  $\Delta x$ . Это означает, что  $\frac{dE}{dx}$  есть константа, равная  $E_M/\Delta x$ . Во-вторых, коэффициент активности  $\gamma_j$  вещества  $j$  постоянен в мембране. И, в-третьих, для того чтобы определить концентрации вещества по обе стороны мембраны, необходимо ввести коэффициент распределения его в мембране  $k_j$ , так как свойства мембраны как растворителя отличаются от свойств водных растворов. Таким образом,  $c_j$  в уравнении потока надо заменить на величину  $k_j c_j$ . Введя эти условия и упрощения, уравнение общего потока (7) можно переписать в виде (перенеся член, отражающий электрические взаимодействия, в левую сторону)

$$u_j k_j C_j z_j F \frac{E_M}{\Delta x} + I_j = -u_j RT k_j \frac{dC_j}{dx}.$$

Решив его относительно  $I_j$ , получаем выражение для суммарного потока вещества  $j$  через мембрану. Суммарный поток вещества  $I_j$  складывается из оттока  $I_j^{out}$  и притока  $I_j^{in}$ :

$$I_j = I_j^{in} - I_j^{out} = \frac{u_j k_j z_j F E_M}{\Delta x} \cdot \frac{1}{e^{z_j F E_M / RT} - 1} \times \\ \times (C_j^{out} - C_j^{in} \cdot e^{z_j F E_M / RT}). \quad (11)$$

Это уравнение показывает, как зависит поток заряженных частиц  $j$  от их концентрации в наружном и внутреннем растворах и от разности потенциалов между двумя сторонами мембраны. Оно используется при выводе уравнения Гольдмана, а также уравнения Уссинга-Теорелла (последнее позволяет судить о том, является ли перенос данного иона через мембрану активным или пассивным процессом).

## 6. Мембранный диффузионный потенциал - уравнение Гольдмана

Пассивные потоки веществ через мембрану, описываемые уравнением (11) являются причиной возникновения разности потенциалов на мембране - мембранного диффузионного потенциала, который можно определить, рассмотрев вклады всех ионных потоков, проходящих через мембрану. В обычных условиях не все анионы и катионы легко проникают через мембрану. Многие двухвалентные катионы не могут легко войти или выйти из клетки пассивным путем, а это означает, что подвижность их в мембране очень мала. Такие ионы не вносят обычно большого вклада в ионные потоки через плазмалемму, чтобы заметно влиять на мембранный диффузионный потенциал. Поэтому при выводе уравнения их можно опустить.

Для многих растительных клеток общий поток ионов складывается главным образом из перемещения ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ , которые имеются внутри и снаружи растительных клеток в больших концентрациях. Конечно, в некоторых случаях возможен ощутимый поток других ионов, например  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $OH^-$ ,  $HCO_3^-$ . Мы, однако, ограничимся тремя ионами ( $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ ) ради простоты рассмотрения. Реальным оправданием этого может служить то, что диффузионные потенциалы, рассчитанные на основании пассивных потоков этих трех ионов через биологические мембраны, часто хорошо согласуются с измеряемой величиной мембранного потенциала.

Если на мембране существует определенная постоянная разность потенциалов, то это значит, что суммы пассивных потоков анионов и катионов через мембрану должны быть равны:

$$I_K + I_{Na} = I_{Cl} \quad \text{или} \quad I_K + I_{Na} + I_{Cl} = 0. \quad (12)$$

Подставим в это уравнение значения потоков для каждого из ионов и решим его относительно  $E_M$ . Однако перед тем, как решать, введем коэффициент проницаемости  $P_j$  для вещества  $j$  через мембрану, поскольку коэффициент проницаемости это практически единственная измеряемая величина, характеризующая способность интересующего нас вещества проникать через мембрану. Коэффициент диффузии  $D_j$  может варьировать с расстоянием, пройденным веществом в мембране, а величина  $x$  необязательно равна толщине мембраны и ее трудно измерить; коэффициент распределения вещества  $k_j$  обычно рассчитывают, используя в качестве липидной фазы оливковое масло, а не истинные липиды, что вводит некоторую неопределенность в  $k_j$ . Следовательно, коэффициент проницаемости (размерность см/с) - это очень полезный параметр для описания диффузии вещества через мембрану, к тому же его можно определить используя уравнение диффузии  $P_j = D_j k_j / D x$ .

Коэффициент диффузии  $D_j$  можно заменить на величину  $u_j RT$  (см. с. 17), поэтому  $P_j = u_j RT k_j / D x$ .

Введем  $P_j$  в уравнение потока (11), разделив числитель и знаменатель первого члена на  $RT$ :

$$I_j = \frac{P_j z_j F E_M}{RT} \cdot \frac{1}{e^{z_j F E_M / RT} - 1} \cdot (C_j^{out} - C_j^{in} \cdot e^{z_j F E_M / RT}).$$

Подставим в уравнение (12) значение потоков для каждого иона и решим его относительно  $E_M$ . Предварительно вынесем за скобки выражение  $F E_M / RT$  и сократим на него, а  $z_K$  и  $z_{Na}$  заменим на +1 и  $z_{Cl}$  - на -1:

$$P_K \cdot \frac{1}{e^{FE_m/RT} - 1} (C_K^{out} - C_K^{in} \cdot e^{FE_m/RT}) + \\ + P_{Na} \cdot \frac{1}{e^{FE_m/RT} - 1} (C_{Na}^{out} - C_{Na}^{in} \cdot e^{FE_m/RT}) + \\ + P_{Cl} \cdot \frac{1}{e^{-FE_m/RT} - 1} (C_{Cl}^{out} - C_{Cl}^{in} \cdot e^{-FE_m/RT}) = 0.$$

Вынесем за скобки выражение  $1/e - 1$  из всех трех слагаемых и сократим на него. Тогда будем иметь:

$$P_K \cdot (C_K^{out} - C_K^{in} \cdot e^{FE_m/RT}) + P_{Na} \cdot (C_{Na}^{out} - C_{Na}^{in} \cdot e^{FE_m/RT}) - \\ - P_{Cl} \cdot e^{FE_m/RT} (C_{Cl}^{out} - C_{Cl}^{in} \cdot e^{-FE_m/RT}) = 0, \\ P_K C_K^{out} - P_K C_K^{in} e^{FE_m/RT} + P_{Na} C_{Na}^{out} - P_{Na} C_{Na}^{in} \cdot e^{FE_m/RT} - \\ - P_{Cl} C_{Cl}^{out} \cdot e^{FE_m/RT} + P_{Cl} C_{Cl}^{in} = 0.$$

Решив это уравнение относительно  $e^{FE_m/RT}$  и прологарифмировав его, получаем следующее выражение для разности электрических потенциалов через мембрану:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K C_K^{out} + P_{Na} C_{Na}^{out} + P_{Cl} C_{Cl}^{in}}{P_K C_K^{in} + P_{Na} C_{Na}^{in} + P_{Cl} C_{Cl}^{out}} \quad (13)$$

Уравнение (13) называется уравнением Гольдмана (или уравнением постоянного поля) и позволяет определить диффузионный потенциал на мембране. Оно выведено из предположения пассивного перемещения  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$  через мембрану, для которой  $\frac{dE}{dx}$ ,  $Y_j$ ,  $I_j$  и  $u_j$  - константы. Движущей силой, создающей поток этих ионов через мембрану, является градиент электрохимического потенциала, который возникает вследствие различных подвижностей ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$  при их диффузии через мембрану в сторону более низкого потенциала.

В определенных случаях коэффициенты проницаемости, а также внешние и внутренние концентрации  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$  могут быть измерены и тогда возникает возможность экспериментально проверить справедливость уравнения Гольдмана.

Таблица 1. Концентрации, потенциалы и потоки различных ионов (пмоль/(см<sup>2</sup>·с)) для клеток *Nitella translucens*, измеренные на свету и в темноте [McRobbie, 1969]

Ион	$C_j^{out}$	$C_j^{in}$	$E_{N(j)}$ мВ	$C_j^{out}/C_j^{in} \cdot e^{z_j FE_m/RT}$	$I_j^{in}$	$I_j^{out}$	$I_j^{in}$	$I_j^{out}$
	ммоль/л				на свету		в темноте	
$Na^+$	1,0	14	-67	17	0,55	0,55	0,55	0,10
$K^+$	0,1	119	-179	0,20	0,85	0,85	0,20	0,85
$Cl^-$	1,3	65	99	0,000085	0,85	0,85	0,50	-

В табл. 1 приведены данные МакРобби, которая попыталась оценить возможность использования уравнения Гольдмана для расчета мембранного потенциала у клеток харовых водорослей.  $P_{Na}/P_K$  было оценено как 0,18,  $P_{Cl}/P_K = 0,003$ . Тогда относительные значения проницаемости плазмалеммы по отношению к калию составили:  $P_K=1,0$ ,  $P_{Na} = 0,18$ ,  $P_{Cl} = 0,003$ . Концентрации ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$  приведены в таблице. Подставим все эти значения в уравнение (13):

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{1,0 \cdot 0,1 + 0,18 \cdot 1,0 + 0,003 \cdot 65}{1,0 \cdot 119 + 0,18 \cdot 14 + 0,003 \cdot 1,3} = 58,2 \lg \frac{0,475}{121,5} = \\ + 58,2 \lg 0,00391 = -140 \text{ мВ}$$

Таким образом, следует ожидать, что цитоплазма будет заряжена отрицательно по отношению к внешнему раствору (что и наблюдается в действительности). Фактически измеренная величина разности электрических потенциалов на плазматической мембране *Nitella translucens* составила -138 мВ. Столь хорошее соответствие между наблюдаемой разностью потенциалов и рассчитанной по уравнению Гольдмана служит подтверждением того, что мембранный потенциал является диффузионным потенциалом. Это положение легко проверить, изменяя концентрации ионов в растворе и контролируя мембранный потенциал (см. с.28а). Анализ относительной проницаемости мембраны для различных ионов показывает, что основной вклад в разность потенциалов на плазматической мембране клеток нителлы вносят потоки ионов калия и натрия, а ион хлора играет второстепенную роль. Поэтому если в уравнении Гольдмана опустить члены, учитывающие поток ионов хлора, расчетное значение  $E_M$  будет равно -153 мВ.

Таким образом, на величину диффузионного потенциала влияют свойства и физиологическое состояние конкретной мембраны, внешние и внутренние концентрации  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ , в особых случаях, как мы уже отмечали, и других ионов. Тем не менее ограничение числа ионов тремя рассмотренными оказалось достаточным для определения диффузионного потенциала многих мембран. Однако попытки связать мембранный потенциал только с пассивной диффузией ионов удаются не во всех случаях.

## 7. Потенциал Доннана

В биологических системах некоторая доля разности потенциалов может быть обусловлена зарядами, иммобилизованными (или фиксированными) на некоей твердой фазе, граничащей с водной средой. Этот особый вид диффузионного потенциала называется доннановским.

Примером твердой фазы, на которой возникает в растениях потенциал Доннана, является клеточная стенка. Пектин и некоторые другие соединения клеточной стенки содержат большое число иммобилизованных карбоксильных групп ( $-COOH$ ), диссоциация которых с отщеплением протона придает клеточной стенке суммарный отрицательный заряд, что способствует притяжению к ней катионов, например  $Ca^{2+}$ . Общий эффект заключается при этом в обмене  $H^+$  на  $Ca^{2+}$ . В результате этого притяжения в клеточной стенке существует более высокое осмотическое давление, чем в окружающем водном растворе.

Область, содержащую иммобилизованные заряженные частицы, называют доннановской фазой (рис.1). При равновесии между доннановской фазой и прилегающим водным раствором возникает электрический потенциал - потенциал Доннана. По отношению к наружному раствору потенциал клеточной стенки отрицателен. Если иммобилизованные или фиксированные ионы расположены в плоском слое, то в прилегающем слое концентрируются подвижные ионы противоположного знака - возникающее в результате образование называется двойным электрическим слоем. Слои, содержащие катионы, часто образуются в водных растворах с каждой стороны биологической мембраны, которая обычно выступает в качестве доннановской фазы, несущей суммарный отрицательный заряд.

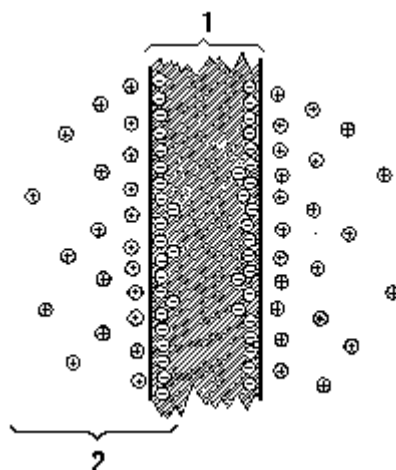


Рис. 1. Распределение положительно заряженных ионов с обеих сторон доннановской фазы (1), в которую погружены иммобилизованные отрицательные заряды.  
2 – двойной отрицательный слой.

Доннановские фазы встречаются также и в цитоплазме, где возникновение иммобилизованных зарядов часто обусловлено белками, которые оказываются фиксированными в цитоплазме, поскольку не могут свободно диффундировать ни через плазмалемму, ни через тонопласт. Цитоплазма содержит большое количество белковых молекул, которые, как известно, являются биполярными соединениями, причем при рН, свойственном цитоплазме, многие из них несут суммарный отрицательный заряд.

Рассмотрим систему, в которой имеются два отсека, разделенных мембраной, непроницаемой для белков. Вначале в отсеке in содержится некоторое количество отрицательно заряженного белка и эквивалентное ему количество ионов  $K^+$ . Отсек out содержит раствор KCl. Мембрана легко проницаема и для  $K^+$  и для  $Cl^-$ . Через некоторое время в системе установится равновесие. Часть ионов  $Cl^-$  диффундирует в отсек in из отсека out вместе с ионами  $K^+$ , поэтому концентрация  $K^+$  в отсеке in возрастет. Вследствие неспособности белков диффундировать через мембрану и стремления ионов калия, концентрация которого в цитоплазме очень велика, переходить в окружающий клетку раствор, в цитоплазме возникает отрицательный электрический потенциал, который будет препятствовать поступлению ионов  $Cl^-$  внутрь. Таким образом, в условиях равновесия будет существовать определенная несбалансированность подвижных ионов между отсеками, разделенными мембраной. Это явление известно, как эффект Гиббса-Доннана. При суммарной концентрации белка в клетке 100 мэкв в состоянии равновесия мембранный потенциал, обусловленный асимметричным распределением подвижных ионов, составит -12 мВ. Это величина незначительная по сравнению с мембранными потенциалами большинства клеток растений, однако она близка к значениям равновесных мембранных потенциалов некоторых бактерий. Потенциал Доннана можно оценить по формуле:

$$E_d = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_K^{out}}{C_K^{in}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_a^{in}}{C_a^{out}}, \quad (14)$$

где  $c_K$  и  $c_A$  - концентрация катиона и аниона соответственно. Как видно данное выражение тождественно потенциалу Нернста для одновалентных ионов:

Таким образом, потенциал Доннана можно рассматривать как разновидность диффузионного потенциала, возникающего в том случае, когда подвижные ионы стремятся диффундировать от зарядов противоположного знака, закрепленных в твердой доннановской фазе. В конечном счете  $E_d$  зависит от метаболической энергии, которая расходуется на синтез белков, пектатов и других заряженных макромолекул.

## 8. Уравнение Уссинга-Теорелла

Для измерения мембранных потоков ионов часто применяют изотопный метод. Чтобы оценить приток некоторого иона  $I_j^{\text{in}}$  в клетку, кусочек ткани помещают в раствор, содержащий этот ион в радиоактивной форме  $j^*$ . В начальный момент концентрация иона  $j^*$  внутри клеток равна нулю ( $c_{j^*}^{\text{in}} = 0$ ), и поток ионов  $j^*$  наружу будет равен нулю ( $I_{j^*}^{\text{out}} = 0$ ). В этом случае суммарный поток ионов  $j$  через мембрану, который складывается из притока его в клетку и оттока наружу ( $I_j = I_j^{\text{in}} + I_j^{\text{out}}$ ) зависит только от концентрации иона  $j^*$  снаружи ( $c_{j^*}^{\text{out}}$ ) и определяется притоком вещества внутрь ( $I_{j^*}^{\text{in}}$ ). Его можно выразить, используя уравнение (11):

$$I_j = \frac{u_j k_j z_j F E_M RT}{\Delta x RT} \cdot \frac{1}{e^{z_j F E_M / RT} - 1} \cdot C_j^{\text{out}} = I_j^{\text{in}}.$$

После того, как радиоактивный ион  $j^*$  проник в клетку и некоторое его количество уже начинает выходить из нее, изотоп из наружного раствора удаляют. При такой ситуации отток изотопа из клетки будет целиком зависеть только от концентрации ионов  $j$  внутри ( $c_j^{\text{in}}$ ), поскольку  $c_j^{\text{out}} = 0$ . Поэтому суммарный поток ионов  $j$  будет равен:

$$I_j = \frac{u_j k_j z_j F E_M RT}{\Delta x RT} \cdot \frac{1}{e^{z_j F E_M / RT} - 1} \cdot C_j^{\text{in}} \cdot e^{z_j F E_M / RT} = I_j^{\text{out}}.$$

Отношение двух потоков выразится весьма просто:

$$\frac{I_j^{\text{in}}}{I_j^{\text{out}}} = \frac{C_j^{\text{out}}}{C_j^{\text{in}} \cdot e^{z_j F E_M / RT}}. \quad (15)$$

Это уравнение было выведено независимо Уссингом и Теореллом и называется уравнением Уссинга-Теорелла, или уравнением отношения потоков. Оно позволяет судить, пассивным или активным является перенос данного иона, хотя строго оно соблюдается только для пассивных потоков. Для оценки активных потоков через мембрану используется особый случай этого уравнения. Прологарифмируем обе части (15) и умножим их на  $RT$ :

$$RT \ln (I_j^{\text{in}} / I_j^{\text{out}}) = RT \ln (C_j^{\text{out}} / C_j^{\text{in}}) - z_j F E_M.$$

$E_M$  заменили на  $E^{\text{out}} - E^{\text{in}}$ . И, поскольку коэффициенты активности вещества  $j$  снаружи и внутри клетки одинаковы ( $\gamma_j^{\text{out}} = \gamma_j^{\text{in}}$ ), можем заменить  $\ln(c_j^{\text{out}}/c_j^{\text{in}})$  на  $\ln(a_j^{\text{out}}/a_j^{\text{in}})$ . Окончательно уравнение принимает вид:

$$RT \ln a_j^{\text{out}} + z_j F E^{\text{out}} - RT \ln a_j^{\text{in}} - z_j F E^{\text{in}} = \mu_j^{\text{out}} - \mu_j^{\text{in}}.$$

Из этого выражения следует, что отличие от единицы отношения потоков (см. уравнение (15)) вызывается различными электрохимическими потенциалами вещества  $j$  по обе стороны мембраны. При  $m_j^{\text{out}} = m_j^{\text{in}}$ , суммарный активный поток вещества  $j$  через мембрану отсутствует. Это же условие  $m_j^{\text{out}} = m_j^{\text{in}}$  описывается уравнением (3), которое было использовано для вывода уравнения Нернста (5). Поэтому суммарный активный поток вещества отсутствует, если мембранный потенциал равен потенциалу Нернста ( $E_M = E_N$ ). В этом случае приток иона внутрь и его отток наружу равны ( $I_j^{\text{in}} = I_j^{\text{out}}$ ), и, следовательно, перенос иона с одной стороны мембраны на другую не требует расхода энергии. Если эти равенства не выполняются, ионы, по-видимому, не переносятся через мембрану пассивно или движутся независимо друг от друга.

Для оценки активного транспорта ионов в клетках *Nitella translucens* с помощью уравнения Уссинга-Теорелла, воспользуемся данными, представленными в табл. 1 для ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ . Поскольку  $E_M$  (-138 мВ) отличается от  $E_N$  для всех трех ионов, очевидно, что ни один из них не находится в равновесии по обе стороны плазматической



мембраны клеток *Nitella translucens*. Так как  $E_M$  значительно более отрицательная величина, чем  $E_{Na}$  (-67 мВ), натрий обладает более низким химическим потенциалом в цитоплазме, чем в наружном растворе. Рассуждая аналогичным образом, легко видеть, что калий и тем более хлор обладают большим электрохимическим потенциалом в цитоплазме, чем в среде. Тот факт, что эти ионы могут диффундировать через мембрану, заставляет предположить наличие систем активного транспорта для ионов  $K^+$  и  $Cl^-$  внутрь клетки, а для ионов  $Na^+$  - наружу.

Зная  $E_M$  и  $E_N$ , можно рассчитать энергию, которая потребуется для переноса 1 моль вещества  $j$  из внешнего раствора внутрь клетки. Как уже отмечалось, эта энергия равна  $m_j^{in} - m_j^{out}$ .

$$\begin{aligned}\mu_j^{in} - \mu_j^{out} &= RT \ln a_j^{in} + z_j F E^{in} - RT \ln a_j^{out} - z_j F E^{out} = \\ &= z_j F (E^{in} - E^{out}) - RT (\ln a_j^{out} - \ln a_j^{in}) = \\ &= z_j F E_M - RT \ln (a_j^{out} / a_j^{in}).\end{aligned}$$

Разделив правую и левую части уравнения на  $z_j F$ , получим

$$\begin{aligned}\frac{\mu_j^{in} - \mu_j^{out}}{z_j F} &= \frac{z_j F}{z_j F} \cdot E_M - \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{a_j^{out}}{a_j^{in}}, \\ \mu_j^{in} - \mu_j^{out} &= z_j F (E_M - E_N).\end{aligned}\tag{16}$$

Число Фарадея  $F$  равно 0,02306 ккал/(моль·мВ). Теперь, зная разность между значениями  $E_M$  и  $E_N$  для ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Cl^-$ , можно рассчитать энергию переноса этих ионов через мембрану клеток *Nitella translucens*. Воспользуемся для этого уравнением (16) и данными, представленными в табл. 1.

$$\mu_{Na}^{in} - \mu_{Na}^{out} = 0,02306 [\text{ккал}/(\text{моль} \cdot \text{мВ})] \cdot (-138 - (-67)) [\text{мВ}] = -1,6 \text{ ккал}/\text{моль}.$$

Таким образом, энергия, необходимая для активного транспорта натрия через плазмалемму клеток *Nitella translucens* в наружный раствор, составляет 1,6 ккал/моль. Аналогичные расчеты выполним для ионов  $K^+$  и  $Cl^-$ :

$$\begin{aligned}\mu_K^{in} - \mu_K^{out} &= 0,02306 \cdot [-138 - (-179)] = 0,95 \text{ ккал}/\text{моль}; \\ \mu_{Cl}^{in} - \mu_{Cl}^{out} &= 0,02306 \cdot [-138 - (99)] = -5,5 \text{ ккал}/\text{моль}.\end{aligned}$$

Можно допустить, что в клетках *Nitella translucens* активное выведение натрия связано с активным поглощением калия. Источником энергии может быть АТФ, энергия переноса фосфатной группы которой составляет от 7 до 10 ккал/моль, этого вполне достаточно для перекачки 1 моль ионов  $K^+$  внутрь клетки и 1 моль ионов  $Na^+$  наружу. Данный процесс осуществляется за счет функционирования локализованных в плазмалемме ионных насосов различной природы.

## ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ

В клетках растений существует по крайней мере четыре типа мембранного транспорта ионов - пассивная диффузия, облегченная диффузия, первично-активный и вторично-активный транспорт.

Неспецифическая пассивная диффузия ионов не требует специальных механизмов и происходит при появлении в мембране различных гидрофильных пор (кинки, области мембранных дефектов и т.п.). По принципу пассивной диффузии (т.е. по градиенту электрохимического потенциала) происходит также транспорт ионов через различные каналы. Облегченная диффузия обеспечивается специальными белками-переносчиками.

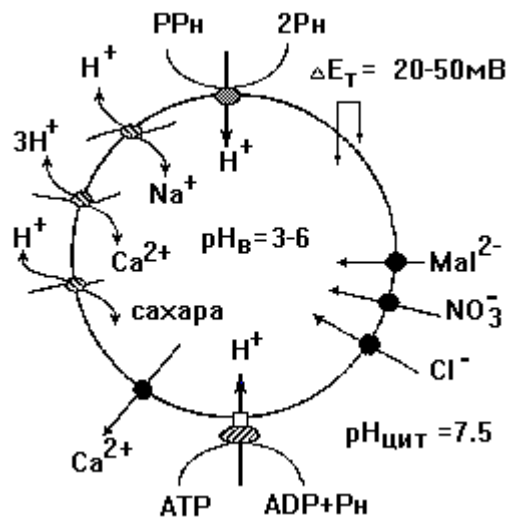


Рис. 2. Электрогенный транспорт ионов водорода  $H^+$  - АТФаза и  $H^+$  - пирофосфатаза ( $H^+$ -РРазой) [Rea et al., 1992].

Первично-активный транспорт ионов в большинстве случаев осуществляется транспортными АТФазами (ионными насосами), источником энергии для которых является гидролиз АТФ или пирофосфата. В мембранах хлоропластов и митохондрий при работе систем первично-активного ионного транспорта источником энергии является деятельность окислительно-восстановительных цепей. Если же источником энергии является градиент концентрации ионов, создаваемый на мембране, то процесс называется вторично-активным транспортом. Последний обеспечивает перенос в клетку моносахаридов, аминокислот, анионов и ряда катионов. В растительных клетках чаще всего используется градиент концентраций протонов, создаваемый различными  $H^+$ -насосами (рис. 2).

### 1. Транспортные АТФазы.

Транспортные АТФазы делятся на АТФазы Р-, V- и F-типа. В табл. 2 приведены сравнительные характеристики этих трех типов  $H^+$ -АТФаз в растительных клетках. Общим свойством АТФаз первого типа является способность образовывать ковалентный интермедиат (Р), участвующий в реакционном цикле. К АТФазам Р-типа относят  $H^+$ -АТФазу,  $Ca^{2+}$ -АТФазу и  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазу плазматической мембраны. Предполагают, что высокоспецифичное ( $K_M = 10-30$  мкмоль/л) поглощение ионов калия клетками растений может обеспечиваться  $K^+$ - $H^+$ -АТФазой,  $K^+$ -АТФазой и(или)  $K^+$ - $H^+$ -симпортером (рис.3).

Эти переносчики начинают активно действовать при микромолярных концентрациях калия во внешней среде, а насыщение наступает при концентрации ионов  $K^+$  более 200 мкмоль/л. Скорость обращения этих переносчиков составляет  $10^2 - 10^4$  ионов в секунду. Они способны аккумулировать калий клетками при  $10^6$ -кратном градиенте его концентрации на мембране.

Таблица 2. Сравнительная характеристика  $H^+$ -АТФаз растительных клеток [Скулачев, 1989]

Характеристика	$H^+$ -АТФаза		$H^+$ -АТФ синтаза митохондрий
	плазмолеммы	тонопласта	
Молекулярная масса субъединиц, кДа	100	(72-100) <sub>n</sub> ; (62-68) <sub>n</sub> ; 16-24; 12-14;	(53) <sub>3</sub> ; (51) <sub>3</sub> ; 50; 15; 5,5
Металл-активатор	$Mg^{2+}$	$Mg^{2+}$ или $Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$ или $Ca^{2+}$
Оптимум pH	6-7	7-8	8-9
Чувствительность к ингибиторам:			
ванадат	+	-	-
нитрат	-	+	+
ДЭС	+	-	+
олигомицин	-	-	+
ДЦКД (низкие конц.)	-	-	+
ДЦКД (высокие конц.)	+	+	+
азид	-	-	+

В процессе функционирования АТФаз Р-типа при гидролизе АТФ остаток фосфорной кислоты переносится на карбоксильную группу аспартата активного центра и образуется фосфорилированная форма фермента (Е-Р). Очень эффективным ингибитором АТФаз Р-типа является ванадат-ион, который способен вместо фосфата специфически связываться с активным центром фермента. Различные АТФазы Р-типа отличаются друг от друга по чувствительности к любым другим модификаторам, кроме ванадата, который является сильным ингибитором именно этого типа транспортных АТФаз. Например,  $H^+$ -АТФаза плазматических мембран ингибируется диэтилстильбестролом (ДЭС) и высокими концентрациями дициклогексилкарбодиимида (ДЦКД),  $Na^+, K^+$ -АТФаза - сердечными гликозидами,  $Ca^{2+}$ -АТФаза плазмолеммы активируется белком кальмодулином и угнетается рутениевым красным, SH-реагентами (мерсалил, N-этилмалеимид и др.) и эритрозином В.

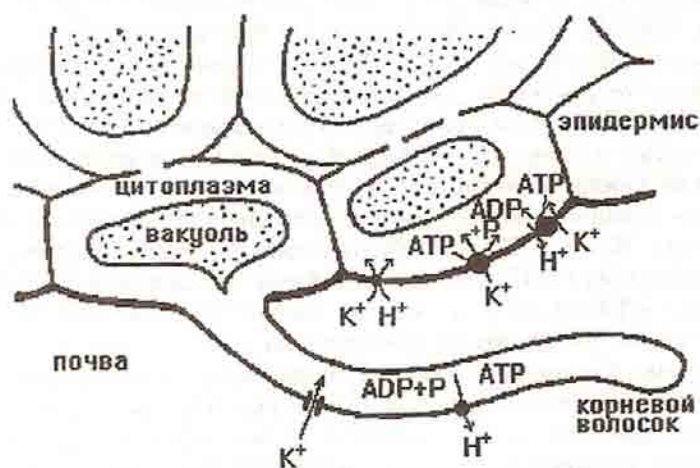


Рис. 3. Предполагаемые пути поглощения ионов калия клетками корневой системы, связанные с участием  $K^+$ ,  $H^+$  - АТФазы,  $K^+$  - АТФазы,  $K^+$ ,  $H^+$  - симпортёра,  $K^+$  - каналов входящего направления и  $H^+$  - АТФ-азы [Schoeder et al., 1994].

Ион-транспортующие АТФазы V-типа функционируют в тонопласте растений, вакуолях дрожжей и лизосомах. Большинство АТФаз этого типа являются переносчиками протонов и участвуют в транспорте анионов, аминокислот, репарации мембран при эндо- и экзоцитозе. В ходе каталитического цикла для них не установлено образования ковалентно-связанного интермедиата. Кроме ДЦКД, АТФазы V-типа блокируются нитратом, хаотропными (KSCN) и SH-реагентами. Ни ванадат (ингибитор P-типа АТФаз), ни олигомицин (специфический ингибитор F-АТФаз) не действуют на эти системы.

На рис.2 приведена схема функционирования электрогенных протонных насосов тонопласта. Транспорт ионов водорода внутрь вакуоли осуществляется двумя ферментами, один из которых использует энергию АТФ ( $H^+$ -АТФаза), а второй - пирофосфата ( $H^+$ -PPаза). Оба фермента катализируют электрогенный транспорт протона из цитозоля в вакуоль, создавая на тонопласте электрический (от +20 до +50 мВ) и химический (от 1,5 до 4,5 единиц рН) градиенты. Эта энергия используется в процессе вторичного активного транспорта ионов в режиме унипорта или антипорта. Ионы  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$  и малата ( $Mal^{2-}$ ) входят в вакуоль, а ионы  $Ca^{2+}$  выходят из вакуоли по градиенту электрического потенциала (Dj). Ионы  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  и сахара входят внутрь вакуоли в обмен на ионы  $H^+$ . Следует отметить, что на долю  $H^+$ -PPазы приходится от 1 до 10% белков тонопласта, поэтому  $H^+$ -PPаза способна создавать почти такой же (если не больший), как и  $H^+$ -АТФаза, градиент концентрации протонов на тонопласте.

АТФазы F-типа присущи мембранам хлоропластов, митохондрий и бактерий. Они состоят из находящейся в мембране гидрофобной части ( $F_o$ ), которая участвует в транслокации  $H^+$  и гидрофильной части ( $F_1$ ), построенной в большинстве случаев из 5 разных субъединиц.  $F_1$ -часть содержит центры для связывания нуклеотидов и ионов  $Mg^{2+}$ . Основные различия между этими ферментами обнаруживаются не в структуре  $F_1$ -части, а в гидрофобном  $F_o$ -компоненте, погруженном в мембрану. Число полипептидов в  $F_o$  может колебаться от 3 до 8. Активность F-АТФаз подавляется олигомицином, ДЦКД, вентурицидином, кадмием. Если АТФазы P- и V-типа являются потребителями АТФ, то АТФазы F-типа его синтезируют.

## 2. Электрогенные и электронейтральные ионные насосы.

Термин "ионный насос" используется для описания различных систем активного транспорта, способных перекачивать ионы против градиента электрохимического потенциала. Чаще всего при этом источником энергии служит АТФ. Примерами активного транспорта является функционирование таких ионных насосов как  $H^+$ -АТФаза,  $Na^+, K^+$ -АТФаза,  $Ca^{2+}$ -АТФаза,  $H^+$ -РРаза,  $Cl^-$ -АТФаза. В электрогенезе высших растений, по-видимому, наибольшее значение имеет  $H^+$ -насос, создающий на плазмалемме и тонопласте электрохимические градиенты ионов  $H^+$ . Активный транспорт ионов может быть электронейтральным или электрогенным.

Транспортная система электронейтральна, если при ее функционировании происходит обмен внутриклеточных ионов на внеклеточные в эквивалентных количествах. В том случае, когда количество зарядов переносимых в одном направлении в единицу времени, не компенсируется суммой зарядов, переносимых в противоположном направлении, транспортный механизм непосредственно участвует в создании дополнительной разности потенциалов на мембране. Во время работы, электрогенного насоса например,  $Na^+, K^+$ -АТФазы, из клетки выносятся 3 положительных заряда (3 иона  $Na^+$ ), а входят в клетку 2 положительных заряда (2 иона  $K^+$ ), в результате чего в клетке происходит накопление положительных электрических зарядов и на мембране возникает разность потенциалов.

У растительных клеток вклад электрогенных транспортных систем в мембранный потенциал значительно выше, чем в клетках животных организмов (рис.4). Это проявляется в том, что величина мембранного потенциала растительной клетки значительно превышает величину диффузионного и, в частности, равновесного калиевого потенциала. Высокие значения мембранного потенциала в клетках растений в первую очередь создаются за счет транспорта ионов  $H^+$  из цитоплазмы в окружающую среду. Электрогенные насосы, перекачивающие ионы  $H^+$ , обнаружены в клетках харовых водорослей, гифах гриба *Neurospora*, корнях высших растений, хлоропластах и митохондриях. У одноклеточной водоросли *Acetabularia* функционирует электрогенный насос ( $Cl^-$ АТФаза), накачивающий снаружи внутрь ионы хлора. При мембранном потенциале  $-170$  мВ за счет работы этого насоса следует отнести около  $-90$  мВ. Электрогенные анионные насосы участвуют в поглощении  $Cl^-$  клетками *Chara*.

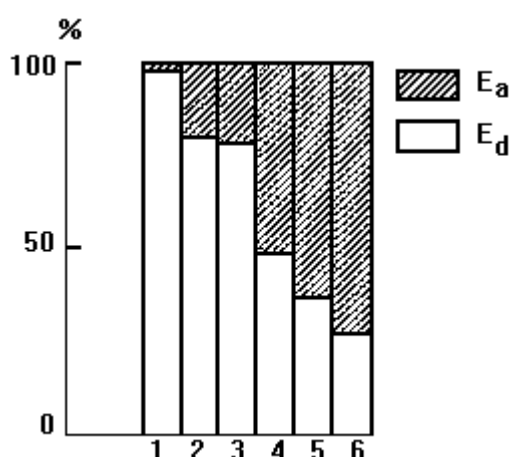


Рис.4. Вклад диффузионного ( $E_D$ ) и активного ( $E_A$ ) транспорта в величину мембранного потенциала ( $E_M$ ) различных животных и растительных объектов [Опритов и др., 1991].

1 - аксон кальмара; 2 - фоторецептор морского желудя; 3 - нейрон моллюска; 4 - эпидермис корня кукурузы; 5 - паренхима гипокотыля вигны; 6 - лист эгерии.

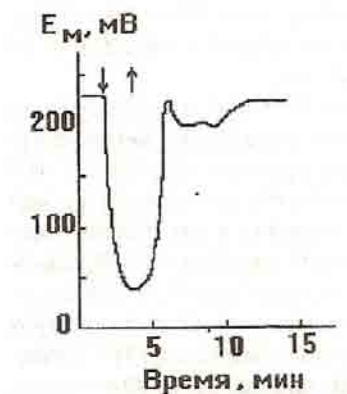


Рис.5. Влияние азид натрия на мембранный потенциал *Neurospora* [Слаймен, 1970].

То, что функционирование электрогенного ионного насоса непосредственно влияет на величину мембранного потенциала доказывает тот факт, что при его выключении регистрируется резкое изменение мембранного потенциала. У *Acetabularia* различные воздействия, подавляющие метаболизм, вызывают мгновенную деполяризацию мембраны от -170 до -80 мВ. Еще более резкая деполяризация мембранного потенциала наблюдается у *Neurospora* в тех случаях, когда азидом натрия блокируется насос, откачивающий из клетки ионы  $H^+$  (рис.5).

При работе электронейтрального насоса система активного транспорта является лишь средством поддержания концентрационных градиентов ионов и непосредственно не участвует в создании мембранного потенциала клетки. На первом этапе функционирования происходит активация электронейтрального насоса и присоединение к его обменному участку иона, переносимого наружу. Второй этап связан с изменением ориентации активированного насоса, при этом обменный участок оказывается обращенным к внешней среде и замещается ионом, переносимым внутрь клетки. И, наконец, на стадии релаксации происходит переход от активированного состояния насоса в неактивированное, при котором восстанавливается исходная ориентация электронейтрального насоса - обменный участок обращается внутрь клетки вместе с переносимым ионом, который в результате ионного обмена высвобождается во внутреннюю среду. Многократное повторение таких циклов приводит к обогащению клетки ионами  $K^+$ , например, у морской водоросли *Hydrodictyon*. Поскольку при холостом ходе насоса наружу выносятся катион, электрический потенциал мембраны не изменяется, а в клетку *Hydrodictyon*, вероятно, поступают ионы  $Cl^-$  в обмен на ионы  $OH^-$ . При выключении насоса ингибитором мембранный потенциал будет снижаться очень медленно из-за постепенной диффузии ионов  $K^+$  по градиенту электрохимического потенциала. Обработка ионами  $Ca^{2+}$  снижает коэффициент проницаемости мембраны для калия, предотвращая, таким образом, выравнивание концентрации  $K^+$  по обе стороны мембраны и падение диффузионного мембранного потенциала.

### 3.Использование мембранных везикул для изучения ионного транспорта

Изучение принципов функционирования клеточных мембран с помощью современного арсенала физических и физико-химических методов не всегда возможно непосредственно на биологических объектах. Довольно часто для этих целей используют различные мембранные модели. В опытах с модельными мембранными системами можно в более широких пределах варьировать солевой состав сред, величину pH, температуру и осмотические условия, что позволяет с большей точностью и надежностью исследовать электрохимические характеристики мембран, изучать транспортные процессы изотоп-

ными и оптическими методами, определять фазовое состояние и фазовые переходы в мембранах. Особого внимания заслуживают работы по реконструкции (встраиванию) различных функциональных комплексов биологических мембран в искусственные липидные пленки или пузырьки (липосомы).

Мембранную фракцию из клеток растений, обогащенную, например, фрагментами плазмалеммы получают из первичного гомогената растительной ткани путем дифференциального центрифугирования и очистки в ступенчатом градиенте плотности сахарозы. Везикулы плазмалеммы заполняют средой, состав которой определяется задачами конкретного эксперимента, с помощью осмотического шока. Для концентрирования суспензии везикул применяют дополнительное осаждение. Эта модельная система позволяет анализировать пассивный и активный механизмы ионного транспорта через мембрану, изучать функционирование различных мембраносвязанных ферментов и процессы генерации мембранного потенциала. Везикулы плазмалеммы замкнуты и не обладают существенной пассивной проницаемостью к ионам калия, натрия, водорода и сульфата, при этом на мембранах везикул может быть воссоздан потенциал, близкий к мембранному потенциалу клетки. С помощью метода дифференциального центрифугирования удалось установить, что везикулы плазмалеммы, полученные из растительных клеток содержат катионстимулируемую  $H^+$ -АТФазу, которая принимает участие в активном транспорте ионов.

Одной из особенностей мембранных препаратов является способность фрагментов плазмалеммы самопроизвольно замыкаться в везикулы, причем некоторая часть везикул может быть инвертирована, а другая - иметь нормальную ориентацию, при которой цитоплазматическая сторона плазмалеммы обращена внутрь везикул. Отсюда следует, что часть активных центров катионстимулируемой  $H^+$ -АТФазы, расположенных в клетке с цитоплазматической стороны плазмалеммы, окажется недоступной для субстратов и кофакторов АТФазной реакции. В этом случае измеренная величина активности фермента будет не соответствовать ее полному значению. Поэтому для изучения структуры и функций плазмалеммы на такой модельной системе, как мембранные везикулы очень важна оценка ориентации везикул. Включить в работу все активные центры АТФаз и сделать мембрану проницаемой для АТФ и кофакторов АТФазной реакции можно с помощью каналогенного антибиотика аламетицина или слабых растворов неионных детергентов типа тритона X-100. Учитывая, что детергенты могут влиять и на структуру самого фермента, предпочтительнее все же использовать аламетицин. Сопоставляя полную АТФазную активность везикул (вариант с аламетицином) с АТФазной активностью везикул без добавления каналогенных препаратов (контрольный вариант), рассчитывают процент инвертированных и нормально ориентированных везикул плазмалеммы.

В зависимости от конкретных задач эксперимента для изучения транспорта ионов используют разные флуоресцентные красители (зонды). Обычно это красители, принадлежащие к трем основным группам зондов: потенциалчувствительные, интенсивность флуоресценции которых изменяется при изменении разности потенциалов на везикулярной мембране (анилиннафталинсульфонат, аурамин, оксонолы, карбоцианины и др.), рН-зависимые, реагирующие изменением флуоресценции на изменение градиента концентрации ионов водорода (акридины), и, наконец, зонды, чувствительные к изменению концентрации какого-либо иона, например кальция (хлортетрациклин, квин-2, фура-2, индо-1 и др.).

При проведении работ по изучению транспорта ионов часто возникает необходимость задать на мембранах везикул определенные ионные и электрические градиенты. Это достигается заполнением путем осмотического шока внутреннего пространства везикул средой требуемого состава, например, ионами калия, и помещением везикул в среду, содержащую эквимлярное (по калию) количество ионов натрия или другого иона. Если сделать мембрану везикул проницаемой для одного из

ионов с помощью искусственных ионофоров (валиномицина, моненсина), это приведет к возникновению на ней диффузионного потенциала, который можно зарегистрировать с помощью потенциалчувствительных зондов.

#### 4. Исследование пассивного транспорта ионов $K^+$ и $Na^+$ на мембранных везикулах

К инкубационной среде, содержащей ионы натрия (300 ммоль/л) и потенциазависимый флуоресцентный зонд diS-C<sub>3</sub>-(5) (1 мкмоль/л), добавляют 1-5 мкл мембранных везикул, загруженных 300 ммоль/л ионов калия. При этом наблюдается тушение флуоресценции красителя (рис.6), связанное с распределением его между водной и липидной фазами. Добавление ионофора валиномицина вызывает выход ионов калия из везикул в наружную среду, что приводит к увеличению отрицательного заряда внутри везикул и к возникновению калиевого диффузионного потенциала. В результате положительно заряженные ионы красителя входят в липидную фазу мембраны, агрегируют, что приводит к еще большему тушению флуоресценции красителя. При добавлении в этих условиях к суспензии везикул каналоформеров, обеспечивающих или натриевую (моненсин) или общую (аламетицин) проницаемость, происходит вход ионов натрия внутрь везикул по концентрационному и электрическому градиентам, что сопровождается исчезновением электрического градиента и, как следствие, увеличением интенсивности флуоресценции зонда. Возможность возникновения и снятия калиевого диффузионного потенциала свидетельствует о слабой пассивной проницаемости плазмалеммы к изучаемым ионам.



Рис.6. Индукция валиномицином и моненсином соответственно калиевой и натриевой проницаемости в мембранных везикулах из клеток клеоптилей (1) и корней (2) кукурузы.

Уменьшить или снять калиевый диффузионный потенциал можно также увеличивая концентрацию ионов калия в инкубационной среде (рис.7). Диффузионный калиевый потенциал, генерируемый при этом на мембране, будет описываться уравнением Нернста (5). При титровании везикул электролитом, содержащим ионы калия, в присутствии валиномицина между логарифмом концентрации ионов калия в инкубационной среде и изменением флуоресценции наблюдается линейная зависимость, что позволяет рассчитывать (пользуясь уравнением Нернста) зависимость мембранного потенциала от интенсивности флуоресценции зонда diS-C<sub>3</sub>-(5). Используя потенциалчувствительные зонды, следует учитывать их знак заряда, максимумы возбуждения



и флуоресценции, возможность реагирования их на поверхностный заряд мембраны.

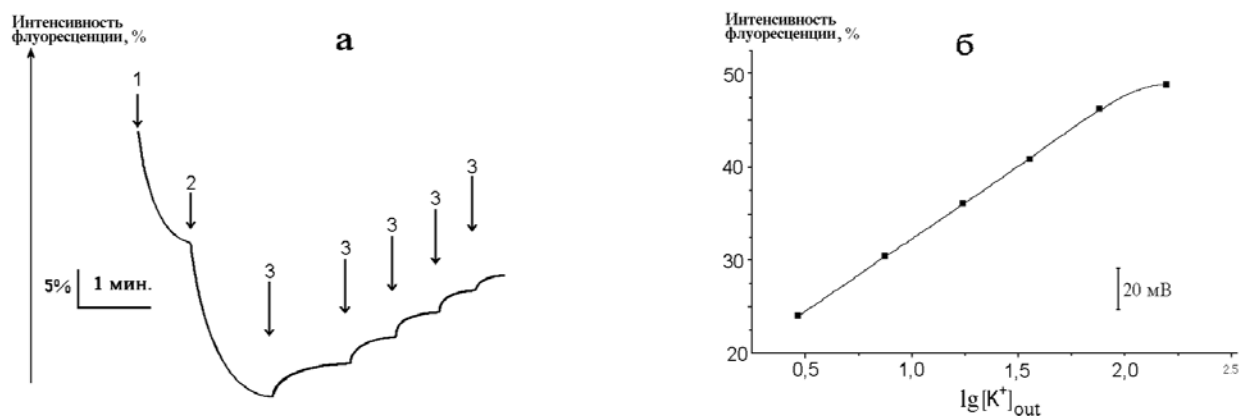


Рис.7. Влияние KCl на трансмембранный диффузионный потенциал [Инге-Вечтомова и др., 1987].

а - зависимость интенсивности флуоресценции потенциалчувствительного зонда diS-C3-(5) от концентрации ионов K<sup>+</sup> в инкубационной среде. Стрелками отмечены моменты добавления в среду мембранных везикул (1), валиномицина (2) и хлорида калия (3);

б - влияние KCl на индуцируемый валиномицином диффузионный мембранный калиевый потенциал везикул плазмалеммы, выделенных из клеток колеоптилей кукурузы.

## 5. Изучение активного транспорта ионов H<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup> на мембранных везикулах

На везикулах мембранных фракций, полученных из растительных клеток, с помощью флуоресцентных зондов может быть изучен также активный транспорт ионов H<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>. Для этого мембранные везикулы, загруженные АТФ (3 ммоль/л) помещают в среду, содержащую 3 ммоль/л ионов Mg<sup>2+</sup> и, например, флуоресцентный рН-чувствительный зонд 3-амино-6-хлоро-2-метоксиакридин. Интенсивность флуоресценции при этом практически не изменяется, так как мембрана везикул непроницаема и для ионов магния. Запустить АТФазную реакцию, протекающую внутри нормально ориентированных везикул, можно введением ионов магния внутрь везикул, что достигается применением ионофора A23187, который при отсутствии ионов кальция в среде способен переносить и другие двухвалентные катионы, в том числе и ионы магния. После запуска АТФазной реакции интенсивность флуоресценции рН-чувствительного зонда изменяется, что свидетельствует о трансмембранном переносе ионов водорода в наружную среду (рис.8). Обработка протонифором карбонилцианидхлорфенилгидразоном (КЦФХГ) останавливает АТФ-зависимый транспорт ионов водорода. Поскольку эта протонная АТФаза была обнаружена в везикулах плазмалеммы, ингибировалась ванадатом и была не чувствительна к нитрату, то ее можно отнести к H<sup>+</sup>-АТФазам Р-типа.

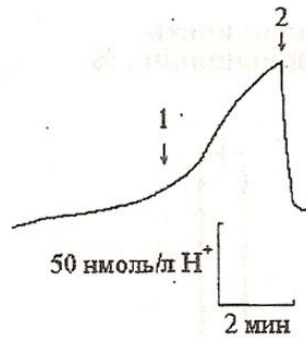


Рис.8. Активный транспорт ионов  $H^+$  через мембрану везикул плазмалеммы клеток корней кукурузы [Максимов, Батов, 1986].

Стрелками отмечено добавление ионофора двухвалентных катионов А 23187 (1) и протонифора КЦФХГ (2).

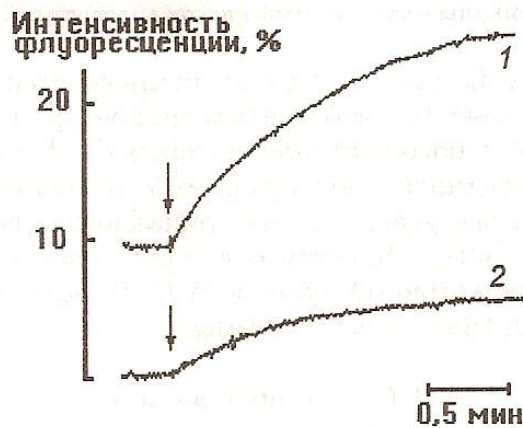


Рис.9. Активный транспорт ионов  $Ca^{2+}$  в везикулы плазмалеммы клеток coleoptилей кукурузы [Маркова и др., 1995].

Стрелками отмечено добавление 10 мкмоль/л  $CaCl_2$  в инкубационную среду, содержащую 3 ммоль/л Mg-АТФ (1) или 3 ммоль/л Mg-АДФ (2).

На рис. 9 приведены результаты анализа АТФ-зависимого транспорта ионов  $Ca^{2+}$  на везикулах плазмалеммы из клеток coleoptилей кукурузы. Добавление к везикулам, загруженным кальций-чувствительным зондом индо-1, ионов  $Ca^{2+}$  (10 мкмоль/л) и комплекса Mg-АТФ (3 ммоль/л) вызывало постепенное увеличение интенсивности флуоресценции зонда, что свидетельствует об увеличении концентрации  $Ca^{2+}$  внутри везикул (рис. 9, 1); при использовании комплекса Mg-АДФ увеличение интенсивности флуоресценции составляло только одну треть по отношению к таковой в варианте с Mg-АТФ (рис. 9, 2).

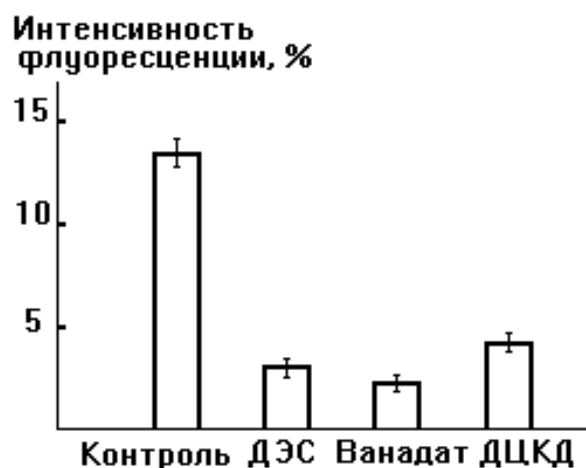


Рис.10. Влияние диэтилстильбестрола (50 мкмоль/л), ортованадата натрия (0,1 ммоль/л) и дициклогексикарбодиимида (ДЦКД, 50 мкмоль/л) на АТФ-зависимый транспорт ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в везикулы плазмалеммы клеток колеоптилей кукурузы.

Ингибиторный анализ АТФ-зависимого транспорта ионов  $\text{Ca}^{2+}$  показал (рис.10), что диэтилстильбестрол (ДЭС) тормозит процесс активного поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в везикулы плазмалеммы колеоптилей кукурузы на 80%, а ортованадат натрия - на 90 %, что также указывает на принадлежность этого насоса к АТФаза Р-типа. Поэтому есть основания полагать, что в данной системе активный транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  обусловлен работой именно  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы плазмалеммы.

## 6.Ионные каналы

Ионные каналы (рис.11) представляют собой сложные гликопротеиновые комплексы, осуществляющие быстрый пассивный электрогенный транспорт ионов через биологические мембраны. Ионные каналы классифицируются по их проницаемости, селективности к различным ионам и по принципу открывания (закрывания) воротного механизма. Каналы способны избирательно открываться или закрываться для определенных ионов ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) при изменении мембранного потенциала, гормональных, механических и осмотических воздействиях. Эти воздействия через сенсор внешнего стимула влияют на работу воротного механизма канала.

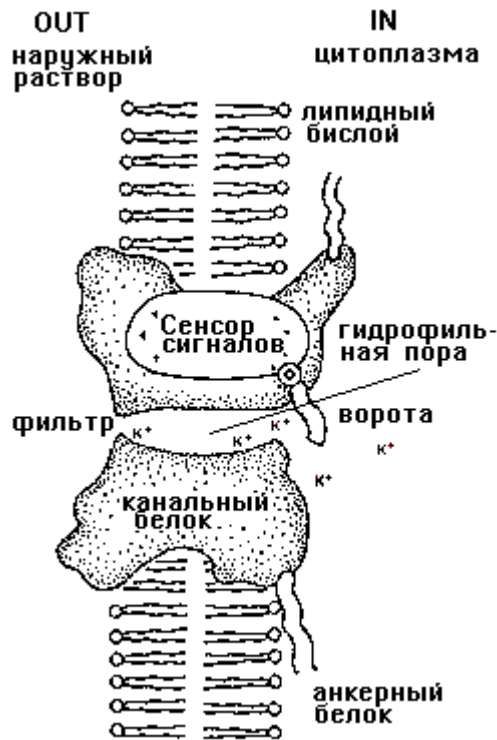


Рис.11. Функциональная модель ионного канала [Satter, Moran, 1988].

Наиболее важными свойствами ионных каналов являются селективность, механизмы инактивации и проводимость одиночного канала, а также фармакологическая характеристика. Зная проницаемость одиночного канала и суммарную проницаемость мембраны, можно рассчитать плотность ионных каналов. Например, плотность K<sup>+</sup>-каналов на плазмалемме достигает  $5 \cdot 10^{11}$  каналов/м<sup>2</sup>, которые занимают 0,01 % общей площади мембраны. Проницаемость, селективность и функционирование воротного механизма определяют кинетические свойства конкретного ионного канала. Открывание и закрывание ионных каналов регулируется мембранным потенциалом, их ионным окружением (особенно ионами Ca<sup>2+</sup> и рН), фосфорилированием, жирными кислотами и G-белками. Изучение селективности ионных каналов показало, что ионы двигаются в канале не путем простой диффузии, а в результате последовательных стадий дегидратации и связывания со стенками поры канала. Движение иона через пору канала сопряжено с преодолением энергетического барьера, величина которых зависит от диаметра, энергии гидратации иона, величины рН, ионной силы и других условий, способных понижать энергию активации при прохождении селективного фильтра.

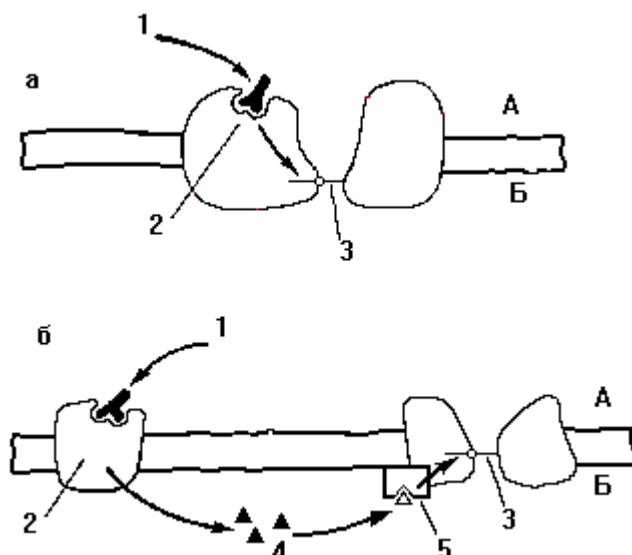


Рис.12. Различные способы управления ионными каналами [Крутецкая, Лонский, 1994].

а - ионный канал, имеющий внутренний сенсор внешних сигналов; б- ионный канал, имеющий внешний сенсор и опосредованно управляемый химическими сигналами. 1 - первичный посредник(сигнал), 2 - рецептор первичного посредника, 3 - ворота, 4 - внутриклеточный вторичный посредник, 5 - рецептор вторичного посредника. А - наружный раствор, Б - цитоплазма .

В зависимости от способа управления воротного механизма сенсором внешнего сигнала каналы делятся на две группы. Первую группу составляют такие типы каналов, у которых сенсор внешнего стимула входит в состав молекулы канала непосредственно (рис.12, а). Эта группа включает в себя потенциал- и лигандуправляемые каналы. Потенциалуправляемые ионные каналы ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) реагируют на изменение мембранного потенциала, лигандуправляемые - открываются и закрываются при связывании с рецептором специфических агонистов, участвующих, например, в процессе быстрой передачи сигналов. У каналов второй группы сенсор внешнего стимула пространственно отделен от канала (рис.12, б). В этом случае внешний сигнал от сенсора на канал передается через систему внутриклеточных посредников. Эта группа включает в себя рецепторуправляемые каналы и каналы, управляемые G-белками.

Потенциалзависимые каналы устроены таким образом, что интегральный белок канальной структуры образует пору в мембране. В канале выделяют внутреннее и наружное устье и пору, которая с помощью воротного механизма может открываться и закрываться (см. рис.11). Гидрофильные аминокислоты выстилают стенки поры, а гидрофобные - контактируют с липидной фазой мембраны. В канале имеются селективный фильтр, обеспечивающий специфичность канала, и сенсор градиента электрического потенциала на мембране. Селективный фильтр канала включает в себя кольцо кислородных атомов, способных осуществлять дегидратацию ионов. Селективные свойства канала определяются последовательностью аминокислот, входящих в состав фильтра. Открывание и закрывание воротного механизма каналов является результатом конформационных изменений в белке. При открывании ионного канала регистрируется резкое возрастание электрического тока через мембрану.

Проницаемость каналов составляет от  $10^6$  до  $10^8$  ионов в секунду, что на три порядка выше, чем транспорт ионов, катализируемый помпами и переносчиками, и на 11 порядков выше, чем простая диффузия ионов через мембрану. Отличительной особенностью ионных каналов является то, что в открытом состоянии они катализируют относительно постоянный поток ионов в одном направлении при конкретном значении мембранного потенциала и в определенной ионной среде. Односторонняя проницаемость - еще одна особенность транспорта ионов через каналы. В процессе транспорта через канал происходит взаимодействие иона с белком, поэтому передвижение ионов по каналам отличается от их транспорта через водные поры, в которых эти взаимодействия

минимальны. Проводимость канала зависит от заполнения ионами участков на входе и выходе. Выход иона из канала облегчается при появлении на входе канала другого иона такого же знака, из-за их электростатического отталкивания. Однако при высоких концентрациях электролита может происходить насыщение проводимости канала из-за заполнения ионами его входа и выхода и, как следствие, блокировка канала.

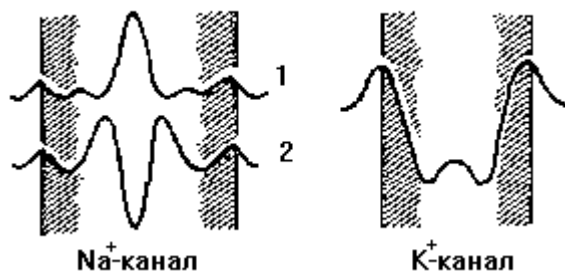


Рис.13. Энергетические профили натриевого и калиевого каналов возбудимых мембран [Хилле, 1992].

1 и 2 - альтернативные модели  $\text{Na}^+$ -канала.

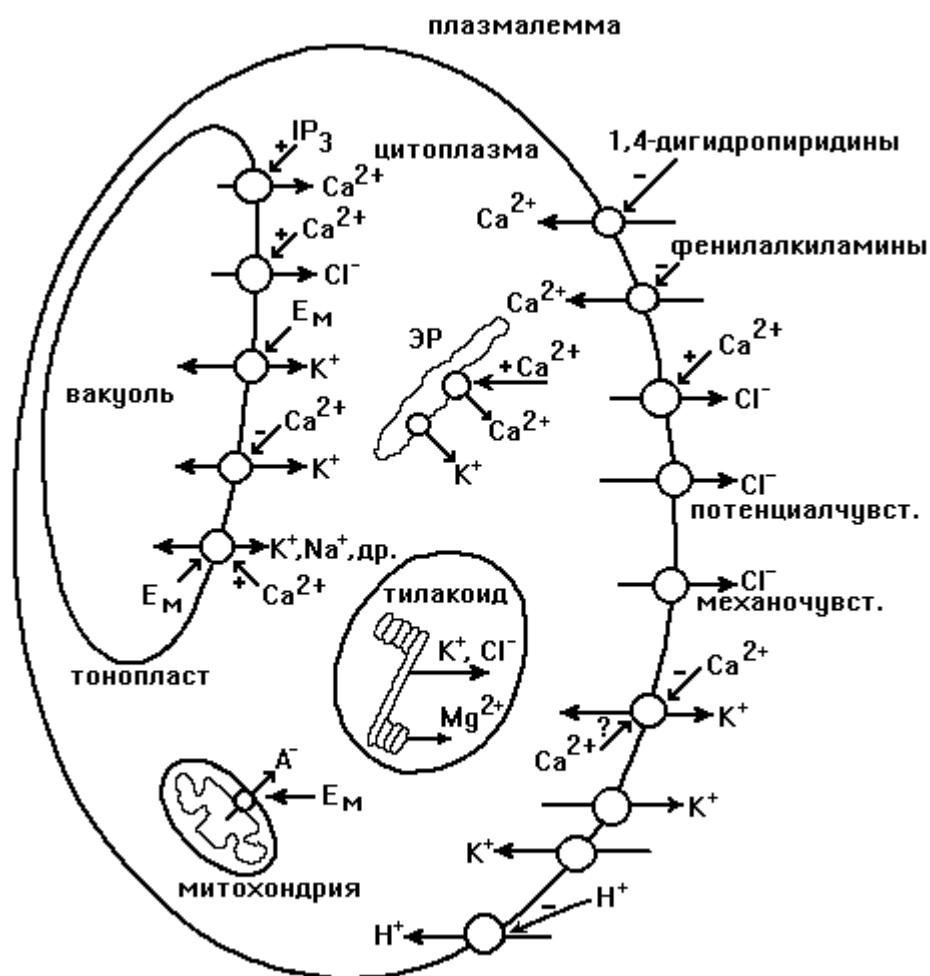


Рис.14. Различные типы ионных каналов, обнаруженных в клетках растений [Tester, 1990].

Стрелками показано обычное направление ионных потоков *in vivo*.

В процессе передвижения иона через канал молекулы воды гидратной оболочки иона замещаются на полярные группы в полости канала. Характер взаимодействия иона с молекулярными группами канала соответствует профилю потенциальной энергии иона в

канале, представляющему ряд потенциальных ям и барьеров. На рис.13 приведены предполагаемые энергетические профили натриевого и калиевого каналов возбудимых мембран. Следует отметить, что каждый ион достаточно долго (по сравнению со временем тепловых колебаний) задерживается в потенциальной яме. Другой ион не может попасть в занятую потенциальную яму из-за электростатического взаимодействия с уже находящимся там ионом. Поэтому перескок возможен только в пустую яму. Перескоки между ямами происходят под действием тепловых флуктуаций и зависят от напряженности электрического поля. Поскольку увеличение свободной энергии иона при дегидратации с избытком компенсируется энергией его взаимодействия с полярными группами канала, то общая энергия иона снижается, что облегчает его прохождение через канал. Наличие в центре канала полярных групп и фиксированных отрицательных зарядов приводит к снижению энергетического барьера для перехода катионов из раствора в канал.

В растениях обнаружены практически все основные типы ионных каналов, известные у животных организмов. На рис. 14 суммированы сведения о ионных каналах, функционирующих на различных мембранах растительных клеток. Большинство исследований по ионным каналам растений выполнено на гигантских клетках харовых водорослей.

## 7. $K^+$ -каналы

Калиевые каналы содержатся практически во всех мембранных образованиях растительных клеток. Большинство  $K^+$ -каналов блокируются четвертичными соединениями аммония, в частности тетраэтиламмонием (ТЭА), имеют сходную селективность и существенную проницаемость только для четырех катионов ( $Tl^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $NH_4^+$ ). При снижении pH проводимость  $K^+$ -каналов резко падает из-за протонирования молекулярных групп в поре канала. Существуют потенциал-,  $Ca^{2+}$ -, АТФ- и  $Na^+$ -зависимые  $K^+$ -каналы.

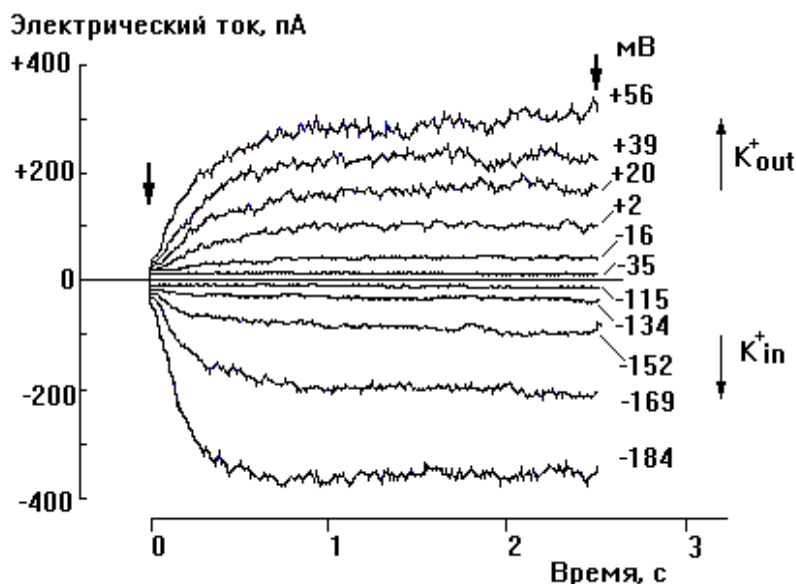


Рис.15. Потенциал-зависимые  $K^+$ -каналы плазмалеммы замыкающих клеток устьиц [Schroeder e.a., 1994].

Кривые, расположенные вверх от нуля -  $K^+$ -каналы выходящего направления, вниз от нуля - входящего направления.

Потенциалзависимые  $K^+$ -каналы могут активироваться как при деполяризации мембраны, например  $K^+$ -каналы выходящего направления ( $K^+$ out-каналы) (рис.15), так и

при ее гиперполяризации -  $K^+$ -каналы входящего направления ( $K^+$ <sub>in</sub>-каналы) и отличаются чувствительностью к токсинам, выделенным из яда скорпиона и гадюки, бледной поганки и перца. Функционирование потенциалзависимых  $K^+$ -каналов определяет уровень калия в цитоплазме, тургор клетки, фазу реполяризации в ходе генерации потенциала действия и некоторые другие функции.

$K^+$ -каналы выходящего направления ( $K^+$ <sub>out</sub>-каналы), активирующиеся при деполяризации мембраны, обнаружены в плазмалемме водорослей, клеток высших растений и дрожжей. Они участвуют в движении устьиц, обеспечивают фазу реполяризации, связанную с потоком калия из клетки в ходе генерации потенциала действия у харовых водорослей и высших растений.

$K^+$ -каналы входящего направления ( $K^+$ <sub>in</sub>-каналы) активируются при увеличении мембранного потенциала (рис. 16). Они имеют высокую селективность по отношению к ионам  $K^+$ . Ряд селективности для  $K^+$ <sub>in</sub>-каналов в замыкающих клетках устьиц выглядит следующим образом:  $K^+ > NH_4^+ = Rb^+ \gg Na^+ > Li^+ > Cs^+$ . Полупериод активации  $K^+$ <sub>in</sub>-каналов растений в ответ на гиперполяризацию плазмалеммы изменяется в пределах 25-200 мс. Каналы могут оставаться в открытом состоянии несколько минут и обеспечивать, в отличие от  $K^+$ <sub>in</sub>-каналов животных организмов, достаточно продолжительный поток калия в клетку. Повышение уровня кальция подавляет  $K^+$ -ток.

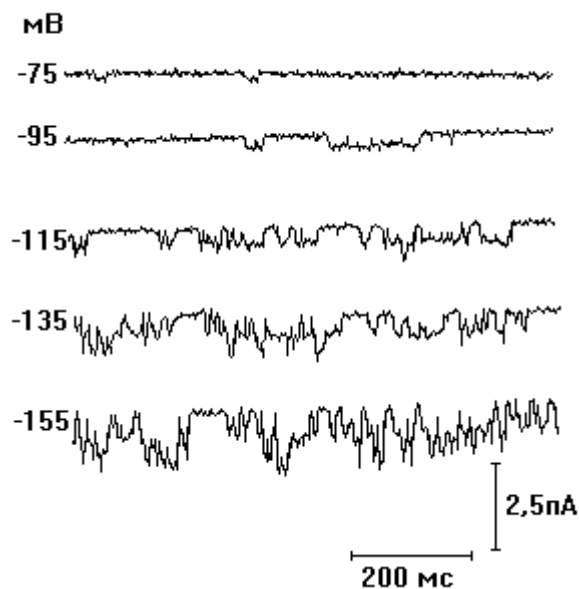


Рис.16. Зависимость функционирования  $K^+$ <sub>in</sub>-каналов замыкающих клеток устьиц от мембранного потенциала [Schroeder и с.а., 1994].

Биофизическими, фармакологическими и генетическими методами получены убедительные доказательства того, что  $K^+$ -каналы входящего направления могут функционировать как переносчики ионов  $K^+$  внутрь клетки, работая в сопряжении с  $H^+$ -помпой (см. рис. 3). Предполагается, что  $K^+$ <sub>in</sub>-каналы могут обеспечивать таким путем низкоспецифический механизм поглощения калия специализированными клетками растений при содержании его в среде, равном или более 0,3 ммоль/л. Содержание ионов  $K^+$  в цитоплазме растительных клеток колеблется от 60 до 150 ммоль/л. Возможность транспорта калия в клетку по каналам против градиента концентрации достигается тем, что функционирующая в плазмалемме  $H^+$ -помпа генерирует отрицательный мембранный потенциал, составляющий -120 -- -220 мВ. Величина мембранного потенциала, создаваемого за счет функционирования  $H^+$ -АТФ-азы, например, в некоторых водорослях и грибах может достигать -300 мВ. Этот потенциал и позволяет аккумулировать калий клетками через каналы даже при  $10^5$ -кратном градиенте концентрации. Поглощение калия клетками через  $K^+$ <sub>in</sub>-каналы идет при повышенных его концентрациях в среде, когда для АТФазного механизма наступает уже насыщение. Даже небольшое количество



таких каналов в мембране может обеспечивать значительный поток калия в клетку, так как скорость переноса ионов составляет от  $10^6$  до  $10^7$  в секунду. Такой тип мембранного транспорта калия, вероятно, встречается только у растений и имеет очень важное значение для минерального питания, поскольку содержание ионов  $K^+$  в почвенном растворе и в фазе клеточной стенки различных тканей обычно варьирует от 0,3 до 15 ммоль/л. И, наконец, следует отметить, что селективный фильтр некоторых  $K^+$ -каналов может также пропускать ионы  $NH_4^+$  и некоторых других катионов. Работа  $K^+$ -каналов высших растений эффективно модулируется фитогормонами (АБК, ИУК) и вторичными посредниками ( $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$ , DAG, G-белки).

У высших растений различные катионы активно взаимодействуют с калием в процессе его поглощения через  $K^+$ -каналы. Некоторые из них являются необходимыми минеральными элементами ( $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ ), другие - токсичными, угнетающими поглощение калия ( $Cs^+$ ,  $Na^+$  и  $Al^{3+}$ ). Ионы  $Cs^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Al^{3+}$  снаружи клетки подавляют функционирование  $K^+$ -каналов. Например, 1 ммоль/л  $Na^+$  или 0,25 ммоль/л  $Cs^+$  блокируют 50%  $K^+$ -каналов при мембранном потенциале -175 мВ и концентрации ионов  $K^+$  снаружи 100 ммоль/л. Ионы  $Al^{3+}$  являются еще более токсичными для  $K^+$ -каналов, и соответственно более низкие концентрации его угнетают поглощение клетками калия. В клетках корневых волосков 50% блокирование  $K^+$ -каналов наблюдается при обработке 7 мкмоль/л  $Al^{3+}$ . Поэтому устойчивость растений к токсичным металлам в первую очередь зависит от степени подавления  $K^+$ -каналов и других переносчиков катионов. Функционирование  $K^+$ -каналов растительных организмов, в отличие от животных, практически не зависит от цитозольного уровня ионов  $Mg^{2+}$ .

В клетках животных организмов открыто 5 типов  $Ca^{2+}$ -регулируемых  $K^+$ -каналов:  $Ca^{2+}$ -активируемые  $K^+$ -каналы большой (ВК-каналы), средней (СК-каналы) и малой (МК-каналы) проводимости,  $Ca$ -ингибируемые и  $Ca^{2+}$ -регулируемые  $K^+$ -каналы, управляемые наружным кальцием. Большинство  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов активируются при возрастании уровня ионизированного кальция в цитоплазме, поскольку рецептор для ионов  $Ca^{2+}$  чаще расположен на внутренней поверхности мембраны. Сродство этого рецептора к ионам  $Ca^{2+}$  зависит от мембранного потенциала и обычно возрастает при деполяризации мембраны. Поэтому работа  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов зависит и от уровня кальция, и от величины мембранного потенциала. При деполяризации мембраны уровень кальция в цитоплазме возрастает в результате двух процессов: входа его из внешней среды по потенциалзависимым  $Ca^{2+}$ -каналам и мобилизации из различных внутриклеточных депо (эндоплазматический ретикулум, вакуоль). Взаимодействие ионов  $Ca^{2+}$  с рецептором  $Ca^{2+}$ -зависимых  $K^+$ -каналов переводит их в открытое состояние, и ионы калия начинают выходить из клетки по градиенту электрохимического потенциала. Это является причиной гиперполяризации мембранного потенциала и закрытия потенциалзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов. Уровень кальция в клетке снижается, и мембранный потенциал стабилизируется. Таким образом, взаимодействие калиевых и кальциевых каналов позволяет регулировать потенциал покоя клетки.

## 8. $Ca^{2+}$ -каналы

Все  $Ca^{2+}$ -каналы делятся на две большие группы: потенциалзависимые и рецепторуправляемые. В свою очередь в зависимости от проводимости, времени жизни в открытом состоянии, скорости активации или инактивации потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы делятся на четыре типа: дигидропиридинчувствительные  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа,  $Ca^{2+}$ -каналы T-, N- и P-типа. Многие двухвалентные ионы подавляют работу  $Ca^{2+}$ -каналов. Эффективно блокируют  $Ca^{2+}$ -токи ионы  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , а также  $La^{3+}$ . При концентрации кальция более 1 мкмоль/л функция  $Ca^{2+}$ -каналов уже может быть

необратимо подавлена. Поэтому при работе с  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами необходимо применять буферные смеси, содержащие хелатирующие кальций соединения, например ЭГТА. Помимо этого приема, инактивации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов не произойдет, если содержащиеся в среде ионы  $\text{Ca}^{2+}$  заменить на ионы  $\text{Ba}^{2+}$ .

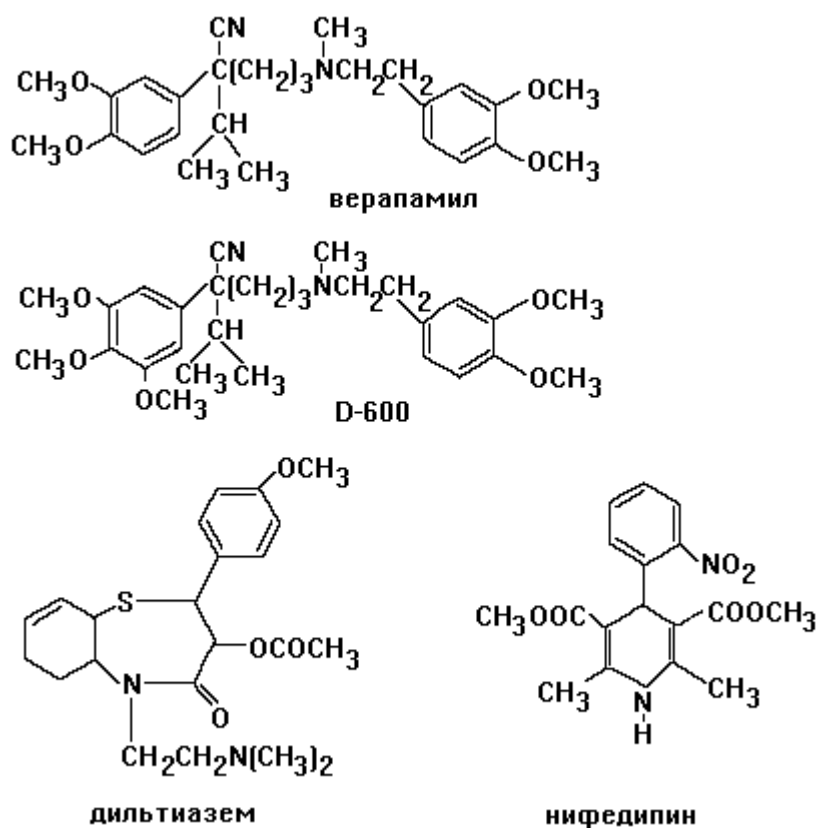


Рис.17. Структура некоторых блокаторов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов.

К блокаторам  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов органического происхождения относятся три типа липофильных азотсодержащих соединений. В первую группу входят производные фенилалкиламина - верапамил, D-600, вторая группа включает производные 1,4-дигидропиридинов - нифедипин, нитрендипин, к третьей группе относятся производные бензотиазепина, например дильтиазем (рис. 17). Эти ингибиторы чаще всего действуют на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа. Однако необходимо учитывать, что в высоких концентрациях они могут блокировать также функционирование  $\text{Na}^{+}$ - и  $\text{K}^{+}$ -каналов.

Канал может находиться в трех состояниях - открытом, инактивированном и закрытом. Механизм действия дигидропиридинов и других лигандов (антагонистов или агонистов) заключается в стабилизации структуры  $\text{Ca}^{2+}$ -канала в одном из этих состояний. Чувствительность к лигандам зависит как от их строения, так и от типа канала и величины мембранного потенциала.

Местные анестезирующие вещества такие как лидокаин и тетракаин, также способны связываться с каналом в его открытой конфигурации и временно его блокировать. Однако их ингибирующий эффект (по сравнению с фенилалкиламинами) менее специфичен.

Проводя фармакологический анализ необходимо учитывать, что основными факторами, способными повлиять на конформацию рецептора, являются мембранный потенциал и концентрация антагониста или агониста. Деполяризация мембраны, как правило, вызывает повышение степени связывания с каналом дигидропиридинов. Особенно наглядно различия в действии фармакологических агентов проявляются в случае  $\text{Ca}^{2+}$ -агонистов. Например, кальциевый агонист  $\text{Ba}^{2+}$  К 8644 в высоких

концентрациях снижает количество закрывшихся в темноте листьев бобовых растений, а в низких концентрациях действует наоборот. Ионы  $Gd^{3+}$ , которые многие исследователи используют как блокатор механочувствительных каналов, в низких концентрациях способны резко повысить чувствительность каналов к механическим воздействиям.

Работа рецепторуправляемых  $Ca^{2+}$ -каналов может модулироваться фитогормонами, при этом внешний лиганд активирует каналы напрямую, без диффузного посредника. Связующим звеном в этом случае выступают G-белки, способные модулировать работу каналов сами по себе или через активацию протеинкиназ.

$Ca^{2+}$ -каналы, регулируемые вторичными посредниками (например, инозитол 1,4,5-трифосфат( $IP_3$ )-зависимые), отличаются тем, что, во-первых, их активность контролируется подвижными посредниками, возникающими в результате взаимодействия лиганда с рецептором, а, во-вторых, этот тип  $Ca^{2+}$ -каналов активируется при гиперполяризации мембраны. Отрицательный поверхностный потенциал вблизи устья канала способствует увеличению кальциевой проницаемости за счет концентрирования  $Ca^{2+}$  у входа в канал. Поток ионов кальция через  $IP_3$ -контролируемые Ca-каналы эндомембран растительных клеток так же, как и в животных организмах угнетается гепарином. Мембраносвязанные G-белки, вероятно, также способны контролировать потоки ионов кальция через растительные мембраны. Потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы и  $Ca^{2+}$ -каналы, активирующиеся инозитол 1,4,5-трифосфатом, обнаружены в тонопласте. Обработка АТФ способна оказать аллостерическое воздействие на потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы.

Впервые в 1983 г. Луневскому с коллегами удалось получить прямые доказательства функционирования потенциалзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов у харовых водорослей. В дальнейшем Жерелова и Грищенко обнаружили, что  $Ca^{2+}$ -каналы, локализованные в плазмалемме клеток *Nitellopsis obtusa*, при фиксации напряжения на уровне -150 мВ находились в закрытом состоянии и активировались при деполяризации плазмалеммы до -50 мВ.  $Ca^{2+}$ -каналы действуют практически во всех мембранных образованиях растительных клеток. Например, увеличение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме замыкающих клеток устьиц *Vicia faba* и протопластах *Pisum sativum* под действием гормональных и некоторых других факторов связано с работой  $Ca^{2+}$ -каналов плазмалеммы. Функционирование потенциалзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов на плазмалемме клеток колеоптилей кукурузы, пшеницы и гороха было продемонстрировано с помощью флуоресцентных  $Ca^{2+}$ -зависимых зондов. Из колеоптилей кукурузы удалось выделить мембранные белки, имеющие места связывания с ингибитором  $Ca^{2+}$ -каналов - верапамилом. Эти белки, будучи встроенными в липидный бислой, проявляли свойства  $Ca^{2+}$ -каналов.

Впервые выделить  $Ca^{2+}$ -каналы из клеток харовых водорослей (*Nitellopsis obtusa*), осуществить их реконструкцию в липидный бислой и создать условия для их функционирования удалось Берестовскому с коллегами. Встроенные в липидный бислой  $Ca^{2+}$ -каналы, выделенные из клеток корней пшеницы, при потенциалах, более отрицательных, чем -130 мВ, были закрыты. Каналы блокировались верапамилом (1 мкмоль/л) с внешней стороны клетки. Степень ингибирования возрастала при более отрицательных потенциалах. Повышение концентрации верапамила изменяло только время открытого состояния канала и не сказывалось на амплитуде токов через одиночный канал. В отличие от животных клеток,  $Ca^{2+}$ -каналы растений характеризуются большим временем нахождения в открытом (от нескольких миллисекунд до секунд) и закрытом (до 100 с) состояниях.

Потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы имеют важное значение в ответных реакциях растений на гормоны и патогенные сигналы. При физиологических концентрациях кальция они способны активироваться при мембранном потенциале более положительном, чем -140 мВ, что на 50-90 мВ отрицательнее пороговых значений  $E_M$  для потенциалзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов животных клеток. В качестве эффективного

механизма деполяризации, запускающего  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы растительной клетки, может служить активация анионных каналов плазмалеммы, которая в свою очередь зависит от входа в клетку ионов кальция через плазмалемму.

Большинство исследователей для анализа работы ионных каналов применяют метод фиксации напряжения. Нами было показано, функционирование ионных каналов можно изучать с помощью флуоресцентных зондов на везикулах очищенных мембран растительных клеток (рис. 18). Везикулы плазмалеммы из клеток кукурузы с помощью осмотического шока загружались средой, содержащей 150 ммоль/л сульфата калия и помещались в среду инкубации, содержащую 150 ммоль/л сульфата натрия (рис.18, а). Обработка везикул  $\text{K}^+$ -ионофором валиномицином индуцирует поток ионов калия по градиенту концентрации, в результате чего на мембране возникает диффузионный потенциал со знаком "минус" внутри везикул. При этом с помощью флуоресцентных зондов регистрировался пассивный вход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в везикулы (рис.18, б). Поскольку предобработка везикул блокатором  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов верапамилом подавляла потенциалзависимый транспорт ионов кальция (см. рис 18,в и рис.19), то можно полагать, что в мембране везикул функционируют потенциалзависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы.

На рис.19 приведены характерные кривые флуоресценции  $\text{Ca}$ -чувствительного зонда индо-1 внутри везикул плазмалеммы при возникновении на их мембране  $\text{K}^+$ -зависимого диффузионного потенциала. Обработка везикул валиномицином, инициирующая появление мембранного потенциала, вызывает возрастание флуоресценции зонда, что свидетельствует о транспорте ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь везикул (контрольный вариант). В том случае, когда везикулы были обработаны блокаторами  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов верапамилом или лидокаином, потенциалиндуцируемый транспорт кальция подавлялся (см. также рис. 18, б, в).

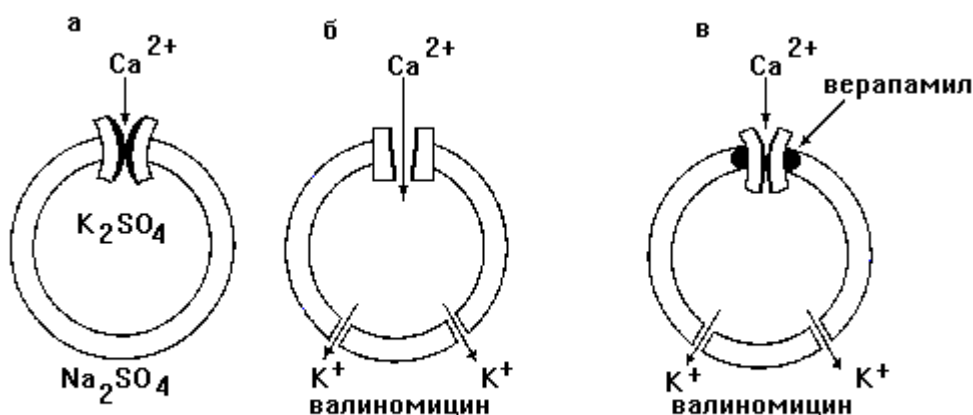


Рис.18. Схема анализа функционирования ионных каналов на везикулах мембран с помощью флуоресцентных зондов.



Рис.19. Кривые флуоресценции при действии блокаторов Са-каналов на транспорт ионов Са внутрь везикул плазмалеммы клеток колеоптилей кукурузы.

Стрелками отмечены моменты добавления в инкубационную среду валиномицина.

Анализ зависимости транспорта ионов кальция через мембраны везикул плазмалеммы клеток колеоптилей кукурузы от величины мембранного потенциала  $E_M$  показал (рис. 20), что максимальная флуоресценция Са-чувствительного зонда хлортетрациклина наблюдается в диапазоне мембранного потенциала от -50 до -70 мВ. Т.е. мембранный поток кальция наиболее интенсивен при значениях мембранного потенциала, соответствующих деполяризованному состоянию клеток. Эти результаты согласуются с данными, полученными электрофизиологическими методами. Например,  $Ca^{2+}$ -каналы на плазмалемме клеток *Nitellopsis obtusa* проявляют наибольшую активность при изменении фиксированного на мембране потенциала от -150 до -50 мВ. Поэтому можно полагать, что в плазматической мембране растительных клеток функционируют активирующиеся при деполяризации мембраны потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы, которые, по-видимому, относятся к L-типу.



Рис.20. Изменение флуоресценции зонда хлортетрациклина (ХТЦ) при генерации на мембране везикул потенциала ( $E_M$ ) от 0 до -100 мВ.

В инкубационную среду добавлены ХТЦ (70 мкмоль/л),  $CaCl_2$  (0,1 ммоль/л) и валиномицин (8,3 нмоль/л).

## 9. Анионные каналы

В зависимости от структуры, селективности, проводимости, чувствительности к блокаторам и агонистам в клетках животных организмов различают фоновые  $\text{Cl}^-$ -каналы,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые  $\text{Cl}^-$ -каналы, макси- $\text{Cl}^-$ -каналы, двуствольные  $\text{Cl}^-$ -каналы и  $\text{Cl}^-$ -каналы, активируемые нейротрансмиттерами.

Фоновые (background) анионселективные  $\text{Cl}^-$ -каналы имеют высокую вероятность при потенциале покоя находиться в открытом состоянии и слабую зависимость от величины мембранного потенциала. Эти малоселективные каналы проницаемы для однозарядных анионов ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , ацетат,  $\text{F}^-$ , аспартат, глутамат) и щелочных катионов ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ). Поскольку селективный фильтр  $\text{Cl}^-$ -канала представлен анионной группой, то транспорт через канал аниона возможен только вместе с катионом. Поэтому процесс передвижения ионов по каналу связан с образованием комплекса, включающего отрицательно заряженный участок канала, катион и анион.

$\text{Ca}^{2+}$ -зависимые  $\text{Cl}^-$ -каналы, активируются внутриклеточным кальцием в концентрации 0,1 - 1 мкмоль/л и имеют следующий ряд селективности:  $\text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые  $\text{Cl}^-$ -каналы, наряду с калиевыми, вероятно, обеспечивают фазу реполяризации в ходе генерации потенциала действия.

Макси- $\text{Cl}^-$ -каналы имеют очень высокую проводимость и анионную проницаемость в ряду  $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ . Канал открыт в отсутствие электрического градиента на мембране и уже инактивируется при сдвиге потенциала в +20 мВ.

Двуствольные  $\text{Cl}^-$ -каналы получили такое название из-за модели воротного механизма, сходной с двуствольным ружьем. Эти каналы, вероятно, обеспечивают необычайно высокую проводимость клеток электрических органов животных например электрического ската.

Клетки растительных организмов характеризуются очень высоким электрохимическим градиентом анионов на плазматической мембране в обычных условиях. Хлорный диффузионный потенциал у *Chara* на плазмалемме достигает +300-+340 мВ, а между вакуолью и цитоплазмой - + 20-+45 мВ. Поэтому активация анионных каналов, как правило, вызывает резкие изменения мембранного потенциала. Это важная особенность физиологии анионных каналов растений отличает их от анионных каналов животных организмов, в которых ионы  $\text{Cl}^-$  находятся вблизи электрохимического равновесия между клеткой и средой. В растениях, по-видимому, только ионы  $\text{K}^+$  могут быть в таком состоянии. Электрохимические градиенты на плазмалемме и тонопласте для других ионов ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ ) далеки от равновесных.

Основываясь на различиях в селективности, у высших растений выделяют два типа анионных каналов. В тонопласте обнаружены медленные вакуолярные (slow vacuolar-SV) и быстрые вакуолярные (fast vacuolar-FV) каналы, более проницаемые к катионам, чем к анионам. Высокая проницаемость анионных каналов к катионам объясняется тем, что передвижение аниона через анионный канал идет только вместе с катионом, поскольку селективный фильтр канала, вероятно, представлен анионной группой.

Второй тип анионных каналов растений более специфичен по отношению к анионам, чем к катионам, и лучше проницаем для нитрата, чем для хлорида. Высокую проницаемость для нитрата анионных каналов тонопласта, вероятно, можно объяснить высоким содержанием  $\text{NO}_3^-$  в вакуоли. Каналы этого типа, локализованные в плазмалемме замыкающих клеток устьиц, имеют высокую проницаемость также и для малата ( $I_{\text{Cl}^-}/I_{\text{малат}}=1,3-3,9$ ).

К факторам, которые инициируют открывание или закрывание анионных каналов, относятся изменение мембранного потенциала и концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , механические воздействия, их фосфорилирование или дефосфорилирование каналов.

В плазмалемме и тонопласте харовых водорослей и клетках высших растений присутствуют анионные каналы, активируемые гиперполяризацией мембраны и

повышением уровня кальция. На рис. 21 приведены параметры функционирования анионного канала, активируемого при гиперполяризации плазматической мембраны протопластов, полученных из клеток *Amaranthus tricolor*. Анионные каналы, открывающиеся при увеличении уровня кальция в цитоплазме, способны усиливать потенциал действия у харовых водорослей и обеспечивать мощный поток хлора в процессе регулирования тургорного давления и открытия устьиц. Они-то и обеспечивают фазу деполяризации потенциала действия в растениях. При генерации потенциала действия у *Nitella* концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме может достигать 0,6-1 мкмоль/л из-за потока кальция из внешней среды и, возможно, из вакуоли. Это вызывает активацию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{Cl}^-$ -каналов, локализованных внутри цитоплазмы, и мощный поток ионов  $\text{Cl}^-$  из клетки. При этом  $\text{IP}_3$  увеличивает поток и  $\text{Ca}^{2+}$ , и  $\text{Cl}^-$ .  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$  не влияют на работу  $\text{Cl}^-$ -каналов, а эффект ионов  $\text{Sr}^{2+}$  на три порядка слабее, чем  $\text{Ca}^{2+}$ .

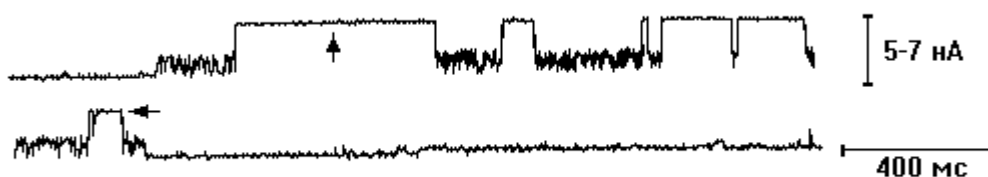


Рис.21. Регистрация работы анионного канала (активируемого гиперполяризацией) в плазмалемме клеток *Amaranthus tricolor* [Турман, 1992].

Стрелками показан уровень закрытого состояния канала.

Помимо этих каналов в плазмалемме клеток высших растений методом patch-clamp обнаружены механочувствительные анионные каналы и анионные каналы, активирующиеся при деполяризации мембраны. В замыкающих клетках устьиц эти каналы открываются, например, при мембранном потенциале от -80 до -20 мВ и являются также  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми. Этому процессу способствует  $\text{IP}_3$ , который вызывает повышение уровня кальция в цитоплазме и деполяризацию мембраны замыкающих клеток устьиц вследствие модификации  $\text{K}^+$ -каналов.

Среди большинства хорошо известных блокаторов анионных каналов животных клеток наиболее эффективными в клетках растений являются ионы  $\text{Zn}^{2+}$ , стильбеновые дериваты (DIDS и SITS), этакриновая кислота и антрацен-9-карбоновая кислота. Последняя угнетает работу и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{Cl}^-$ -каналов, и  $\text{Cl}^-$ -каналов, активируемых при гиперполяризации. Этакриновая кислота,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{La}^{3+}$  эффективнее блокируют  $\text{Cl}^-$ -каналы, активируемые гиперполяризацией мембраны.  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые  $\text{Cl}^-$ -каналы, по-видимому, более чувствительны к DIDS.

## 10. $\text{Na}^+$ -каналы

Потенциалзависимые  $\text{Na}^+$ -каналы наиболее важное значение имеют в процессах генерации и проведения возбуждения. Обнаружены природные токсины тетродотоксин и сакситоксин, которые являются очень специфическими блокаторами именно  $\text{Na}^+$ -каналов. Действие местных анестетиков (новокаин, бензокаин, лидокаин, тетракаин), которые препятствуют возникновению потенциалов действия, также определяется их способностью блокировать работу  $\text{Na}^+$ -каналов.

## 11. Механочувствительные ионные каналы

Функционирование ионных каналов может зависеть от растяжения мембраны и ее смещения. Каналы, которые изменяют активность в зависимости от натяжения мембраны, называются механочувствительными, хотя кроме них описаны каналы, увеличивающие активность при снятии натяжения. Впервые  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие механочувствительные каналы были показаны на эндотелиальных клетках, где они выполняют роль сенсора кровяного давления. Каналы с аналогичными свойствами были обнаружены в бактериях, грибах и высших растениях.

Функционирование механочувствительных каналов происходит во взаимодействии с цитоскелетом. Чувствительность каналов к натяжению возрастает, если сила, приложенная к большому участку мембраны, концентрируется на канале посредством элементов цитоскелета. Связь трансмембранных линкеров с актиновыми филаментами осуществляется набором белков, известных как анкирины.

Выделяют два типа каналов, чувствительных к натяжению мембраны: SA-каналы, активирующиеся при растяжении мембраны (stretch-activated) и SI-каналы, которые при растяжении мембраны инактивируются (stretch-inactivated) (рис. 22). В зависимости от объекта и типа клетки встречаются механочувствительные каналы селективные к  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и другим двухвалентным катионам, проницаемые для одно- и двухвалентных катионов, и неселективные (или слабоселективные) для анионов и катионов. Наиболее часто в качестве ингибитора механочувствительных каналов используют гадолиний ( $\text{Gd}^{3+}$ ), который обратимо блокирует работу каналов в микромолярных (10 мкмоль/л) концентрациях. Гадолиний действует с наружной стороны мембраны и не проникает через нее. В отличие от рецептор- и потенциалзависимых ионных каналов, плотность распределения в мембранах механочувствительных каналов невелика и составляет в среднем один канал на  $1 \text{ мкм}^2$ . Тем не менее такая их плотность может обеспечить, например, при мембранном потенциале  $-60 \text{ мВ}$  кальциевый ток через SA-канал достигающий  $0,1 \text{ нА}$ . Наиболее важное значение механочувствительные ионные каналы имеют в ростовых движениях различного типа и в регуляции работы устьичного аппарата. Механическое взаимодействие клеток в ходе их развития приводит к натяжению (или сдвигам) клеточных мембран, активации механочувствительных каналов и появлению векторизованных ионных потоков, которые уже непосредственно осуществляют регуляцию процессов роста и дифференцировки.

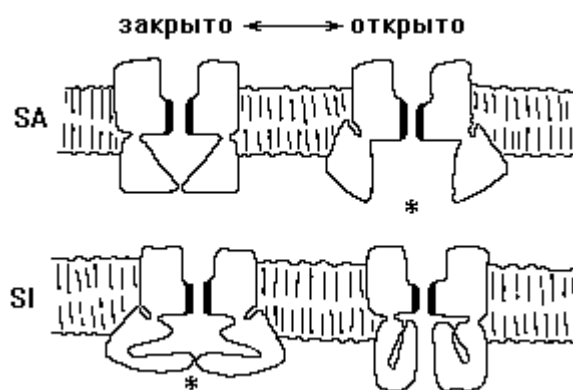


Рис.22. Два типа ионных каналов, чувствительных к натяжению мембраны [Morris, 1990].

В растениях механочувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы выявлены методом patch-clamp в замыкающих клетках устьиц и в плазмалемме эпидермиса лука. Их активность зависит от температуры, pH и мембранного потенциала. Эти каналы объединены в кластеры и специфически ингибируются гадолинием и алюминием. На рис.23 приведен пример функционирования катионных каналов на плазмалемме ризоида *Fucus*.





Рис.23. Регистрация работы механочувствительных катионных каналов ( $K^+_{in}$  и  $Ca^{2+}_{in}$ ) в апикальной части плазмалеммы ризоида бурой водоросли *Fucus* [Taylor, Brownlee, 1995].

Стрелками указаны моменты нанесения механического раздражения и снятие нагрузки.

## 12. Ионофоры

Известен ряд соединений (выделенных в основном из бактерий и грибов), которые делают мембрану проницаемой либо для конкретного типа ионов, либо для широкого класса ионов. Эти соединения называются ионофорами, или каналоформерами. Транспорт с участием ионофора, иногда называемый индуцированным ионным транспортом, происходит следующим образом: ионофор образует комплекс с ионом на одной стороне мембраны, перемещает его через мембрану, освобождает ион на другой стороне мембраны и возвращается обратно.

Ионофоры существенно отличаются по своей химической природе и делятся на пептиды, депсипептиды, макротетралиды и макроциклические полиэферы. Пептиды могут быть линейными (граммицидин А) и циклическими (граммицидин S, аламетицин). В группу депсипептидов входят такие важные ионофоры как валиномицин и различные энниатины. Макротетралиды, или актины, представляют собой производные нонактиновой кислоты с четырьмя лактонными кольцами в молекуле (нонактин). Все макроциклические полиэферы являются синтетическими соединениями типа  $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$  с различными замещениями по метиленовым группам. Их часто называют краунами. В этой группе соединений есть ионофоры, обладающие очень высокой избирательностью по отношению к конкретным ионам. По механизму действия ионофоры делят на нейтральные, в молекуле которых нет ионизированных групп, и карбоксилатные. К последним относятся, например, нигерицин, моненсин, А23187, иономицин (рис.24). Комплекс катиона с нейтральным ионофором заряжен положительно, а с карбоксилатным - нейтрален.

Из существующих ионофоров наиболее высокую селективность имеет циклический депсипептид валиномицин, связывающий калий в 1000 раз эффективнее, чем натрий и обеспечивающий проникновение его через мембраны. Среди известных  $\text{Na}^+$ -ионофоров по селективным свойствам выделяется *гемисодиум*, при обработке которым проводимость мембраны для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  составляет 45:1. Средство моненсина к натрию по сравнению с калием составляет 10:1. Моненсин и нигерицин являясь заряженными линейными структурами, способны образовывать нейтральный циклический гидрофобный комплекс с переносимым ионом и осуществлять  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  или  $\text{K}^+/\text{H}^+$  обмен через мембрану. Антибиотик грамицидин А способен на несколько порядков увеличивать ионную проницаемость мембран для катионов. Ряд селективности для грамицидинового канала имеет вид:  $\text{H}^+ > \text{NH}_4^+ \gg \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ \gg \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ .

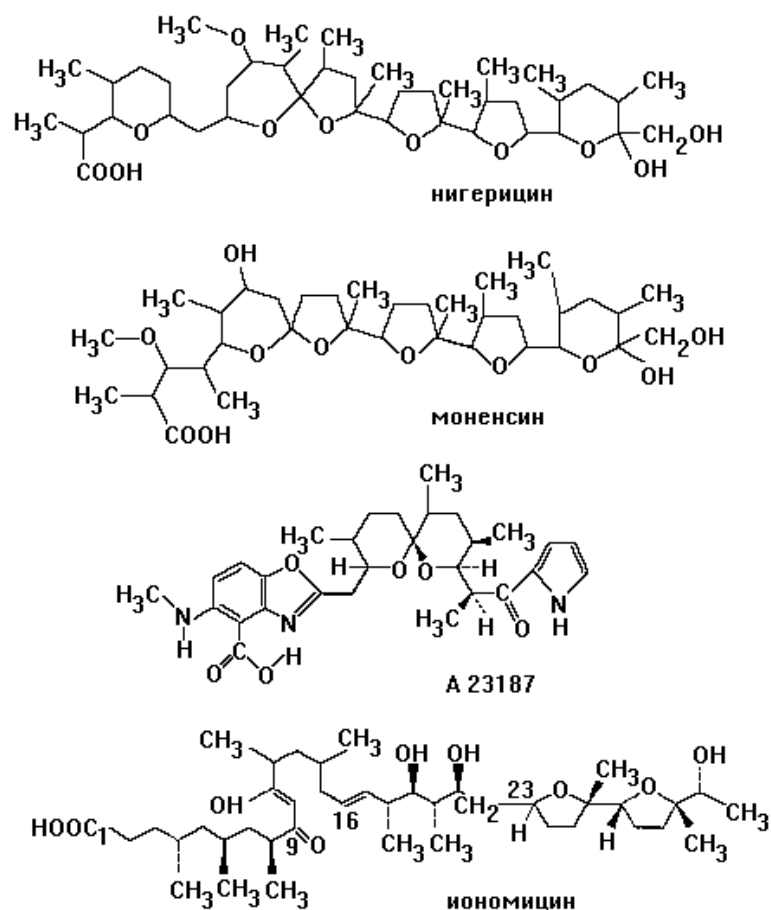


Рис.24. Структуры некоторых карбоксилатных ионофоров.

Переносчики двухвалентных катионов X537A и A23187 считаются высокоселективными Ca<sup>2+</sup>-ионофорами и индуцируют обмен Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> на протоны. Полиэфирный антибиотик A23187 опосредует электронейтральный обмен на другой двухвалентный катион или два протона. Его сродство к двухвалентным катионам изменяется в ряду: Mn<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> > Sr<sup>2+</sup> > Ba<sup>2+</sup>. Более селективным Ca<sup>2+</sup>-ионофором является полиэфирный антибиотик иономицин, еще одним преимуществом которого является отсутствие собственной флуоресценции, что позволяет его использовать в флуоресцентных методах. Иономицин связывает Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> лучше, чем A23187, в то же время имеет низкое сродство к Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> и одновалентным катионам.

Перенос через мембрану протонов эффективно осуществляется разобщителями окислительного и фотосинтетического фосфорилирования, к которым относятся такие липофильные соединения как 2,4-динитрофенол, ДЦКД, КЦФХГ и др. В основном это слабые кислоты, диссоциированная форма которых присоединяет протон с образованием нейтральной молекулы. Эта недиссоциированная молекула протонифора пересекает мембрану, двигаясь по градиенту концентрации. Перенос отрицательно заряженной анионной формы в обратном направлении идет под действием электрического поля. Ионофоры (каналоформеры) являются важным инструментом в исследовании функционирования биологических мембран, имеют большое значение в фармакологии в качестве лекарственных препаратов и часто применяются как компоненты ионоселективных электродов.

### 13. Участие ионных каналов и насосов в сигнальной трансдукции

Обычно во внутренней жидкой среде организмов (особенно животных) содержание большинства ионов соответствует их содержанию в морской воде, где зародилась жизнь, и отличается от содержания ионов соответствует их содержанию в морской воде, где зародилась жизнь, в отличие от содержания ионов в цитоплазме. Существующее неравновесие по ионам  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  используется клеткой для создания мембранных градиентов биоэлектрод потенциалов и для регуляторных целей.

Наибольшие различия в содержании в клетке и вне ее характерны для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Так, количество ионов кальция в цитозоле обычно на 2-3 порядка ниже, чем в фазе клеточных стенок или вакуоли, и составляет в среднем 0,1 мкмоль/л, поэтому живые системы обладают мощными механизмами удаления кальция из цитоплазмы и поддержания необходимого градиента между клеткой и внешней средой. В клетке практически на всех мембранных образованиях имеется надежная система  $\text{Ca}^{2+}$ -статирования, связанная с функционированием различных типов ионных насосов и каналов. Митохондрии, хлоропласты и вакуоли способны накапливать ионы кальция в больших количествах (часто до 1 ммоль/л). Мембраны этих органелл отличаются более высоким содержанием  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем, которые, однако, обладают низким сродством к этому катиону. Работа  $\text{Ca}^{2+}$ -насосов мембран вакуоли, митохондрий и особенно хлоропластов обеспечивает эффективное, но не слишком избирательное удаление излишков ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля. Более тонкая коррекция уровня кальция в клеточных компартментах осуществляется за счет работы Са-АТФаз плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума, отличающихся более высоким сродством к ионам кальция.

Система мембранного транспорта кальция в плазмалемме и эндомембранах клеток высших растений включает в себя также и Са-селективные ионные каналы различных типов, работа которых имеет важное значение в ответе клетки на различные внешние стимулы. Практически любые внешние воздействия приводят к резкому повышению (на 1-2 порядка) концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Локальное повышение уровня цитоплазматического кальция является причиной взаимодействия его с различными Са-связывающими белками, одни из которых сами меняют свою активность, а другие (например, кальмодулин) опосредуют эффект этого катиона на многочисленные молекулярные мишени.

Дифференциацию зигот многих водорослей можно индуцировать с помощью одностороннего приложения градиентов некоторых ионов ( $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). Например, наложение искусственного градиента  $\text{Ca}^{2+}$ , создаваемого путем односторонней обработки ионофором А23187, служило причиной направленного роста ризоидов *Fucus* и *Pelvetia* в сторону более высокой концентрации этого катиона. У клеток с полярным типом роста в аксиальном направлении формируются в первую очередь полярные потоки ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , вероятно, из-за асимметрии в распределении кальциевых каналов и помп на противоположных сторонах или зонах клетки. При этом каналы концентрируются, по-видимому, на растущем участке, давая возможность  $\text{Ca}^{2+}$  входить в клетку по градиенту электрохимического потенциала, в то время как помпы, расположенные в дистальных зонах, участвуют в удалении кальция против градиента концентрации с затратой энергии АТФ.

Детальный цитологический анализ распределения активности Са-АТФазы на эндомембранах прорастающей пыльцевой трубки показал, что максимум активности этого фермента концентрируется в ее апикальной части, в прилегающей к ней части тонопласта и эндоплазматического ретикулума. Поэтому в формировании апикально-базального градиента кальция и концентрировании этого катиона в апикальных точках роста, видимо, могут участвовать не только Са-каналы и Са-АТФазы плазмалеммы, но и

Ca-АТФазы эндомембран, мобилизующие запасы этого катиона из внутриклеточных депо.

Ионные каналы совместно с системой вторичных посредников и сигнальных белков являются основным компонентом системы трансдукции сигналов в растительных организмах. Наиболее ярким примером активации целого каскада ионных каналов в ходе трансдукции гормонального сигнала в высших растениях являются движения замыкающих клеток устьиц в ответ на обработку абсцизовой кислотой (АБК). В устьицах для АБК имеются два места связывания, расположенных снаружи и внутри замыкающих клеток (рис.25).

Самым ранним ответом замыкающих клеток на обработку АБК является повышение (через 2 с) уровня ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле за счет активации низкоспецифичных  $Ca^{2+}$ -проницаемых каналов плазмалеммы. Одновременно возрастает также и количество  $IP_3$ , который инициирует высвобождение ионов  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Повышение содержания ионов  $Ca^{2+}$  и  $IP_3$  является причиной угнетения  $K^+_{in}$ -каналов в плазмалемме клеток устьиц, которые обеспечивают аккумуляцию ионов  $K^+$  во время открывания устьиц, но не принимают участия в их закрытии.

Закрывание устьиц происходит в результате падения тургора в замыкающих клетках за счет выхода большого количества ионов  $K^+$  через активируемые деполяризацией плазмалеммы  $K^+_{out}$ -каналы, потока анионов через анионные каналы, а также превращения малата в крахмал (см. рис.25). Однако активация  $K^+_{out}$ -каналов, которая приводит мембранный потенциал только к равновесному по калию, не позволяет обеспечить продолжительный поток ионов  $K^+$  из замыкающих клеток и длительное закрытие устьиц. Для этой цели при действии на клетки АБК подключаются анионные каналы замыкающих клеток устьиц, при этом инициируемый АБК поток ионов калия из клетки вызывает подщелачивание цитоплазмы.

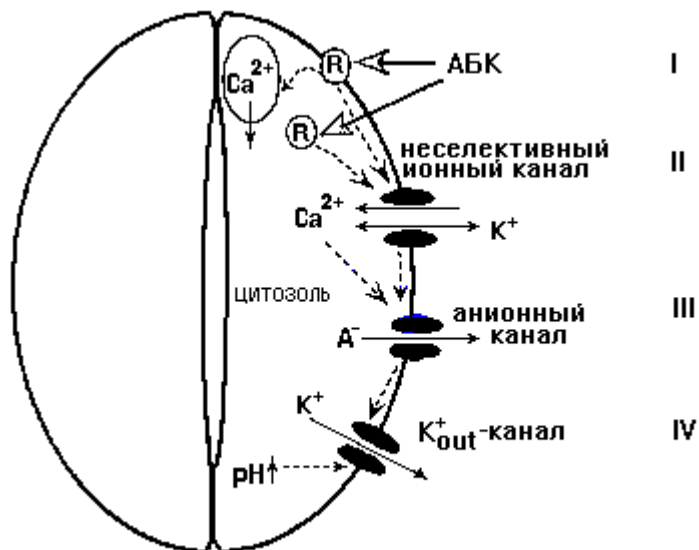


Рис.25. Ионные каналы плазмалеммы замыкающих клеток устьиц, участвующие в закрывании устьиц, индуцированном АБК [Ward e.a., 1995].

I - активация рецепторов АБК приводит к Ca-зависимым и Ca-независимым сигнальным процессам, регулирующим работу ионных каналов; II- быстрая активация неселективных ионных каналов вызывает деполяризацию мембранного потенциала, что увеличивает поток ионов  $Ca^{2+}$  внутрь клетки. Увеличение концентрации ионов в цитоплазме  $Ca^{2+}$  и образование других сигнальных интермедиатов является триггером для высвобождения ионов  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо; III-деполяризация мембраны, возрастание содержания ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и некоторые другие сигналы приводят к активации анионных каналов, которые обеспечивают долговременную деполяризацию мембраны и выделение из клетки анионов; IV-деполяризация мембраны активирует  $K^+_{out}$ -каналы и поток ионов  $K^+$  из клетки, а также инициируемое АБК подщелачивание цитоплазмы.

Длительная деполяризация плазмалеммы, индуцируемая АБК, в первую очередь связана с активацией анионных каналов, которые обеспечивают выход из замыкающих клеток неорганических анионов и малата и, как следствие, длительное падение мембранного потенциала. Деполяризация мембраны активирует  $K^+$ <sub>out</sub>-каналы и высвобождение ионов  $K^+$  из замыкающих клеток. Вероятно, поэтому считается, что анионные каналы плазмалеммы играют центральную роль в механизме закрывания устьиц. Активация анионных каналов плазматической мембраны происходит, видимо, за счет повышения уровня кальция в цитоплазме, индуцируемого АБК.

В замыкающих клетках устьиц обнаружены два типа анионных каналов: медленные (slow) (S-тип) и быстрые (rapid) (R-тип). Оба типа каналов активируются при деполяризации мембранного потенциала, однако активация анионных каналов S-типа приводит к долговременному (на несколько минут) снижению мембранного потенциала, а активация каналов R-типа вызывает короткую деполяризацию плазмалеммы (рис.26). Существуют доказательства того, что оба типа анионных каналов могут быть представлены одним и тем же белком, который переходит от S к R-типу анионной проводимости при его фосфорилировании. Получены данные, указывающие на то, что ИУК может выступать как модулятор белков анионных каналов плазмалеммы.

Центральным звеном в регуляции механизма закрывания устьиц, вероятно, является активация анионных каналов S-типа, которые способны обеспечивать устойчивую длительную деполяризацию мембраны, необходимую для включения  $K^+$ <sub>out</sub>-каналов и выхода ионов  $K^+$  из замыкающих клеток. Это подтверждается тем, что угнетающий эффект блокаторов анионных каналов S-типа на АБК-индуцируемое закрывание устьиц выражен гораздо в большей степени, чем блокирование работы  $Ca^{2+}$ -каналов.

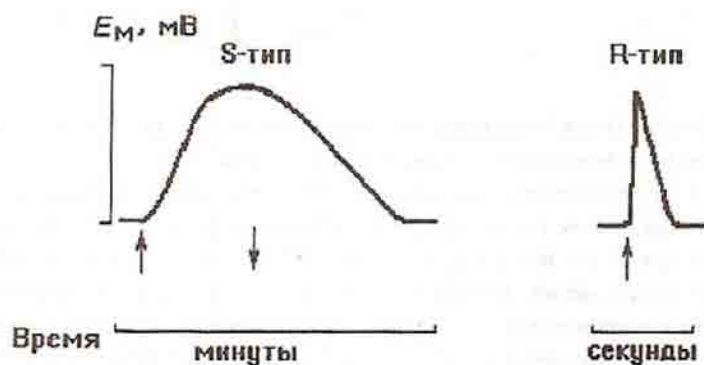


Рис.26. Динамика деполяризации плазмалеммы при активации медленных (S-тип) и быстрых (R-тип) анионных каналов [Ward e.a., 1995].

Стрелками показаны моменты стимуляции.

Механизм осморегуляции в замыкающих клетках устьиц невозможно понять без рассмотрения роли в этом процессе вакуоли, поскольку она занимает до 90% объема клетки и более 90% осмотически активных веществ пересекают не только плазмалемму, но и тонопласт при движениях устьиц.

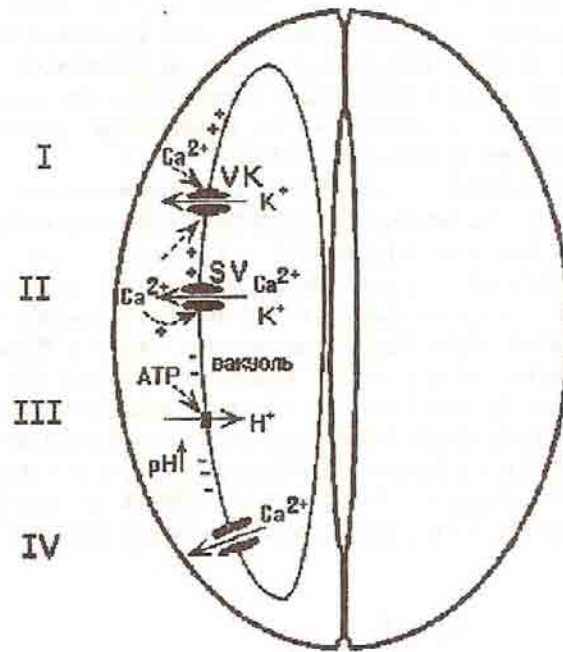


Рис.27. Ионные каналы тонопласта замыкающих клеток, участвующие в закрытии устьиц [Ward e.a., 1995].

I - увеличение содержания  $Ca^{2+}$  в цитоплазме активирует высокоселективные вакуолярные  $K^+$ -каналы (VK-каналы) тонопласта, в результате возникает поток ионов  $K^+$  в цитоплазму, который сдвигает мембранный потенциал вакуоли; II- активация медленных потенциалзависимых неселективных SV-каналов тонопласта приводит к высвобождению ионов  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  из вакуоли в цитоплазму. Увеличение содержания ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме обеспечивает по принципу положительной обратной связи дальнейшую активацию и SV-, и VK каналов тонопласта; III-активация вакуолярной  $H^+$ - помпы приводит к формированию долговременного потока ионов  $K^+$  по VK-каналам и подщелачивания цитоплазмы в ответ на обработку АБК; IV- активация  $Ca^{2+}$ -каналов при защелачивании цитоплазмы обеспечивает поток ионов  $Ca^{2+}$  из вакуоли в цитоплазму.

Основной путь выхода ионов  $K^+$  из вакуоли - высокоселективные вакуолярные  $K^+$ -каналы (VK-каналы), активирующиеся, когда концентрация ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме повышается до физиологического уровня (1 мкмоль). При этом может активироваться и  $H^+$ -помпа, обеспечивающая АБК-индуцированное защелачивание цитоплазмы (рис. 27). Селективный выход ионов  $K^+$  из вакуоли по многочисленным VK-каналам приводит к сдвигу вакуолярного электрического потенциала и активации медленных потенциалзависимых неселективных SV-каналов тонопласта. Последние обычно активируются при нулевом или более положительном мембранном потенциале тонопласта и при повышенном содержании ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме. В процессе закрытия устьиц по SV-каналам тонопласта катионы ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) поступают из вакуоли в цитоплазму. Помимо SV-каналов ионы  $Ca^{2+}$  могут также перемещаться из вакуоли по потенциалзависимым  $Ca^{2+}$ -каналам тонопласта, активируемым при отрицательном потенциале цитоплазмы.

## ПОТЕНЦИАЛЫ ПОКОЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

Сравнительно простое и единообразное (по сравнению с животными организмами) распределение процессов роста и обмена веществ по их интенсивности между основными органами и тканями растения обуславливает существование четко выраженных метаболических градиентов, которые в свою очередь являются причиной возникновения в них градиентов биоэлектрических потенциалов (БЭП). Градиенты БЭП метаболического происхождения регистрируются вдоль корня, листа, побега и всего растительного организма.

Основной же характеристикой живой клетки, поддерживающей с окружающей средой состояние равновесия, является ее потенциал покоя, или мембранный потенциал. На основе потенциала покоя формируются все типы электрофизиологических процессов. Чем выше потенциал покоя, тем он относительно стабильнее, более выражена функциональная специализация и более высокая интенсивность обмена веществ клетки. Нарушение нормального физиологического состояния клетки, приводящее к изменению ее энергетики и минерального состава, неизбежно ведет к изменению абсолютных значений ее потенциала покоя.

Подавляющее большинство замеров потенциала покоя выполнено на гигантских клетках харовых водорослей, клетках корней и корневых волосков, листьев и проводящих тканей. В сравнении с величинами потенциалов покоя клеток животного происхождения обычно не превышающими  $-60$  --  $-90$  мВ, потенциалы покоя растительных клеток в 1,5 - 2 раза выше. Наиболее высокие значения мембранного потенциала - у зеленых клеток, например у эгерии, ряски и элодеи до  $-260$  мВ. Мембранный потенциал клеток корня и стебля меньше -- от  $-100$  до  $-200$  мВ.

Одна из важных функций потенциала покоя заключается в регуляции ионного обмена клеток и тканей со средой. Вероятно поэтому исследователей часто интересует влияние на потенциал покоя основных потенциалобразующих ионов. Предметом изучения является также зависимость изменения мембранного потенциала клеток под действием различных факторов внешней среды, фитогормонов, ингибиторов дыхательного обмена и фотосинтеза.

### 1.Измерение потенциала покоя клетки

При введении микроэлектрода в растительную клетку можно зарегистрировать по крайней мере три скачка потенциала: в клеточной стенке ( $E_{КС}$ ), на плазмалемме ( $E_{ПМ}$ ) и на тонопласте ( $E_T$ ) при попадании электрода в вакуоль. Поэтому потенциал покоя клетки ( $E_{ПП}$  или  $E_{ПМ}$ ) равен:

$$E_{ПП} = E_{КС} + E_{ПМ} + E_T. \quad (17)$$

У большинства растительных клеток потенциал клеточной стенки составляет от  $-20$  до  $-60$  мВ, плазмалеммы -- от  $-90$  до  $-180$  мВ, а тонопласта -- от  $+20$  до  $+50$  мВ, т.е. цитоплазма заряжена отрицательно по отношению к внешней среде, а вакуолярный сок - положительно по отношению к цитоплазме. Положительный потенциал вакуоли по отношению к цитоплазме обеспечивается за счет  $H^+$ -помпы, закачивающей ионы  $H^+$  в вакуоль. Сопротивление плазмалеммы при этом варьирует от 10 до 100  $кОм/см^2$ , а тонопласта - от 0,8 до 16  $кОм/см^2$ . Клеточная стенка, содержащая большое количество

пектинов, придающих ей свойства ионообменника, также может оказывать влияние на измеряемую величину потенциала покоя, однако основной вклад в потенциал покоя клетки все-таки вносит разность электрических потенциалов на плазматической мембране. Это установлено в экспериментах на клетках харовых водорослей и высших растений при измерении разности потенциалов через плазмалемму и тонопласт. Разность электрических потенциалов между цитоплазмой и вакуолью обычно невелика, и поэтому тонопласт не вносит существенного вклада в величину потенциала покоя клетки. Правда у клеток некоторых растений, например у *Valonia*, потенциал вакуоли относительно цитоплазмы составляет +80 мВ. Большой величины разность электрических потенциалов между вакуолью и цитоплазмой достигает также у некоторых морских видов растений, например *Griffithsia monile* и *G.pulvinata*. Сопротивление тонопласта у них на порядок больше, чем плазмалеммы, соответственно 5 и 0,2 кОм/см<sup>2</sup>. У пресноводной же *Nitella translucens* сопротивление тонопласта равно 22 кОм/см<sup>2</sup>, а плазмалеммы -- 113 кОм/см<sup>2</sup>.

Электроды, которые применяются для измерения мембранных потенциалов, представляют собой тонкие стеклянные капилляры с открытым концом, заполненные раствором какого либо электролита и присоединенные через хлорсеребряный или каломельный электрод к одной из клемм милливольтметра с высоким входным сопротивлением. К второй клемме милливольтметра подсоединяется такой же электрод (электрод сравнения), погруженный в наружный раствор (рис.28).

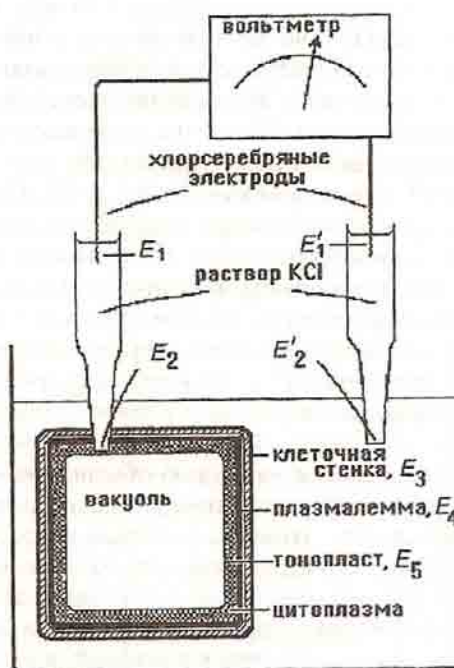


Рис.28. Электрическая схема, применяемая для измерения мембранных потенциалов растительных клеток [Кларксон, 1978].

Величина измеряемого мембранного потенциала ( $E_{изм}$ ) в значительной степени определяется входным сопротивлением усилителя. Она всегда отличается от истинного значения мембранного потенциала ( $E_M$ ) из-за высокого сопротивления клеточных мембран и микроэлектрода:

$$E_{изм} = \frac{R}{R + r} E_M, \quad (18)$$

где R - сопротивление внешней среды и входного каскада усилителя; r - сопротивление клеточных мембран и микроэлектрода ( $r_{ПМ+МЭ}$ ). Как видно из формулы



$E_{\text{изм}} = E_M$ , если  $R/R+r = 1$ . Это возможно при условии, что  $R \gg r$ . На практике это достигается путем усиления изоляции электродов, а также применением усилителей с высоким входным сопротивлением ( $10^{10} - 10^{14}$  Ом). Например, если  $r_{\text{ПМ+МЭ}} = 10^7$  Ом, а сопротивление входного каскада усилителя  $10^{10}$  Ом, то регистрируемая величина мембранного потенциала ( $E_{\text{изм}}$ ), вычисленная по уравнению (18) составит 99,99%  $E_M$ .

Для изготовления микроэлектродов применяют особые тугоплавкие сорта стекол (например, стекло Пирекс). Обычно используют микроэлектроды с кончиком, диаметр которого не превышает 1 мкм. Вводимый в клетку микроэлектрод должен иметь также и соответствующую конусность, чтобы свести к минимуму повреждения исследуемого объекта. Заполняют микроэлектроды 2,5 моль/л раствором KCl или  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , что позволяет уменьшить диффузионный потенциал на кончике электрода, так как ионы  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{Cl}^-$  имеют довольно близкие подвижности. Электроды с диаметром кончика 1 мкм и менее, заполненные 3 моль/л KCl, имеют сопротивление 10-100 мОм. Интенсивность диффузии электролита из кончика таких микроэлектродов составляет  $6 \cdot 10^{-14}$  моль/(л·с). Учитывая довольно высокую концентрацию  $\text{K}^+$  и  $\text{Cl}^-$  (100 ммоль/л) в вакуоли харовых водорослей и их большие размеры, погрешность, вносимая диффузией ионов из кончика микроэлектрода при измерении мембранного потенциала, ничтожно мала.

Микроэлектрод вводят в клетку с помощью микроманипулятора, следя за ним в микроскоп или бинокулярную лупу. Чаще всего микроэлектрод попадает в вакуоль, так как у большинства растительных клеток слой цитоплазмы очень тонок. Наиболее удобный объект для таких исследований - это, конечно, крупные клетки водорослей. Тем не менее микроэлектродная техника в последние годы с успехом используется при измерении мембранных потенциалов корневых волосков, клеток колеоптилей, запасающих тканей и листа. В момент введения микроэлектрода происходит остановка цикла, который возобновляется в нормальных условиях уже через 2-4 мин. Определенную ошибку в измеряемый потенциал покоя может вносить забивание кончика микроэлектрода материалом клеточной стенки, белком или каким-либо другим веществом, обладающим ионообменными свойствами. Поэтому необходимо обязательно проверять микроэлектроды до и после опыта на наличие так называемого кончикового потенциала. Результаты измерений, полученные микроэлектродами, имеющими заметный кончиковый потенциал обычно не учитываются.

После того, как микроэлектрод попадает в клетку, вокруг него через некоторое время начинает образовываться цитоплазматический чехол с более высоким показателем преломления света (поэтому этот процесс легко наблюдать в поле микроскопа). Этот чехол начинает формироваться от места прокола клетки и постепенно охватывает весь микроэлектрод, который он в конце концов и покрывает. Как только формирование чехла заканчивается, разность потенциалов между цитоплазмой и наружным раствором резко снижается (на 30 -- 40 мВ). В некоторых случаях, особенно когда микроэлектрод вводится глубоко в клетку (на 100 мкм), цитоплазматический чехол может и не образовываться в течение нескольких часов.

## 2. Зависимость потенциала покоя от ионной среды и энергетики клетки

Наибольшее влияние на величину потенциала покоя клетки оказывает окружающая ее ионная среда. На рис. 29 показано действие ионов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  на мембранный потенциал клеток междуузлий пресноводной водоросли *Nitella flexilis*. При изменении концентрации ионов  $\text{K}^+$  во внешней среде в 100 раз мембранный потенциал меняется более чем на 100 мВ, т.е. практически может быть описан диффузионным потенциалом Нернста. Зависимость мембранного потенциала от концентрации в среде ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  и тем более  $\text{H}^+$  носит более сложный характер. Нередки случаи, когда

"электрическое" поведение клеток не удается объяснить только калиевым диффузионным потенциалом. У *Chara corallina*, например, замена  $\text{Cl}^-$  на  $\text{HCO}_3^-$  приводит к возрастанию сопротивления клеток и исчезновению влияния на этот параметр ионов калия. Попытки некоторых авторов объяснить эти результаты в рамках теории Гольдмана привели к необходимости поиска дополнительных переносчиков зарядов. Предполагают, что в растительных клетках такими носителями электрических зарядов часто выступают ионы водорода.

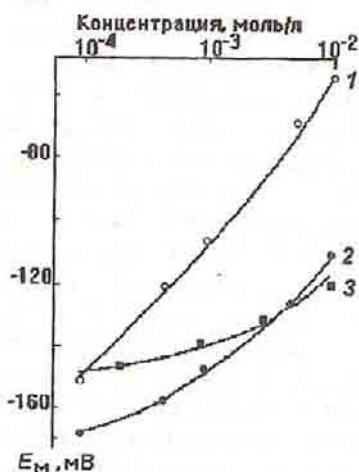


Рис.29. Зависимость потенциала покоя клеток *Nitella flexilis* от концентрации KCl (1), NaCl (2) и CaCl<sub>2</sub> (3) в среде [Юрин и др. 1977].

Таблица 3. Влияние pH среды на мембранный потенциал клеток *Chara australis* [Richards, Норе, 1974; Walker, Smith, 1976]

pH среды	pH цитоплазмы	- E <sub>M</sub> , мВ
4	7,2	-75
5	7,4	-129
6	7,6	-183
7	7,8	-232
8	8,1	-203
9	8,3	-159

У многих харовых водорослей при увеличении pH окружающей среды наблюдается сильная гиперполяризация мембранного потенциала (табл. 3). Мембранный потенциал клеток *Chara australis* при изменении кислотности среды от pH 4 до pH 7 возрастал по абсолютной величине от -75 до -232 мВ; pH цитоплазмы при этом увеличился на 0,6 единицы. Кривая зависимости потенциала покоя клеток харовых водорослей от pH обычно имеет U-образную форму и зависит от концентрации KCl в среде (рис. 30). Таким образом, реальная зависимость потенциала покоя растительных клеток от их ионного окружения оказываются гораздо сложнее, чем предсказываемая уравнением Гольдмана.

Эксперименты по анализу влияния различных факторов среды на электрические и транспортные характеристики клеточных мембран иногда делят на две группы. Первая группа включает опыты без модификации мембраны, а вторая - эксперименты, в которых предполагается такая модификация. В опытах с варьированием в физиологических пределах ионного состава внутренней и наружной среды за счет ионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> модификация мембраны, по-видимому, незначительна; действие же двухвалентных катионов сказывается уже сильнее. Более заметные признаки модификации мембран наблюдаются при действии pH, температуры и различных мембранотропных веществ. В последнем случае получение информации о мембранном ионном транспорте или

электрогенезе только с помощью микроэлектродной техники или изотопов не только недостаточно, но в ряде случаев и невозможно.

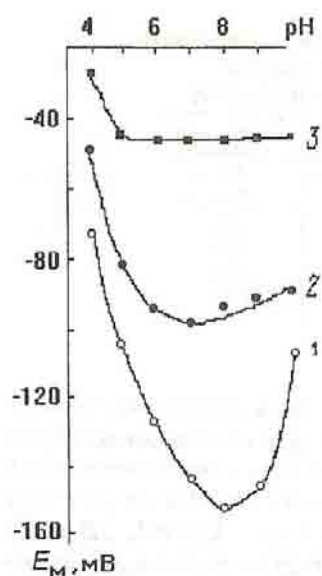


Рис.30. Зависимость потенциала покоя клеток *Nitella flexilis* от pH среды при концентрации KCl в среде  $10^{-4}$  моль/л (1),  $10^{-3}$  моль/л (2) и  $10^{-2}$  моль/л (3) [Волков, Скалинова, 1972].

Мембранный потенциал, вероятно, следует рассматривать как алгебраическую сумму по крайней мере двух составляющих - диффузионного потенциала  $E_D$ , описываемого прежде всего в рамках теории Гольдмана и компоненты  $E_a$ , связанной с функционированием электрогенных и неэлектрогенных ионных насосов. Расчеты показывают, что неодинаковое распределение ионов  $Na^+$ ,  $K^+$  и  $Cl^-$  между клеткой и внешней средой, согласно уравнению Гольдмана, дает в среднем величину от -70 до -90 мВ. Следовательно, остальная часть мембранного потенциала связана с подключением процессов активного транспорта ионов. Основной вклад в создание активной компоненты мембранного потенциала у растительных организмов, по всей вероятности, связан с работой  $H^+$ -АТФазы, активное функционирование которой в плазматической мембране доказано практически для всех типов клеток и видов растений.

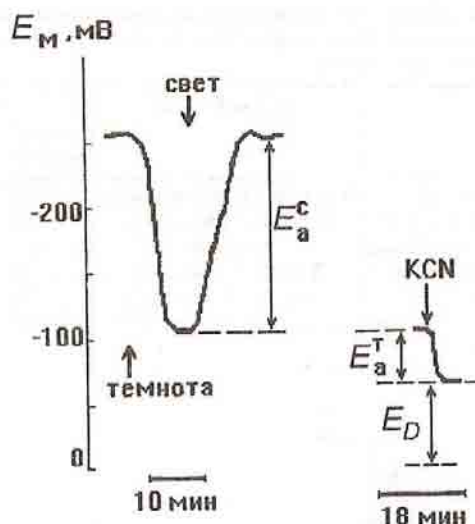


Рис.31. Влияние освещения и обработки KCN (1 ммоль/л) на мембранный потенциал клеток листа эгерии [Petzold e.a., 1985].

Стрелками показаны моменты выключения (↓) и включения (↑) света.

Следует отметить, что в отличие от клеток животных, у растений активная компонента мембранного потенциала обеспечивается за счет не только дыхания, но и фотосинтеза. Рис. 31 наглядно демонстрирует роль фотосинтетического и дыхательного метаболизма в процессе генерации мембранного потенциала у клеток листа эгерии. Как правило, вклад активных процессов в величину мембранного потенциала у клеток растений значительно больший, чем у животных, и составляет свыше 50% (см. рис.4). Поэтому величина мембранного потенциала сильно зависит от энергетики клетки. Наиболее простым способом выяснения роли энергетики в генерации мембранного потенциала является анализ действия на клетку ингибиторов дыхательного и фотосинтетического метаболизма, таких как динитрофенол (ДНФ), азид, цианид, карбоцианидхлорфенилгидразон(КЦХФГ)(табл.4). Помимо ингибиторов и разобщителей окислительного и фотофосфорилирования эффективными средствами оценки вклада активной компоненты в мембранный потенциал у растений являются глубокое охлаждение (до 5-2 °С) и аноксия. Помещение растений в анаэробные условия или в темноту вызывает быстрое снижение мембранного потенциала (рис. 32).

### 3.Трансцеллюлярные градиенты электрических потенциалов

Многие исследователи при изучении электрофизиологических свойств растений обнаруживают апикально-базальную поляризацию клетки и всего симпласта. Гродзинский и Зезина измерили мембранные потенциалы (МП) клеток апикальной меристемы корней проростков кукурузы, находящиеся в состоянии покоя и активной пролиферации. Для покоящихся клеток среднее значение МП составляло -30 мВ, у активно пролиферирующих клеток он был равен -120 мВ. Литвинов и др. одновременно измерили МП и активность ионов  $K^+$  в вакуолях клеток табака: МП молодых и старых клеток составлял, соответственно, -81±3 и -49±3 мВ, вакуолярная активность ионов калия при этом соответственно оказалась равной 71±3 и 49±2 ммоль/л.

Таблица 4. Влияние ингибиторов, аноксии и охлаждения на мембранный потенциал ( $E_M$ ) клеток высших растений [Опритов и др., 1991]

Объект	Воздействие	- $E_M$ , мВ	
		Контроль	Опыт
Корень сои	КЦХФГ, 0,05 ммоль/л	183	87
Колеоптиль овса	Цианид, 1 ммоль/л	119	42
Гипокотиль вигны	Аноксия	111	40
Лист пшеницы	ДНФ, 0,1 ммоль/л	160	75
Лист эгерии	Цианид, 1 ммоль/л	250	70
Пыльцевая трубка энотеры	Охлаждение до 4°С	138	40

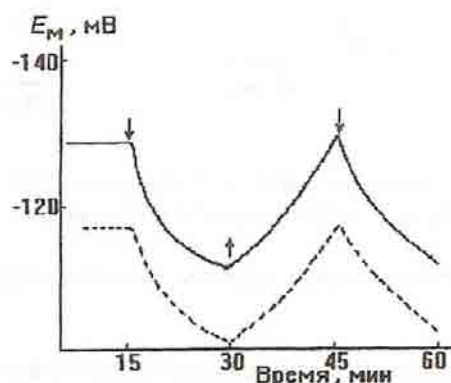


Рис.32. Действие света и гипоксии на мембранный потенциал клеток *Nitellopsis obtusa* [Stolarek, 1977].

Стрелками показаны моменты выключения ( ) и включения ( ) света. Сплошная линия - 21% O<sub>2</sub>, штриховая - 2% O<sub>2</sub>.

Кудасовой изучалась зависимость мембранного потенциала интернодальных клеток нителлы от их возраста, а следовательно, и положения в цепочке. Как следует из табл.5, апикальные, интенсивно растущие клетки имеют большую величину мембранного потенциала по сравнению со зрелыми клетками. Из-за различий в мембранном потенциале вдоль цепочки из пяти клеток *Nitella flexilis* формируется электрический градиент, в среднем равный 30 мВ.

Таблица 5. Мембранные потенциалы клеток *Nitella flexilis* разного возраста [Кудасова, 1973]

Порядок расположения клеток в цепочке	Е <sub>м</sub> , мВ
1 - апикальная	-165+9
2	-156+5
3	-151+5
4	-138+6

Введение двух микроэлектродов одновременно в разные участки клетки нителлы в обычных условиях не позволяет осуществить дифференциальное измерение реальных МП на этих участках, поскольку измеряющие цепи оказываются замкнутыми, во-первых, по микроэлектродам через внутриклеточную среду и, во-вторых, по электродам сравнения через внешнюю среду. Измерить МП двух участков одной клетки нителлы можно при изоляции этих участков (например, ланолином) таким образом, что отсеки с растворами хлорида калия, омывающими апикальный и базальный концы клетки, оказываются электрически изолированными. Этот прием позволил Шевцову зарегистрировать реальные мембранные потенциалы на отдельных участках клетки *Nitella flexilis* (рис. 33). Результаты этих измерений показали, что мембранный потенциал на апикальных участках клеток нителлы на 7,1 + 3,8 мВ выше, чем на базальных, т.е. вдоль интернодальной клетки нителлы существует аксиальный градиент электрических потенциалов.

N клетки	Мембранный потенциал, мВ	
	Апикальная часть	Базальная часть
1	-127	-124
2	-119	-112
3	-168	-166
4	-163	-153
5	-168	-158
6	-160	-150
7	-184	-170
8	-110	-102
9	-108	-110
10	-145	-140
11	-167	-160
12	-136	-133
13	-170	-154

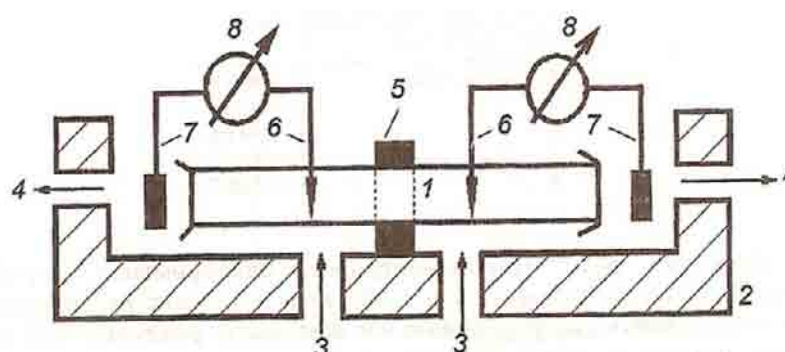


Рис.33. Мембранные потенциалы апикальных и базальных участков клеток нителлы, изолированных ланолином [Шевцов и др., 1989].

1 - клетка, 2 - ячейка из органического стекла, 3 - входные и 4 - выходные отверстия для протока, 5 - ланолиновая перемазка, 6 - микроэлектроды, 7 - электроды сравнения, 8 - регистрирующие устройства.

Хорошим методическим приемом, позволяющим обнаружить в клетках и тканях градиенты электрических потенциалов, является применение катионных и анионных красителей. Демкив и Федык исследовали электрические токи протонемы мха *Funaria hydrometrica* с помощью катионных и анионных красителей. Они обнаружили, что катионные красители (нейтральный красный, акридиновый оранжевый) поглощаются только зонами роста апикальных клеток, а анионные красители (уранин) в большей степени концентрируются в базальных участках апикальной и во всем протопласте интеркалярных клеток протонемы; во всех случаях наибольшая плотность электрического тока соответствует участкам клетки с максимальными скоростями роста. Вахмистров и Злотникова при изучении распределения катионных и анионных красителей в корнях кукурузы, редиса и нарцисса установили, что катионные красители поглощаются кончиком корневых волосков, а анионные - их основанием. Они высказали предположение, что электрическая полярность корневого волоска является результатом поляризации функций транспортных систем клетки.

В последнее время появился ряд публикаций, в которых указывается на существование активных полярных потоков воды в растительных тканях, не связанных непосредственно с транспирацией. Наиболее интересным объектом в этом плане является муконовый гриб *Pilobolus*, известный своей способностью к гуттации. Тело гриба представлено единственной гигантской клеткой, которая своими нижними выростами (гифами) поглощает воду из влажного субстрата и через расположенные в верхней части

стилоспорангиеносцы выделяет ее в виде многочисленных капель. Градиент мембранного потенциала между различными участками клетки в гифах гриба возрастал по абсолютной величине в базальном направлении от -30 до -60 мВ, в стилоспорангиеносцах - от их основания к стилоспорангию от -35 до -120 мВ (рис.34), причем обусловленное гуттацией передвижение воды осуществлялось в направлении возрастания мембранного потенциала. Воздействия, которые приводили к выравниванию электрической полярности клетки (серный эфир, хлороформ), подавляли процесс гуттации. Таким образом, интенсивность полярного потока и процесс секреции воды у мушкетерского гриба *Pilobolus* в первую очередь зависят от электрической поляризации клетки.

#### 4. Суммация электрических свойств клеток в ткани

Электрофизиологические характеристики органов и тканей растений, вероятно, в первую очередь являются отражением электрических свойств клеток, а градиенты БЭП, регистрируемые в растительных тканях, представляют собой результат различий мембранных потенциалов отдельных клеток. Отличительной особенностью растений является симпластная организация клеток, связанных между собой через плазмодесмы.

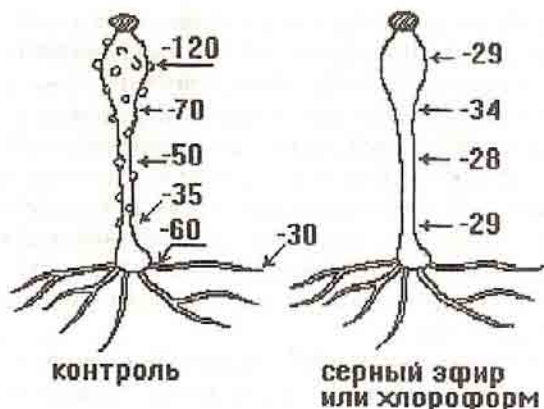


Рис.34. Градиент мембранного потенциала (в мВ) вдоль клетки *Pilobolus umbonatus* Buller [Тараканова и др., 1983].

Симпласт клеток в различных участках корня вероятно обладает эквипотенциальностью, поскольку мембранные потенциалы различных клеток в ткани практически одинаковы. Так, например, Скотт показал, что вакуолярный потенциал клеток в различных зонах корней проростков *Vicia faba* (от меристемы до зрелых клеток) почти не отклоняется от значения -130 мВ. Тщательное измерение вакуолярного потенциала в различных тканях корней *Zea mays*, проведенное Данлопом и Боулингом, свидетельствует об эквипотенциальности клеток корневой системы и в радиальном направлении (рис.35). В опытах Красавиной мембранный потенциал в различных клетках коры корней *Cucurbita pepo* и *Trianea bogotensis* также был одинаковым и составлял в среднем около -150 мВ (рис. 36).

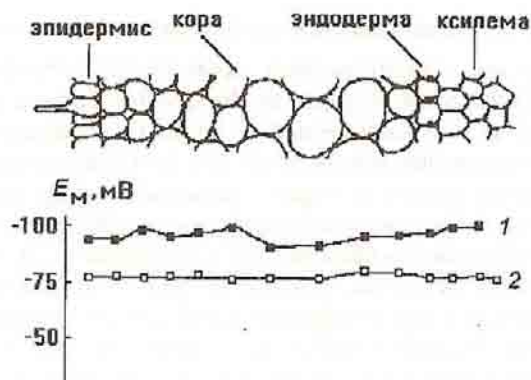


Рис.35. Мембранные потенциалы различных клеток корня кукурузы [Данлоп, Боулинг, 1971].  
1 - питательный раствор, 2 - 1 ммоль/л раствор  $\text{CaCl}_2$

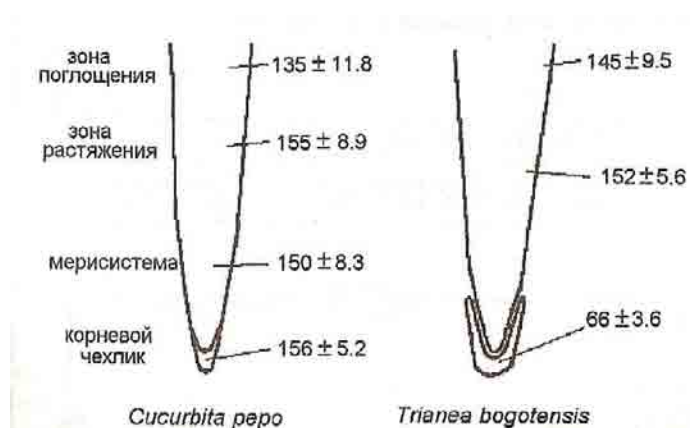


Рис.36. Мембранные потенциалы (в мВ) различных зон корней *Cucurbitapepo* и *Trianea bogotensis* [Красавина, 1974].

Одной из причин эквипотенциальности клеток в ткани может быть наличие между ними электрического контакта через плазмодесмы. Поэтому при введении микроэлектрода в растительную клетку, по-видимому, регистрируется некий средний потенциал, зависящий как от мембранного потенциала отдельной клетки, так и от сопротивления между ней и соседними клетками. В этом случае регистрируемый мембранный потенциал не отражает действительного значения потенциала покоя отдельной клетки, а является интегральным электрофизиологическим показателем ткани в целом. Косвенным подтверждением этому могут быть данные, приведенные на рис. 36. В корне тыквы, у которого в аксиальном направлении имеется симпластическая связь между всеми клетками, мембранные потенциалы клеток корневого чехлика, меристемы и зоны растяжения практически одинаковы. Мембранный потенциал клеток корневого чехлика у *Trianea bogotensis* заметно отличается от потенциалов покоя клеток других зон корня, вероятно, из-за того, что эти зоны не соединены плазмодесмами в единое симпластическое целое.

Шевцовым анализировалась зависимость аксиального градиента БЭП нитчатой водоросли *Nitella flexilis* от количества интернодальных клеток в цепочке. Чтобы исключить шунтирующее действие среды, цепочки клеток на время опыта помещают в вазелиновое масло, которое заливают между ланолиновыми перемазками, нанесенными посередине крайних клеток (рис.37). Внешняя поверхность крайних клеток омывается 0,1 ммоль/л раствором хлорида калия, там же находятся концы электролитических ключей хлорсеребряных электродов. Результаты измерений представлены в таблице, откуда следует, что величина продольной разности потенциалов веточки нителлы тем выше, чем больше клеток в цепочке. Аксиальный градиент электрических потенциалов, регистрируемый в цепочке клеток *Nitella flexilis*, вероятно, объясняется различиями их



мембранных потенциалов (см.табл.5) и трансцеллюлярной поляризации отдельных клеток-междоузлий (рис.33).

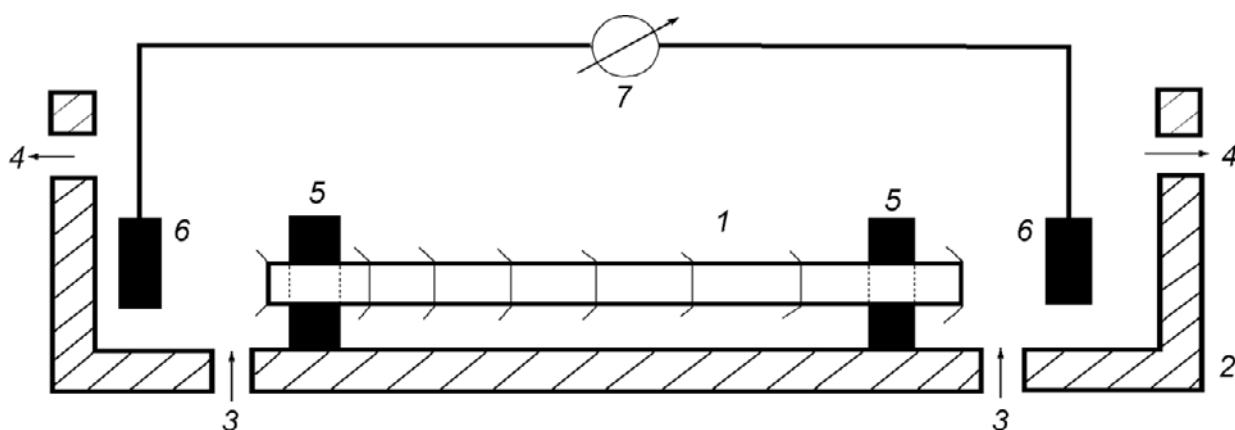


Рис.37. Зависимость градиента БЭП нителлы от количества клеток-междоузлий [Шевцов и др., 1989].

1 - цепочка клеток, 2 - ячейка из органического стекла, 3 - входные и 4 - выходные отверстия для протока, 5 - ланолиновые перемазки, 6 - электроды, 7 - регистрирующее устройство.

## 5. Градиенты электрических потенциалов органов и тканей растений

Сравнительно простое и единообразное по сравнению с животными организмами распределение процессов роста и обмена веществ по их интенсивности между основными органами и тканями растений обуславливает существование четко выраженных метаболических градиентов, которые в свою очередь являются причиной возникновения градиентов биоэлектрических потенциалов. Градиенты биоэлектрических потенциалов метаболического происхождения регистрируются вдоль корня, листа, побега и всего растительного организма. На рис.38 приведен профиль электрического поля вдоль корня кукурузы. Можно видеть, что максимум электроотрицательности приурочен к наиболее интенсивно растущей зоне растяжения. При изучении распределения биоэлектрического потенциала в целых проростках кукурузы оказалось, что несмотря на то, что абсолютные значения градиентов БЭП между кончиком корня, листом и мезокотилем у отдельных растений могут значительно варьировать, общая картина электрических градиентов вдоль осевой линии у всех анализируемых растений одинакова: растущие части - кончик корня и апикальная часть листа, как правило, заряжены отрицательно по отношению к основанию корня и мезокотилу. Потенциал надземной части более отрицателен, чем потенциал поглощающей зоны корня.

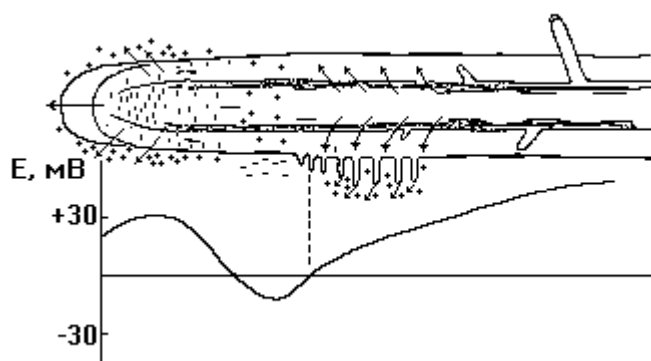


Рис.38. Распределение БЭП вдоль корня проростка кукурузы [Fensom, 1959].

Градиенты БЭП являются следствием различий в интенсивности процессов роста, фотосинтеза, дыхательного обмена, ионного транспорта и некоторых других процессов и отражают различия между потенциалами покоя клеток. Еще в 1901 г. Вяземский показал, что между различными участками листа венериной мухоловки регистрируются электрические градиенты в 16-75 мВ, в то время как листья мухоловки, обработанные кипящей водой, такими градиентами не обладали. Во многих работах отмечается, что апикальные части органов, а также ткани с максимальной физиологической активностью (камбий, зона растяжения корня), как правило, электроотрицательны.

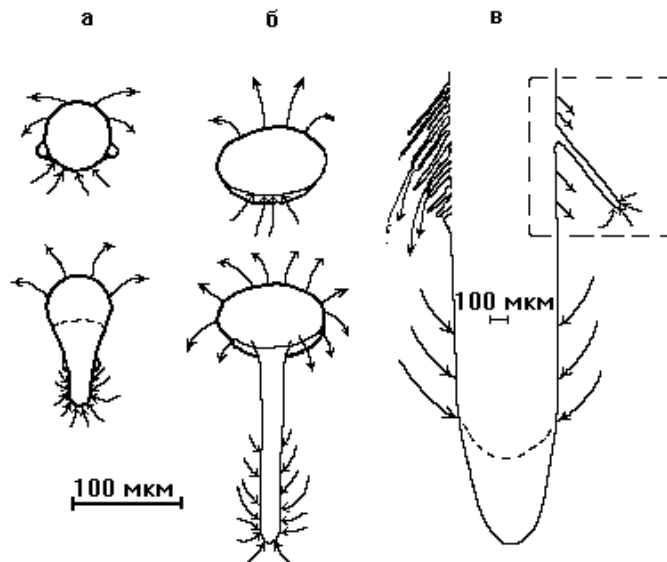


Рис.39. Рисунок силовых линий электрического тока [Bentrup, 1984]. а - прорастающая зигота фукуса, б - прорастающая пыльца лилии, в - корень и корневой волосок.

У вертикально ориентированных корней, например, был зарегистрирован электрический ток ( $1-2 \text{ мкА/см}^2$ ), выходящий из зоны корневых волосков и входящий в зону растяжения (рис.39, в), т.е. как раз в наиболее интенсивно растущую часть корневой системы, которая заряжена отрицательно. Изучение БЭП клеток некоторых органов у хвойных растений также показало, что наибольший БЭП клеток характерен для тканей с более интенсивным обменом. Искусственное электрическое изолирование зон, между которыми регистрируются электрические токи, вызывает значительное снижение скорости ростовых процессов. При поранении тканей растений, например корней гороха, в первую очередь (как и в зонах интенсивного роста) регистрируется появление электрического тока (до  $10 \text{ мкА/см}^2$ ), входящего в место ранения.

Конечно же реальный механизм взаимодействия отдельных клеток при формировании аксиальных градиентов БЭП ткани, органа и тем более целого растения не является результатом простого суммирования электрофизиологических характеристик отдельных клеток. Весьма интересными в этом плане представляются измерения разности БЭП между отдельными участками стебля и корнем у традесканции, выполненные Безматерных с коллегами. Градиент БЭП между точками, расположенными на междоузлиях, и корнем составил около 18 мВ (рис 40), разность БЭП между узлом и корнем варьировала от -10 до +5 мВ. Градиент потенциалов между междоузлием и корнем был больше, чем средняя разность БЭП между узлом и корнем. Авторы делают вывод, что постоянное электрическое поле традесканции представляет собой квазипериодическое поле, формируемое различными структурами - узлами и междоузлиями.

В опытах японского исследователя Токо для измерения биопотенциалов использовалась установка (состоящая из 60 электродов с диаметром кончика 100 мкм),

позволяющая регистрировать электрические токи на расстоянии 0,5-1,0 мм от поверхности корня бобов. Оказалось, что помимо электрических токов, входящих в кончик корня, регистрируемых в большинстве экспериментов, обнаруживаются локальные петли электрического тока нескольких порядков (рис. 41).

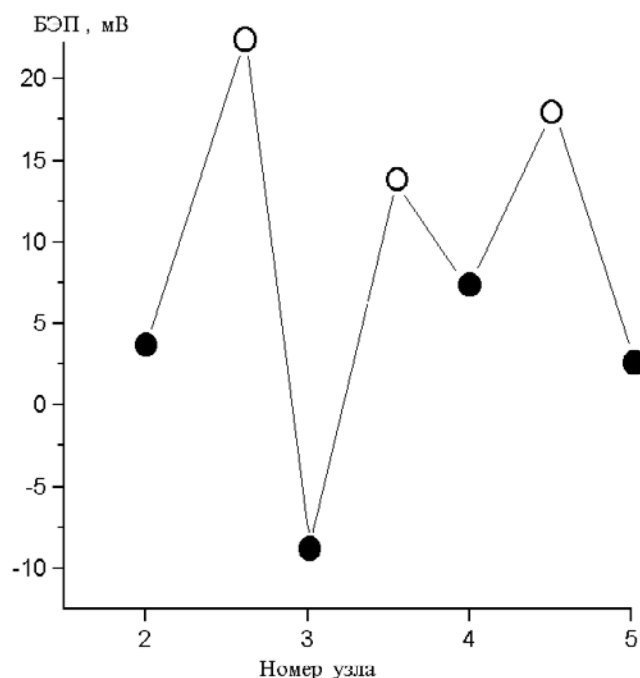


Рис.40. Биоэлектрические потенциалы узлов (o) и междоузлий (o) традесканции [Безматерных и др., 1972].  
Электрод сравнения у корня.

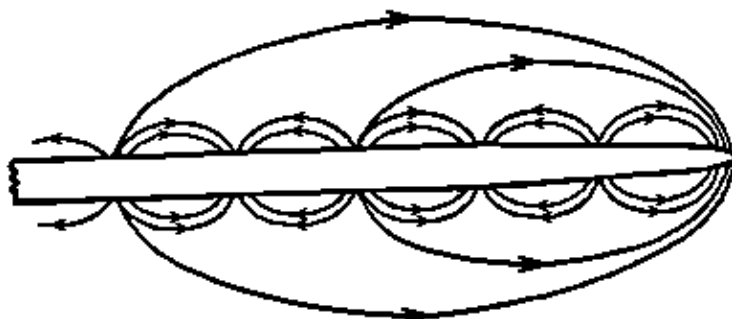


Рис.41. Рисунок силовых линий электрического тока вдоль корня бобов на расстоянии 10 см от кончика [Токо е.а., 1987].

Воздействия, которые приводят к снижению градиентов биоэлектрических потенциалов, например клиностамирование или гипогравитация в условиях орбитальной космической станции, вызывают снижение темпов роста и развития растений. Если же попытаться восстановить исходную электрическую полярность путем пропускания слабого электрического тока в продольном направлении (рис. 42, табл.), то различия в ростовых процессах между контрольным и опытным вариантами нивелируются.

Условия	Без воздействия	Электростимуляция
	Высота растений, мм	
Контроль	139	141
Невесомость	90	117
Клиностамирование	123	164

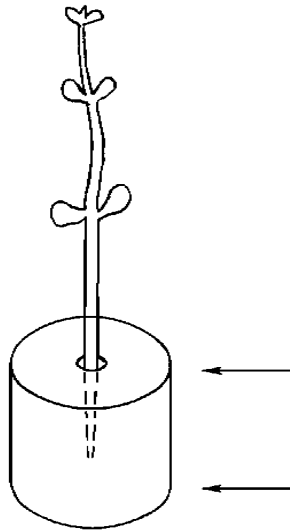


Рис.42. Развитие растений гороха (25 сут) в условиях гипогравитации и клиностаტიрования [Гордеев и др., 1988].

Каменская с коллегами регистрировали аксиальный градиент биоэлектрических потенциалов в некоторых других стрессовых ситуациях - при засухе, пониженной температуре, облучении. Они показали, что под действием этих неблагоприятных факторов происходит нивелирование продольной электрической полярности растений. Восстановление нативных электрических градиентов за счет пропускания слабого электрического тока в аксиальном направлении улучшало их жизнедеятельность.

## 6. Электрокинетический потенциал течения

На границе раздела между твердой дисперсной фазой и жидкой дисперсионной средой, как уже отмечалось, существует двойной электрический слой. Для растительных тканей роль дисперсной фазы выполняют целлюлозные оболочки клеток (сосудов), на которых сорбируются преимущественно анионы. Катионы же, как правило, остаются в дисперсионной (жидкой) среде. В результате между двумя фазами (твердой и жидкой) за счет асимметричного распределения ионов возникает электрокинетический, или  $\zeta$  (дзета)-потенциал.

Представим себе, что через сосуд растения, в котором существует разность потенциалов между его твердой и жидкой фазами, проходит ток жидкости (транспирационный, например), а вместе ним - вынос ионов (катионов) по направлению потока. Поэтому знак потенциала в направлении потока будет положительным. Это явление впервые в 1859 г. описал Квинке. Он обнаружил, что при протекании воды через пористое тело на его концах возникает разность потенциалов, названная им потенциалом течения.

При движении жидкости по сосудам растения образовавшаяся разность потенциалов стремится как бы скомпенсировать образовавшееся неравномерное распределение ионов, т.е. при постоянных скорости течения и концентрации ионов потенциал течения стабилен. Его можно рассчитать по формуле Гельмгольца-Смолуховского:

$$E_{пт} = P\varepsilon\zeta/4\pi\nu\eta, \quad (19)$$

где  $P$  - перепад гидростатического давления,  $\epsilon$  - диэлектрическая постоянная среды,  $n$  - электропроводность и  $h$  коэффициент вязкости раствора. Из формулы видно, что если нет перепада давления, потенциал течения равен нулю.

Наибольшие значения потенциал течения имеет для древесных растений. У большинства из них апикальные зоны надземных органов чаще всего приобретают положительный электрический потенциал. Целлюлозные клеточные оболочки проводящей системы имеют избыточный отрицательный заряд, поэтому в жидкой дисперсионной среде должно быть больше катионов, чем анионов (поскольку проводящая система в целом электронейтральна). В процессе транспирации постоянно происходит вынос катионов в акропетальном направлении с ксилемным током, что и приводит к появлению положительного заряда в направлении потока. Разность потенциалов между вершиной и корневой шейкой древесных растений даже у подростка может составлять от +100 до +150 мВ.

Потенциал течения пропорционален перепаду гидростатического давления между апикальной и базальной частями растения, зависит от концентрации электролитов и длины сосудов. Однако верхушка подростка высотой до 0,5 м на открытом месте и до 1,0 м под пологом леса может иногда приобретать отрицательный потенциал по отношению к основанию растения. Причина этого - преобладание (у небольших растений) разности потенциалов метаболического происхождения над потенциалом течения. В том случае, когда прирост верхушечного побега меньше прироста боковых, максимальное значение потенциала течения смещается к середине кроны. При хорошо развитой кроне наблюдается почти прямая зависимость между потенциалом течения и высотой подростка и взрослых деревьев.

Характер распределения потенциала течения является отражением напряженности водно-ионного тока и в первую очередь интенсивности транспирации древесного растения. Поэтому интенсивность транспирации и транспирационного расхода можно оценивать по величине потенциала течения, так как между ними получены высокие коэффициенты корреляции: для сосны - 0,91, для березы - 0,93, для кедра - 0,98. Если регистрировать суточную динамику потенциала течения, то окажется, что она почти синхронно изменяется с дневным ходом изменения влажности воздуха, температуры и освещенности. По потенциалу течения часто определяют пораженность растений фитоболезнями: измеренный между корневой шейкой и вершиной у сосен, зараженных опенком, потенциал почти в три раза меньше, чем у здоровых, хотя по внешним морфологическим признакам не всегда удается отличить больные растения от здоровых. Аналогичные результаты были получены для сосен, зараженных корневой губкой.

## МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ ИОННЫХ ТОКОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

### 1. Проводимость и электрическое сопротивление клетки

Характер зависимости потенциала покоя от концентрации отдельных ионов не может дать информацию о величине проницаемости мембраны к этим ионам. Такую информацию дает только измерение проводимости или электрического сопротивления мембраны.

Проводимость - это величина обратная сопротивлению. Проводимость плазматической мембраны можно оценить по величине ионных потоков, проходящих через плазмалемму, при известном значении движущей силы. Если предположить, что при определенных условиях большая часть пассивного ионного потока через плазмалемму представляет собой поток ионов  $K^+$  и  $Na^+$ , то проводимость плазмалеммы для катионов ( $G_{\text{пм}}^+$ ), измеряемую в  $1/\text{Ом}\cdot\text{см}^2$  можно представить в виде следующего выражения:

$$G_{\text{пм}}^+ = \frac{F^2}{RT} (I_{\text{Na}}^{\text{in}} + I_{\text{K}}^{\text{in}}), \quad (20)$$

где  $I_{\text{Na}}^{\text{in}}$  и  $I_{\text{K}}^{\text{in}}$  - полученные в эксперименте значения потоков (в нмоль/см) ионов  $K^+$  и  $Na^+$ , направленных внутрь клетки.

Сопротивление плазмалеммы ( $R_{\text{пм}}$ ) клеток харовых водорослей, рассчитанное на основе уравнения 20, в среднем было равно 150-300  $\text{кОм}/\text{см}^2$ . Эти значения сопротивления мембраны были сравнимы с результатами прямых измерений, при которых через плазмалемму пропускают ток известной величины и одновременно регистрируют изменение мембранного потенциала.

Для измерения электрического сопротивления клеточной мембраны может быть использована микроэлектродная техника. При этом в вакуоль клетки вводят два микроэлектрода (рис. 43): один из них используют для измерения разности потенциалов между вакуолью и наружным раствором (как при обычном измерении мембранного потенциала), второй соединен с генератором электрических импульсов, от которого импульсы тока идут через клетку к серебряной проволоке, помещенной в наружном растворе параллельно клетке. Плазмалемму и тонопласт можно рассматривать как два последовательно включенных сопротивления.

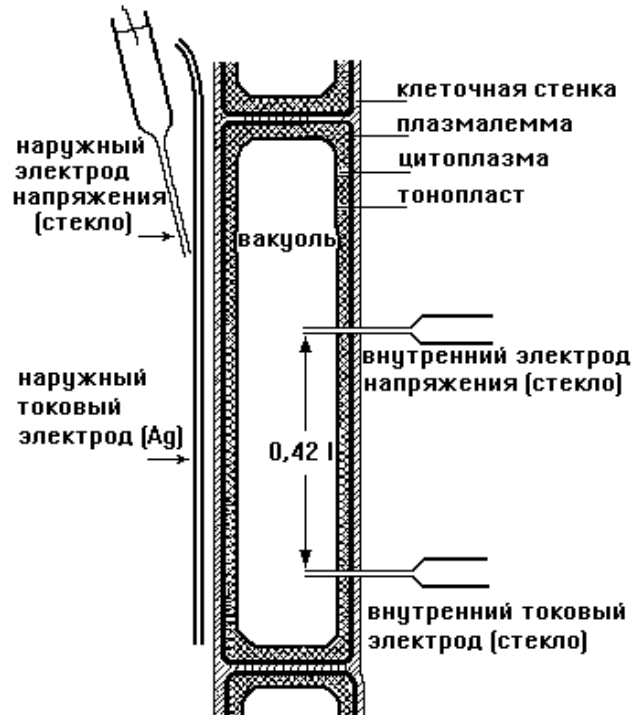


Рис.43. Установка для измерения электрического сопротивления клеточных мембран. Внутренние электроды устанавливаются на расстоянии 0.42 длины (l) клетки.

Если сопротивления плазмалеммы и тонопласта остаются постоянными при пропускании через них электрического тока, то зная силу тока и измеряя мембранный потенциал, можно, используя закон Ома, рассчитать суммарное сопротивление плазматической и вакуолярной мембран. Введя в клетку третий электрод таким образом, чтобы его кончик оказался в цитоплазме, можно одновременно регистрировать сопротивление и плазмалеммы, и тонопласта. Известному американскому электрофизиологу Спэнсвику именно таким путем удалось измерить и рассчитать удельное сопротивление клеток водного растения элодеи. Оказалось, что сопротивление плазмалеммы гораздо выше, чем тонопласта, (соответственно, 0,31 и 0,1 Ом/м<sup>2</sup>), при этом было также рассчитано сопротивление плазмодесм между клетками элодеи, оно составляло в среднем 0,0051 Ом/м<sup>2</sup>.

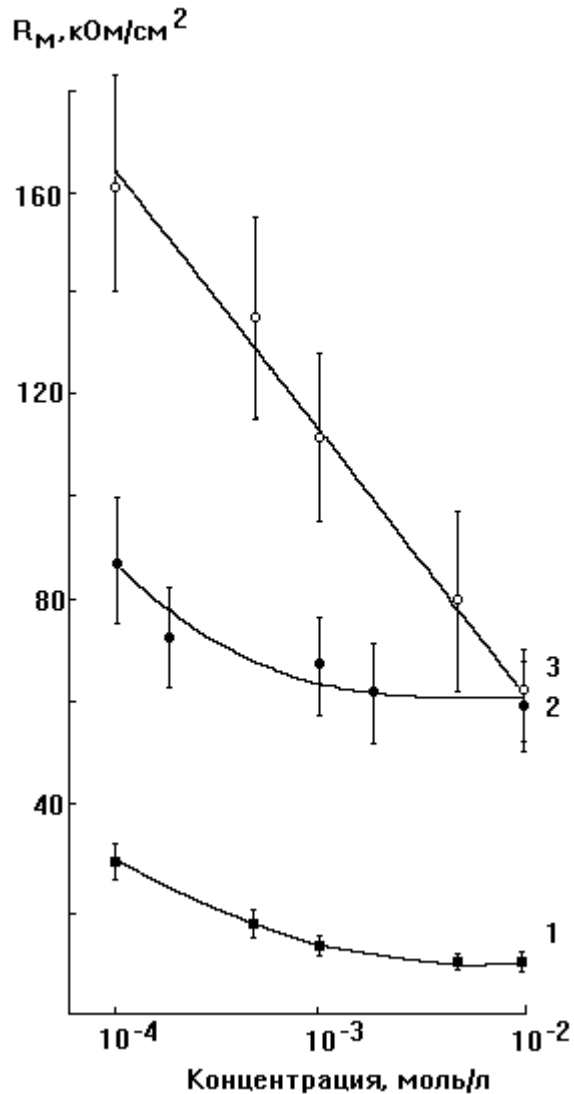


Рис.44. Зависимость электрического сопротивления мембраны клеток *Nitella flexilis* от ионного состава среды [Юрин и др., 1977].  
1 - KCl, 2 - CaCl<sub>2</sub>, 3- NaCl.

Однако измерение сопротивления клеточных мембран методом петч-кламп (patch-clamp) показало, что классическая микроэлектродная регистрация может давать заниженные результаты. Например, типичные растительные и животные клетки при whole-cell измерении методом петч-кламп имеют мембранное сопротивление, большее или равное 20 Ом/м<sup>2</sup>.

В зависимости от условий среды сопротивление клеточных мембран может варьировать в широких пределах даже у одного и того же вида растений. Например, если сопротивление плазмалеммы у клеток *Nitella translucens* на 1 ммоль/л растворе CaCl<sub>2</sub> составляет 120 кОм/см<sup>2</sup>, то в безкальциевой среде оно снижается до 15 кОм/см<sup>2</sup>. Ионное окружение клетки оказывает особенно сильное влияние на электрическое сопротивление мембраны. Так, в растворе NaCl сопротивление плазмалеммы нителлы гораздо выше, чем в растворе KCl (рис. 44). Возрастание концентрации электролитов в наружном растворе приводит к снижению электрического сопротивления мембраны. При увеличении содержания NaCl от 0,1 до 10 ммоль/л М сопротивление мембраны клеток нителлы уменьшается почти в два раза. Особенно сильное воздействие на электрические характеристики мембраны оказывает добавление ионов Ca<sup>2+</sup>, которое резко видоизменяет характер воздействия на сопротивление мембраны растворов однокомпонентных солей.



Измеренное электрическое сопротивление чаще всего оказывается ниже, чем вычисленное по формуле (20), поскольку полный ток через плазматическую мембрану определяется не только потоками натрия, калия и хлора. В настоящее время существуют факты, указывающие на то, что функции основных носителей зарядов мембранного тока могут выполнять и ионы водорода. Впервые доказательства этого были получены японским исследователем Китосато в 1968 г., который для измерения ионных токов использовал метод фиксации напряжения, или кламп-метод.

## 2.Метод фиксации потенциала

В методе фиксации потенциала (voltage-clamp) используют электронную управляющую систему с обратной связью, которая обеспечивает автоматическое поддержание мембранного потенциала на заданном уровне и позволяет в этих условиях регистрировать ионный ток, протекающий через мембрану. Метод фиксации потенциала служит наиболее адекватным приемом для анализа функционирования ионных каналов.

Для стабилизации (фиксации) потенциала можно использовать систему, которая применяется для измерения сопротивления плазматической мембраны (см. рис.43). Суть метода сводится к тому, что разность потенциалов плазмалеммы фиксируется на заданном уровне, в то время как меняются концентрация и вид иона, оказывающего влияние на величину мембранного потенциала. Электронная схема, применяемая для стабилизации потенциала, по принципу обратной связи препятствует установлению нового состояния равновесия при изменении концентрации или вида иона в наружной среде.

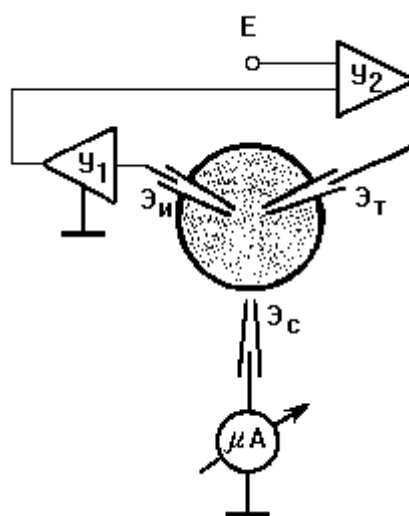


Рис.45. Принципиальная схема установки для измерения ионных токов методом фиксации мембранного потенциала [Рубин, 1989].

Основной частью установки (рис.45) является дифференциальный усилитель  $U_2$  с высоким коэффициентом усиления. На один вход усилителя подается разность потенциалов между измерительным микроэлектродом  $\mathcal{E}_и$  и наружным электродом сравнения  $\mathcal{E}_с$ , т.е. мембранный потенциал клетки, который измеряется усилителем  $U_1$ . На второй вход усилителя  $U_2$  поступает командный потенциал  $E$ . Если командный потенциал  $E$  равен потенциалу покоя мембраны  $E_M$ , напряжение на выходе дифференциального усилителя равно нулю, при этом в цепи, включающей токовый микроэлектрод  $\mathcal{E}_т$ , клеточную мембрану и электрод сравнения, тока нет. Если командный потенциал отличается от потенциала покоя, на выходе дифференциального усилителя возникает напряжение пропорциональное разности потенциалов  $(E - E_M)$ . В этом случае по

цепи обратной связи через токовый микроэлектрод  $\mathcal{E}_T$ , клеточную мембрану и электрод сравнения  $\mathcal{E}_c$  потечет электрический ток, который сместит потенциал на мембране, приближая его к заданному значению потенциала  $E$ .

Этот метод позволяет измерять ионный поток при перемещении иона по контролируемому градиенту электрохимического потенциала и получать информацию об электрической проводимости мембраны и ее пассивной проницаемости в отношении интересующего нас иона.

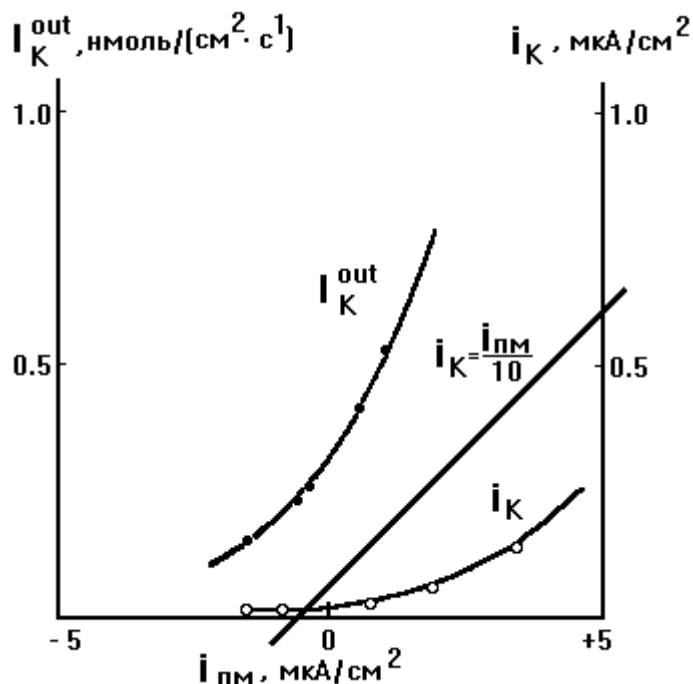


Рис.46. Зависимость между потоком ионов  $K^+$  из клетки ( $I_K^{out}$ ), электрическим током ( $i_K$ ), обусловленным ионами  $K^+$  и общим электрическим током ( $i_{PM}$ ), проходящим через плазмалемму клеток *Nitella clavata* [Kitosato, 1968].

Прямая на графике отражает теоретическую зависимость, когда ток ионов  $K^+$  составляет 1/10 от общего мембранного тока.

На рис. 46 приведены результаты опытов Китосато, который методом фиксации потенциала анализировал ионную проницаемость у клеток *Nitella clavata*. Он вводил в клетку микроэлектроды и пропускал электрический ток через плазмалемму. Полный ток представляет сумму всех проходящих через мембрану ионных токов, а отношение вкладов различных ионов в полный ток должно быть пропорционально их коэффициентам проницаемости. Из полученных результатов видно, что ток ионов  $K^+$  составляет лишь небольшую часть от всего тока, проходящего через мембрану. Прямая на графике описывает ситуацию, которая имела бы место, если бы ток ионов  $K^+$  составлял 1/10 от всего мембранного тока  $I_{PM}$ . В действительности же  $I_{PM}$  гораздо больше  $I_K$ . Однако, если ионы калия не является носителем зарядов, то эти функции должен выполнять другой ион. Китосато удалось показать, что этим ионом (носителем зарядов) в данной ситуации являются ионы водорода.

Метод фиксации напряжения, или кламп-метод, используется для получения вольтамперных характеристик растительных клеток, что позволяет получить информацию о тонких механизмах функционирования различных систем мембранного ионного транспорта.

### 3.Метод внутриклеточной перфузии

При изучении электрических характеристик плазматических мембран растительных клеток часто возникает необходимость во введении в клетку различных веществ (например, модификаторов транспортных систем) или в изменении ионного состава внутренней среды. Для этих целей может быть использован метод внутриклеточной перфузии, т.е. замещение цитоплазмы раствором заданного состава. Опыты на перфузированных клетках значительно расширяют возможности экспериментатора, поскольку позволяют анализировать электрические процессы при варьировании среды с обеих сторон мембраны. При введении в клетку двух микроэлектродов, с помощью одного из них можно измерять мембранный потенциал, а по другому пропускать электрический ток. Однако при этом необходимо учитывать искажения, которые могут вноситься при микрохирургических операциях. В самых первых опытах по перфузии отрезали концы клетки харовой водоросли, в отверстия вводили микропипетки, и через вакуоль прокачивался анализируемый раствор. Однако в таком состоянии клетки сохраняли жизнеспособность очень недолго.

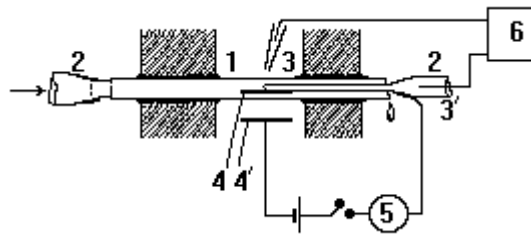


Рис.47. Схема перфузии клетки харовой водоросли [Плакс, Юрин, 1975].

1 - клетка; 2 - микропипетки для прокачивания клеточного сока заданного состава; 3,3'- электроды для измерения мембранного потенциала; 4,4'- электроды для пропускания электрического тока; 5 - гальванометр; 6 - электрометр. .

Наиболее стабильных результатов по перфузии клеток растений удалось добиться группе минских электрофизиологов во главе с Юриным. На рис 47 приведена схема разработанного ими метода перфузии клеток нителлы. В клетку с двух торцов вводили две стеклянные микропипетки толщиной 30 мкм, напоминающие по форме микроэлектроды. Для того чтобы конец микропипетки не забивался материалом клеточной стенки, внутрь пипетки вставляли специальный конус, который в момент прокалывания закрывал отверстие. После прокалывания клеточной мембраны конус оттягивался, открывая путь перфузату. В микропипетке поддерживалось давление, равное клеточному. Перфузат с помощью второй такой же микропипетки постепенно прокачивался через клетку таким образом, чтобы его приток был равен оттоку. Перфузированная таким образом клетка сутками сохраняла жизнеспособность, имела постоянный потенциал покоя и стабильное движение цитоплазмы. Внутри клетки закачивались растворы различного состава и приборы регистрировали изменение ее электрофизиологических характеристик. При введении микроэлектрода в ходе перфузирования появлялся потенциал действия, и движение цитоплазмы прекращалось. Через 5-10 мин скорость движения цитоплазмы восстанавливалась до исходных значений (50-60 мкм/ч) и в течение всего эксперимента практически не изменялась. Для полной смены внутриклеточного содержимого необходимо около 20-30 мин. Кривая зависимости мембранного потенциала покоя перфузируемых клеток *Nitella flexilis* от концентрации в наружном растворе одно- и двухвалентных ионов (рис. 48) совпадает с кривой, получаемой на интактных клетках. Эта зависимость хорошо описывается уравнением Гольдмана. Однако в последнее время все более эффективным способом анализа систем мембранного ионного транспорта и механизмов электрогенеза становится метод петч-кламп.

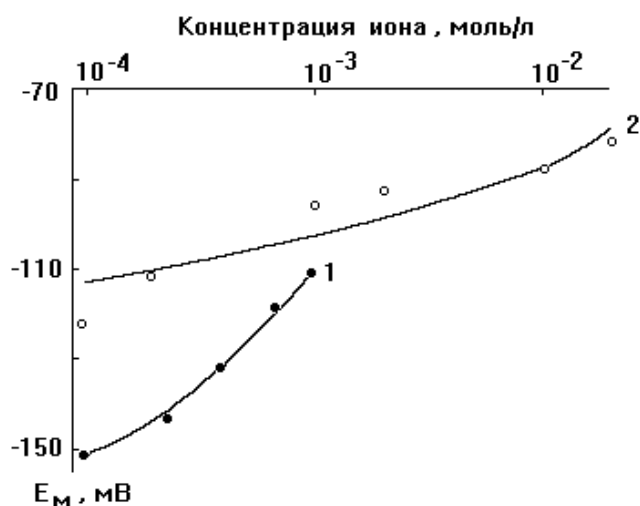


Рис.48. Зависимость потенциала покоя клеток *Nitella flexilis* от концентрации ионов К (1) и Са (2) в окружающей среде [Юрин и др., 1977].

Состав перфузата: KCl - 0,1 моль/л, NaCl - 0,03 моль/л, CaCl<sub>2</sub> - 0,02 моль/л.

#### 4.Метод петч-кламп

Метод петч-кламп (patch-clamp), который позволяет осуществлять локальную (точечную) фиксацию мембранного потенциала и измерять токи через одиночные ионные каналы, в корне изменил методологию научных исследований электрических процессов и мембранного транспорта. Появилась реальная возможность измерять токи и потенциалы в очень небольших клетках (3-10 мкм), регистрировать токи через одиночные ионные каналы величиной в несколько пикоампер, проводить всевозможные исследования в рамках традиционных электрофизиологических подходов.

Впервые метод петч-кламп был введен в исследовательскую практику в 1976 г., когда в журнале Nature появилась работа Неера и Сакмана "Токи через одиночные каналы в мембране волокна денервированной мышцы лягушки". Общедоступным же этот метод стал только после выхода в 1981 г. классической работы Хэмилла с соавт. "Усовершенствованный метод петч-кламп регистрации с высоким разрешением от клеток и фрагментов клеточных мембран.

Основой для создания метода в его современном виде послужило обнаружение того факта, что при определенных условиях клеточная мембрана формирует необычайно плотный контакт с поверхностью кончика стеклянного микроэлектрода. При небольшом разрежении, создаваемом внутри пипетки, между стеклом и мембранным фрагментом возникает контакт, имеющий гигаомное сопротивление. В результате образуется электрически изолированный участок мембраны, и шум регистрируемого сигнала уменьшается на несколько порядков. Контакт мембраны со стеклом механически очень прочен, поэтому находящийся под кончиком электрода фрагмент надо либо изолировать от клетки, либо разрушить и таким образом проникнуть внутрь клетки.

Существует несколько вариантов метода петч-кламп (рис.49). Наиболее близким к естественным условиям является вариант измерения ионных токов на прикрепленной, но неповрежденной клетке (on-cell), поскольку исследуемый участок мембраны не отделяется от клетки и не нарушается его связь с цитоплазмой. Измерение на целой клетке при разрушении мембраны в кончике микропипетки (whole-cell) позволяет заменять ионный состав цитоплазмы и анализировать на диализированных таким образом клетках ионные токи в режиме фиксации напряжения.

Ионные токи через небольшие мембранные фрагменты измеряют с помощью стеклянных пипеток, у которых диаметр кончика сравним с размерами фрагментов.

Сопротивление пипеток, заполненных раствором 150 ммоль/л KCl и погруженных в раствор такой же концентрации KCl, лежит в пределах от 1 до 10 МОм. Средняя площадь отверстия кончика пипетки варьирует от 1 до 8 мкм<sup>2</sup>. Эти размеры находятся на грани разрешения светового микроскопа. Наружную поверхность кончиков электродов (для уменьшения их емкости) покрывают хорошо прилипающим к стеклу гидрофобным материалом - силгардовой резиной. Особенностью незастывшего силгарда является его способность растекаться тонкой пленкой по поверхности стекла на несколько миллиметров, покрывая при этом и кончик микроэлектрода. Так как высокоомные контакты образуются только с чистым стеклом, эту пленку необходимо удалять оплавлением электродов.

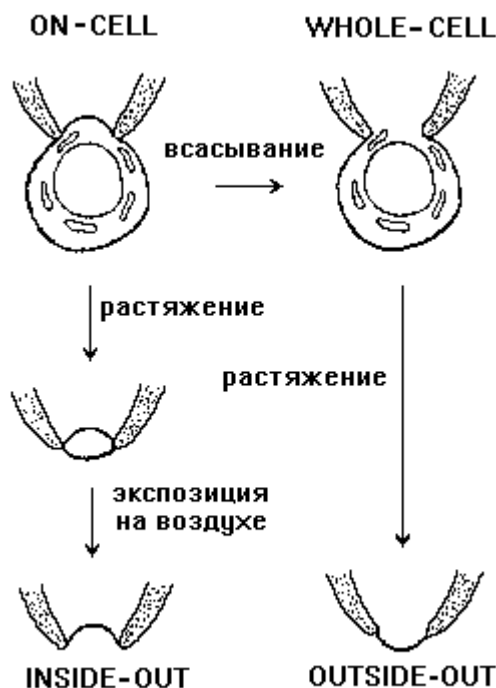


Рис.49. Различные способы измерения ионных токов методом петч-кламп. on-cell - на микроучастке (ограниченном кончиком микропипетки) с прикрепленной клеткой (cell-attached); whole-cell - от целой клетки в условиях плотного контакта; inside - out - на изолированном участке мембраны, внешняя поверхность которого обращена внутрь пипетки; outside -out - на изолированном участке мембраны с внешней поверхностью, обращенной наружу.

Электронная схема для петч-кламп регистрации должна иметь такие параметры, чтобы было возможным зарегистрировать передвижение всего лишь нескольких сотен элементарных электрических зарядов через малый участок клеточной мембраны. Помимо максимально сниженных собственных шумов измерительной аппаратуры, не превышающих естественных, токи через одиночные электровозбудимые Ca-каналы, например, можно зарегистрировать только в нефизиологических условиях - при использовании растворов, содержащих Ba<sup>2+</sup> вместо Ca<sup>2+</sup>.

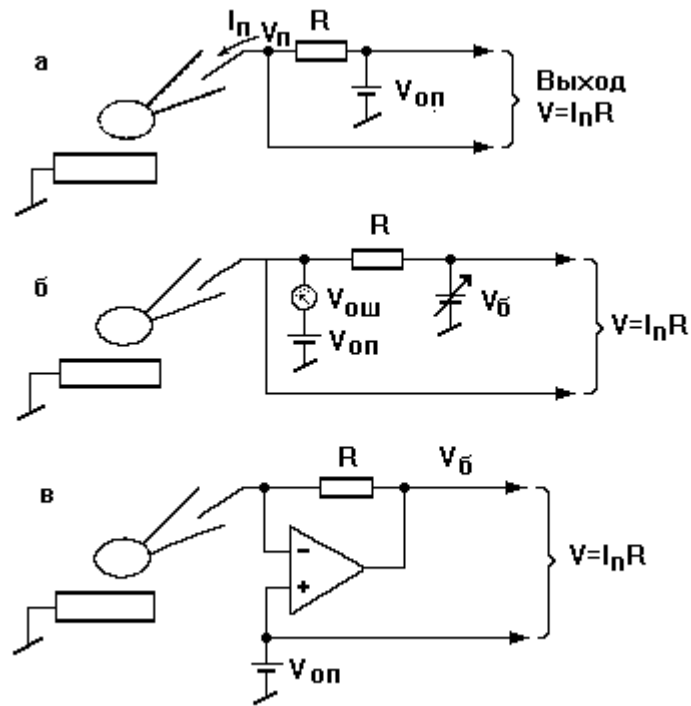


Рис.50. Схемы измерения малых токов при петч-кламп регистрации [Сигворс, 1987].

а - простая цепь, в которой потенциал на пипетке ( $V_n$ ) определяется приблизительно величиной  $V_{оп}$ ; б - в этой схеме регистрируется ошибка  $V_{ош}$  в величине  $V_n$  по отношению к  $V_{оп}$  и устанавливается такое значение  $V_б$ , которое сводит погрешность к нулю; в - ошибку автоматически устраняет операционный усилитель.

Стандартным методом измерения малых токов является регистрация создаваемого ими падения напряжения на высокоомном сопротивлении. На рис. 50 представлены три электрические цепи, с помощью которых осуществляются подобные измерения. Наиболее удобно, конечно, автоматическое поддержание требуемого значения  $V_б$  с помощью операционного усилителя (рис.50, в), который представляет собой управляемый потенциалом источник напряжения.

Несмотря на то, что метод петч-кламп исходно был разработан для регистрации токов через одиночные каналы, он может быть с успехом использован для измерения токов от целой клетки, особенно, когда ее размеры невелики. После образования гигаомного контакта мембранный фрагмент под пипеткой можно разрушить, прикладывая к ней короткие импульсы отрицательного давления. Часто такая манипуляция не нарушает контакта пипетки с мембраной, и в результате между электродом и цитоплазмой устанавливается хорошо изолированный от внешней среды проводящий путь. Такой способ проникновения в клетку наносит ей гораздо меньше повреждений, чем введение стандартного микроэлектрода. Поскольку входное сопротивление небольших клеток велико по сравнению с эффективным сопротивлением кончика пипетки, то можно проводить электрические измерения, регистрируя сигнал от участка мембраны намного большей площади, чем у исходного фрагмента. Этот метод регистрации от целой клетки (whole-cell) характеризуется очень высоким сопротивлением контакта пипетка-клетка (более 10 ГОм) и поэтому иногда называется регистрацией от целой клетки в условиях плотного контакта.

Большинство клеток диаметром менее 20 мкм при прокалывании их обычным микроэлектродом повреждаются, а метод регистрации от целой клетки можно успешно использовать на клетках диаметром 10 мкм, совершенно не разрушая их (рис.51). Сопротивление утечки микроэлектрод-клетка при использовании обычных микроэлектродов не превышает 500 МОм, в то время как сопротивление утечки при whole-cell регистрации может достигать 20 ГОм. И, наконец, если сопротивление кончика

обычного микроэлектрода  $R_s$  составляет более 100 МОм, то сопротивление кончика пипетки при плотном контакте  $\sim 4$  МОм. Поэтому метод регистрации при плотном контакте имеет ряд явных преимуществ по сравнению с другими методами и, вероятно найдет применение для изучения клеток, которые пока еще не поддавались обычному электрофизиологическому анализу.

Надо, однако отметить, что наиболее корректную информацию о мембранной проводимости все таки дает регистрация токов через одиночные каналы, так как позволяет избавиться от ряда артефактов, которые могут быть получены при регистрации макроскопического тока. Имеются по крайней мере четыре основные проблемы, с которыми приходится сталкиваться при регистрации макроскопических токов. Во-первых, трудно создать условия для регистрации тока только через каналы интересующего нас типа. Во-вторых, влияние последовательного сопротивления может приводить к различию между истинным мембранным и поддерживаемым потенциалами. В-третьих, накопление ионов в примембранной области может вызвать зависящее от времени изменение тока через отдельные каналы. И, наконец, потенциал-зависимость проводимости открытого канала может быть ошибочно принята за потенциал-зависимость активации канала.

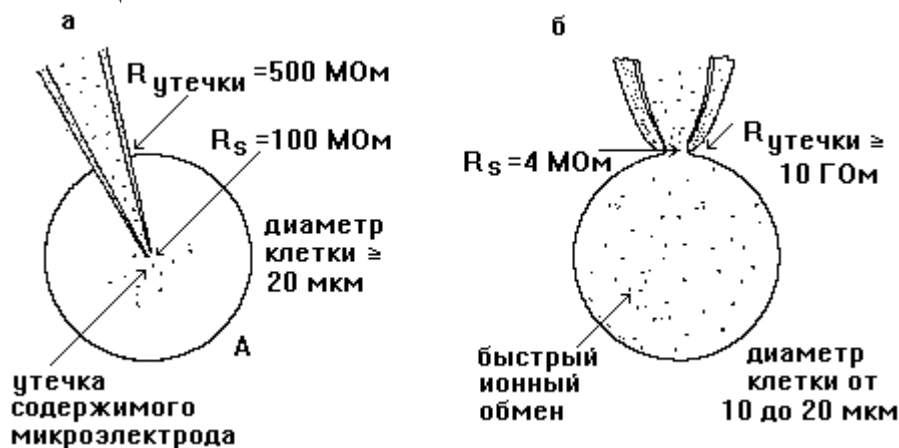


Рис.51. Сравнение методов регистрации с помощью обычного микроэлектрода (а) и при плотном контакте (б) [Марти, Неер, 1987].

Ни один из перечисленных артефактов не представляет серьезной проблемы при регистрации токов через одиночные каналы, так как всегда можно измерить ток для каждого события включения канала и отыскание вероятности пребывания в открытом состоянии не зависит от амплитуды тока через канал. А поскольку можно измерять амплитуду тока через открытый канал, становится возможным различать токи, проходящие через каналы разной проводимости. По записям токов через одиночные каналы получают информацию о кинетике работы канала, которую нельзя извлечь из макроскопических измерений. Это преимущество особенно очевидно при регистрации от мембранных фрагментов, содержащих только один канал.

## ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЯ ПРОЦЕССОВ РОСТА, ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

Хорошим объектом для изучения ранних этапов роста и дифференциации являются прорастающие зиготы водорослей, таких, как *Fucus* и *Pelvetia*. Неоплодотворенные яйцеклетки радиально симметричны. После оплодотворения зигота опускается на твердый субстрат и через 12-24 ч при обычных условиях на ее нижней стороне образуется ризоидальный выступ. Первое деление происходит в плоскости, перпендикулярной оси выступа (рис. 52). Возникающие при этом две дочерние клетки (ризоидальная и талломическая) сильно различаются по строению и дальнейшему развитию. Первое деление зиготы определяет постоянную ось полярности в системе, первоначально полностью лишенной полярности.

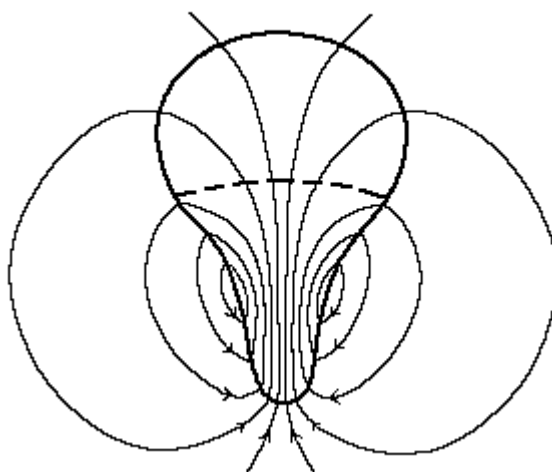


Рис.52. Рисунок силовых линий электрического тока вокруг двухклеточного эмбриоида *Pelvetia* [Nuccitelli, Jaffe, 1976].

### 1 .Эмбриогенез и дифференциация

Ось симметрии зародыша и взрослого организма определяется ориентацией основной оси поляризованного яйца. Основным носителем пространственной информации о будущем развитии яйца служит его цитоархитектоника, особенно кортикальный слой, ассоциированный с плазматической мембраной. У поляризованных клеток асимметрия комплекса плазмалемма-цитоскелет проявляется в асимметричном распределении ионных каналов и ионных насосов мембраны и соответственно в векторизации ионного транспорта и возникновении электрических градиентов. Обработка цитохалазинами полностью, но обратимо подавляет электрофизиологическую поляризацию зиготы.

Наиболее важными факторами, влияющими на организацию кортикальных микротрубочек, являются ионы  $Ca^{2+}$ , фитогормоны и градиенты биоэлектрических потенциалов. Слабые электрические поля (1 мВ на клетку) и механическое давление (0,12



- 0,22 Н) вызывают переориентацию кортикальных микротрубочек, направление которых уже через 6 ч воздействия становится перпендикулярным приложенному полю. Полярность зигот можно индуцировать также с помощью одностороннего освещения, созданием дополнительных гравитационных сил, градиентов ИУК и некоторых ионов ( $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ).

Способность к поляризации в определенной степени видоспецифична. Так, для зигот морской водоросли *Fucus*, прорастающих на сравнительно небольшой глубине, важным фактором поляризации является свет, тогда как в яйцеклетках *Cystosira barbata*, родственной *Fucus*, но развивающейся в темноте, ризоид возникает в месте проникновения сперматозоида.

Формирование электрофизиологической оси полярности будущего растения происходит на самых ранних этапах его развития. Уже через 30 мин после оплодотворения у зиготы бурой водоросли *Pelvetia* происходит "электрическая" поляризация клетки. В этот момент появляется трансцитоплазматический ток, входящий в область будущего ризоида и выходящий с противоположной стороны, там, где будет формироваться таллом (см. рис. 52). Наибольшая плотность тока (до 1 мкА/см<sup>2</sup>) регистрировалась в области наиболее интенсивно растущего ризоидального полюса. Аналогичные петли тока (см. рис. 39) были обнаружены при прорастании пыльцы лилии (до 6 мкА/см<sup>2</sup>), росте корневых волосков ячменя и эмбриогенезе дикой моркови. Не случайно один из авторов [Goldsworthy, 1986], анализируя роль электрической поляризации в дифференциации, назвал свою работу "The electric compass of plant" ("Электрический компас растения").

В процессе дифференциации клетки на генерацию сети электрических токов расходуется до 1% общего содержания АТФ.

У растительных клеток, характеризующихся полярным типом роста (зиготы водорослей, прорастающая пыльца, корневые волоски, ризоиды и т.п.), возникновение электрических токов, входящих в растущие и выходящих из закончивших рост участков клетки, является одной из наиболее ранних реакций в процессе дифференциации. Эти электрические токи, как правило, предшествуют морфологическим изменениям и связаны с такими носителями зарядов, как ионы  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  и  $H^+$ . Полагают, что носителями зарядов в случае входящего тока чаще всего являются ионы  $Ca^{2+}$ , выходящего - ионы  $K^+$ . У зигот *Fucus* в безкальциевой среде электрические токи не регистрируются, а проницаемость плазмалеммы для ионов  $Ca^{2+}$  определяется величиной мембранного потенциала.

Возникновение градиентов биоэлектрических потенциалов имеет важное значение на всех этапах роста и развития растительного организма, Американская ученоя Brawley с коллегами измеряли биоэлектрические потенциалы эмбриоидов дикой моркови на разных стадиях развития. Они установили, что уже на стадии глобулы вокруг зародыша формируется электрическое поле со специфическим рисунком силовых линий, который сохраняется на протяжении всего развития эмбриоида. Наибольшая плотность входящего электрического тока зарегистрирована на апикальном полюсе в зонах формирующихся семядолей. Максимум выходящего тока был приурочен к базальной части зародыша, а именно - к области закладки апикальной меристемы корня. При этом плотность электрического тока в вышеуказанных зонах на каждой новой стадии развития зародыша возрастала.

В аналогичных исследованиях, выполненных Goldsworthy на каллусе табака и суспензионной культуре клеток моркови, выполненных помимо электрического градиента между формирующимися семядолями и корнем было показано появление и градиента рН вдоль апопласта эмбриоида. Оба градиента являются необходимыми в процессе нормального развития зародыша. Автор высказал предположение, что градиент электрического поля вдоль эмбриоида влияет на процесс полярного транспорта ИУК. Однако ауксин, по-видимому, необходим только на первых этапах эмбриогенеза в

качестве индуктора дифференциации, а затем (когда начинается формирование системы цитоплазматических ионных токов) должен быть удален из среды инкубации, поскольку экзогенная ИУК нарушает специфическую для зародыша картину электрических токов. Таким образом, уже на самых ранних стадиях развития, в процессе дифференциации зиготы и зародыша, возникают так называемые "эмбриональные" электрические токи, формируется специфический рисунок силовых линий, указывающий на точки с максимальной скоростью роста и зоны закладки будущих органов растения.

С помощью техники вибрирующего электрода удалось зарегистрировать электрические токи, связанные с образованием первичных корней у растений пшеницы, овса, фасоли, гороха и придаточных корней у картофеля. При этом в зонах растяжения и меристемах, как правило, регистрируются входящие электрические токи, а в зоне закончивших рост клеток - выходящие электрические токи, которые варьировали от 0,2 мкА/см<sup>2</sup>, например, у лилии и до 2,8 мкА/см<sup>2</sup> у арахиса. В растениях гороха при сканировании электрического поля около кончиков корней зарегистрированы электрические токи (1 мкА/см<sup>2</sup>), входящие в зону растяжения и меристему и выходящие (0,1 мкА/см<sup>2</sup>) из зоны корневых волосков. Аналогичная картина распределения электрических токов обнаружена у корней проростков фасоли.

Вероятным механизмом инициации трансцеллюлярного электрического тока при поляризующих воздействиях является прежде всего локальное изменение кальциевой проницаемости плазмалеммы. Jaffe с коллегами разработали положение о центральной роли ионов Ca<sup>2+</sup> как поляризующего клетки агента при действии различных внешних стимулов. Изучая дифференциацию зигот *Fucus*, они пришли к заключению, что под воздействием односторонне направленного фактора (гравитация, свет и т.д.) происходит локальное увеличение кальциевой проницаемости плазмалеммы. Это может, во-первых, вызывать локальную деполяризацию плазмалеммы и, во-вторых, создавать электрическое поле в результате связывания ионами Ca<sup>2+</sup> отрицательных зарядов, фиксированных в цитоплазме. В возникшем электрическом поле могут происходить электрофорез клеточного содержимого и латеральная диффузия кальциевых и калиевых каналов к противоположным полюсам клетки. Полагают, что вследствие поляризации клетки каналы перераспределяются так, что Ca<sup>2+</sup>-каналы концентрируются на положительно заряженном ризоидальном полюсе, а калиевые каналы - на отрицательном талломическом полюсе. Это приведет к вхождению потока ионов Ca<sup>2+</sup> в область ризоида и к выходу ионов K<sup>+</sup> на противоположном конце клетки. Локализованный таким образом ионный ток и возникающая при этом эндогенная поляризация клетки способствуют появлению ионных градиентов в цитоплазме, в результате чего клетка становится полярной. Входящие ионы Ca<sup>2+</sup> индуцируют локальную секреторную активность клетки, в этом участке увеличивается площадь плазмалеммы, и начинает образовываться ризоид. Когда же зигота разделится перпендикулярно главной оси, то ядра дочерних клеток попадут в цитоплазму, находящуюся в различном функциональном состоянии, вследствие чего в них начнут реализовываться разные генетические программы.

На важную роль ионов K<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup> при поляризации в процессах роста и дифференциации указывает и тот факт, что для генерации электрического тока при прорастании пыльцы лилии требовалось их присутствие в среде в концентрации не ниже 0,1 ммоль/л. В ходе прорастания пыльцы большая часть входящего тока была связана с ионами K<sup>+</sup>, а выходящего - с ионами H<sup>+</sup>; ионы же Ca<sup>2+</sup> выполняли роль триггера, индуцирующего потоки ионов K<sup>+</sup> и H<sup>+</sup>.

Pierson с коллегами с помощью Ca<sup>2+</sup>-селективного вибрирующего микроэлектрода удалось зарегистрировали потоки ионов Ca<sup>2+</sup> величиной от 1,4 до 14,0 нмоль/(см<sup>2</sup>·с) вокруг прорастающего пыльцевого зерна и пыльцевой трубки лилии. На ранних этапах прорастания входящий поток Ca<sup>2+</sup> регистрировался в районе пыльцевой поры. Растущая пыльцевая трубка характеризовалась специфическим профилем Ca<sup>2+</sup>-потока, максимальное вхождение которого наблюдалось в области интенсивно растущего апекса,

что, вероятно, и формирует внутриклеточный градиент ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Предположительно поступление ионов кальция в пыльцевую трубку осуществляется через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, локализованные главным образом в апикальной части плазматической мембраны. Следовательно, основой эндогенной электрической поляризации растительных клеток являются локальные, строго ориентированные изменения проницаемости плазматических мембран, в первую очередь для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Таким образом, под влиянием самых различных внешних воздействий в клетках в ходе морфогенеза прежде всего начинают генерироваться ионные потоки и формируется электрическая ось полярности. Ионам  $\text{Ca}^{2+}$  в этом процессе принадлежит особая роль, так как именно кальций несет первичную информацию о возникающем векторе поляризации. Вслед за возникновением градиента ионов кальция в клетке, вероятно, образуется градиент активности кальций-кальмодулиновой системы и систем других мессенджеров. Так происходит становление вторичных градиентов - мембранных, метаболических, транспортных и др. И наконец, чувствительные к изменению активности ионов  $\text{Ca}^{2+}$  элементы цитоскелета завершают структурную поляризацию клетки.

На дальнейших этапах роста и развития растительного организма вдоль осевых органов также регистрируются четко выраженные градиенты биоэлектрических потенциалов вдоль корня, надземной части и всего растения. Градиенты БЭП метаболического происхождения отдельных клеток, тканей и органов растения отражают прежде всего различия в интенсивности процессов обмена веществ.

## 2. Гравитропизм

В результате механического взаимодействия статолитов с клеточными мембранами (эндоплазматический ретикулум, плазмалемма, тонопласт) изменяются процессы мембранного транспорта, происходит поляризация отдельных клеток и индуцируется поперечная (латеральная) поляризация органа в целом. Наиболее ранний процесс в гравитропической реакции - поперечная электрическая поляризация осевых органов, которая является результатом изменения мембранных потенциалов клеток, оказавшихся на верхней или нижней стороне гравистимулированного органа.

Еще в 1926 г. Vose установил, что под влиянием силы тяжести нижняя половина осевого органа заряжается положительно, а верхняя - отрицательно. В дальнейшем Холодный и Went выдвинули гипотезу, согласно которой возникающая при гравистимуляции электрическая поляризация ткани обеспечивает передвижение аниона ИУК<sup>-</sup> (в результате электрофореза) в сторону положительно заряженных участков растительных тканей. Положительный гравитропизм корней с точки зрения этой гипотезы объясняется тем, что в нижней половине корня накапливается повышенное количество ИУК, что приводит к торможению роста клеток нижней стороны корня и, как следствие, к его положительному гравитропическому изгибу. Аналогичным образом накопление ИУК на нижней стороне горизонтально ориентированных надземных органов растений способствует развитию у них отрицательной гравитропической реакции, что связано с неодинаковой чувствительностью корней и надземных органов к ауксину. Обнаруженный геоэлектрический эффект подавляется ингибиторами дыхательного метаболизма и не проявляется в тех частях колеоптиля, которые обеднены индолилуксусной кислотой за счет декапитации.

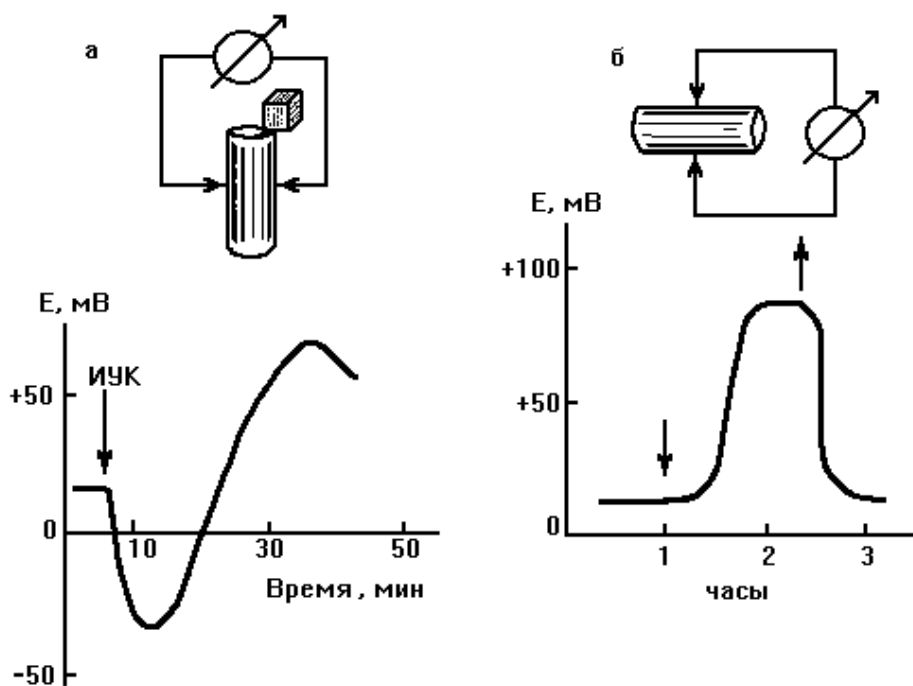


Рис.53. Действие ИУК (а) и гравистимуляции (б) на латеральный электрический градиент колеоптилей кукурузы [Grahm, 1964].

Однако впоследствии выяснилось, что возникающие под действием гравитационного стимула изменения биоэлектрических потенциалов имеют лаг-период 10-20 мин, тогда как не только рецепция, но и реализация гравитропического стимула в ростовой изгиб проявляется уже в течение 8-10 мин (рис.53). Тот факт, что латентный период образования разности электрических потенциалов больше времени презентации, т.е. времени необходимого для гравитропической индукции, свидетельствует о том, что гравитропическая реакция начинается еще до поперечной электрической поляризации осевого органа. Этот индуцированный гравистимуляцией латеральный градиент биопотенциалов, по-видимому, является уже результатом латерального перераспределения ИУК, которая, как известно, способна активировать протонные насосы, что и является реальной причиной смещения электрического потенциала в положительную сторону. В опытах Меркиса с сотрудниками, выполненных на колеоптилях пшеницы, при одновременном измерении гравитропического изгиба и латерального градиента БЭП, было установлено, что оба процесса развиваются практически синхронно. В дальнейшем ростовой изгиб становится более выраженным, а разность электрических потенциалов уменьшается или ее изменения приобретают колебательный характер.

С появлением техники вибрирующего микроэлектрода, позволяющего сканировать электрическое поле вокруг живых объектов, удалось получить ряд прямых доказательств того, что самыми быстрыми эффектами при гравистимуляции растений все-таки являются изменения электрофизиологических свойств их клеток и тканей. Sievers с коллегами обнаружили, что уже в пределах 30 с гравистимуляции меняется специфический рисунок электрических силовых линий на корнях *Lepidium sativum*. У вертикально ориентированных корней электрический ток симметрично входит в зону апекса. Когда корни ориентируются горизонтально, электрический ток течет акропетально по верхней стороне и базипетально по нижней. При гравистимуляции гипокотилей сои уже через 1-2 мин их нижняя сторона приобретает более

положительный потенциал, чем участки ткани, находящиеся при гравистимуляции наверху. Через 3-4 мин после начала гравистимуляции на  $0,55 \text{ мкА/см}^2$  увеличивается плотность эндогенного электрического тока, выходящего из клеток коллумеллы корня кукурузы.

В аналогичных экспериментах, выполненных на корнях *Lepidium sativum* и целых растениях *Phaseolus angularis*, была показана высокая степень корреляции между плотностью электрического тока при гравистимуляции растительных тканей и интенсивностью гравитропического изгиба. Уже через 1 мин от начала гравистимуляции у растений фасоли регистрировался изгиб, а в течение 0,5-2,0 мин - поперечная электрическая поляризация тканей. При этом было обнаружено, что удаление из среды ионов  $\text{Ca}^{2+}$  или подщелачивание (рН 8,0) приводит к резкому уменьшению латерального градиента электрического поля вокруг корня *Lepidium sativum*. Поэтому можно полагать, что латеральные градиенты электрических потенциалов, индуцированные гравистимуляцией, в осевых органах растений, по крайней мере частично, формируются за счет мембранного транспорта ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{H}^+$ .

При исследовании влияния гравистимуляции на мембранные потенциалы клеток корней *Lepidium sativum* потенциал покоя статочитов вертикально ориентированных корней составлял около  $-118 \text{ мВ}$ . После наклона корня на  $45^\circ$  уже через 8 с наблюдалась деполяризация мембранного потенциала клеток, оказавшихся внизу, и более медленная гиперполяризация верхних клеток. Мембранный потенциал нижних статочитов деполяризовался до  $-85 \text{ мВ}$ , а верхних - гиперполяризовался на  $10-13 \text{ мВ}$  (рис. 54). Эти эффекты были характерны только для клеток стенохимы и не проявлялись в клетках коры и ризодермы. Изменение мембранного потенциала статочитов, по-видимому, является отражением изменения ионных потоков через плазмалемму, индуцированных гравитацией.

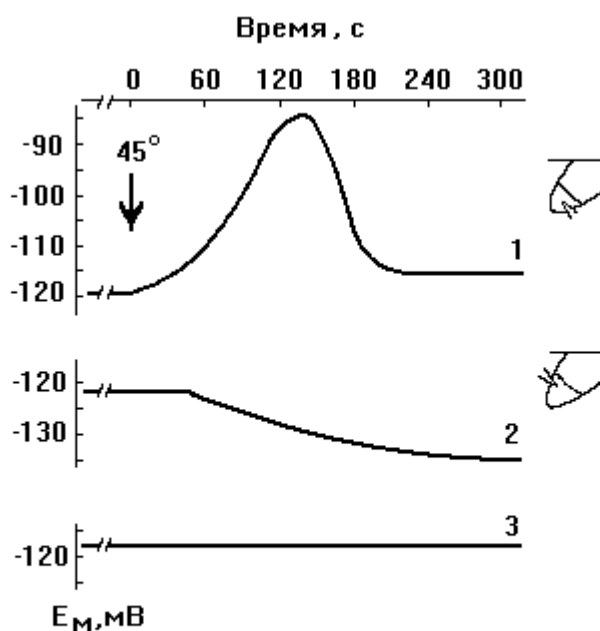


Рис.54. Изменение мембранного потенциала клеток чехлика корней клоповника при гравистимуляции [Sievers e.a., 1984].

1, 2 - динамика мембранного потенциала клеток, оказавшихся внизу и наверху, соответственно; 3 - контрольный вариант.

Ishikawa и Evans также с помощью микроэлектродов изучали динамику изменения мембранного потенциала при гравистимуляции у клеток коры корней маша. Для вертикально ориентированных корней мембранный потенциал клеток коры,

расположенных на расстоянии 2 мм от верхушки, в среднем составлял -115 мВ. При гравистимуляции мембранный потенциал клеток, оказавшихся наверху, уже через 30 с возрастал по абсолютной величине до -154 мВ; нижние клетки при этом деполяризовались до -62 мВ. Индуцированная гравистимуляцией гиперполяризация верхних клеток подавлялась дициклогексилкарбодимидом. При возвращении корней в вертикальное положение мембранный потенциал клеток коры возвращался к исходному уровню в течение 30 с (рис. 55). Этот цикл деполяризации/гиперполяризации, индуцированный гравистимуляцией, мог повторяться по крайней мере десять раз.

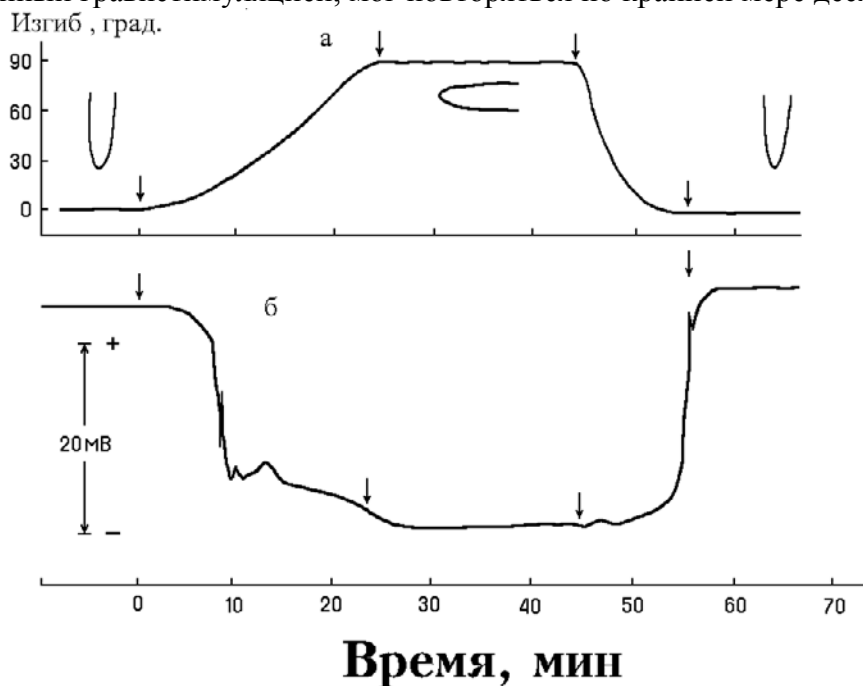


Рис.55. Изменение мембранного потенциала клеток коры корня маша в зоне растяжения при гравистимуляции [Ishikawa, Evans, 1990].

а - угол ориентации корня относительно вектора силы тяжести; б - изменение мембранного потенциала. Стрелками указаны моменты изменения положения корня..

Первичным посредником между гравитропическим стимулом и сдвигами мембранного потенциала статочитов, вероятнее всего, являются полярные потоки ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциалчувствительные или (и) механочувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы. Сильная деполяризация статочитов, оказавшихся при гравистимуляции на нижней стороне корня, может быть триггером, способствующим открыванию потенциалзависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и поступлению  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму. Латеральные потоки ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , в формировании которых принимают участие системы активного и пассивного мембранного транспорта кальция, являются одним из наиболее ранних процессов при гравитропизме, предшествующем латеральному перераспределению ауксина.

Весьма эффективным методическим приемом при анализе первичных ростовых реакций растений явилось сочетание флуоресцентных зондов и лазерного сканирующего конфокального микроскопа. С помощью этих методов установлено, что при гравистимуляции на нижней стороне колеоптиля наблюдаются резкие изменения кислотности и содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Быстрое возрастание уровня кальция и снижение pH цитоплазмы индуцируются при фотостимуляции на затененной стороне колеоптилей кукурузы. Поэтому и грави- и фототропическая реакции связаны прежде всего с возрастанием концентрации свободного кальция в цитоплазме. При этом наблюдается четкая корреляция между изменением концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и ростовым изгибом.

При изменении положения осевого органа в пространстве, по-видимому, происходит активация нескольких типов  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, в том числе

механочувствительных и потенциалзависимых, локализованных не только в плазмалемме, но и в эндомембранах. В процесс генерации системы цитоплазматических токов, вызываемых гравистимуляцией, должны также включаться калиевые и анионные каналы. Повышение уровня цитоплазматического кальция будет активировать систему вторичных мессенджеров и активируемых при гравистимуляции других кальцийзависимых процессов. Активация ионной проницаемости и увеличение концентрации цитозольного кальция должны происходить локально, только в тех участках клетки, где наблюдается контакт мембранных структур с седиментирующими частицами или механическое напряжение. Это способствует возникновению и поддержанию полярного потока ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , который несет информацию о направлении вектора силы тяжести. Существование полярного потока ионов кальция обеспечивается за счет согласованной работы Са-транспортирующих систем -  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов различных типов и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз. Перераспределение ионов кальция в ходе становления новой оси симметрии, по-видимому, происходит гораздо раньше, чем перераспределение ИУК. Полярный поток кальция в растущей ткани постоянно ориентируется параллельно вектору силы тяжести (или другому поляризирующему воздействию) и корректирует направление потока ауксина, обеспечивая формирование вторичных градиентов, направления роста и новой оси полярности.

### 3. Фототропизм

Согласно представлениям Холодного-Вента, как грави-, так и фототропическая ростовая реакция растений является результатом поперечной электрической поляризации ткани, которая создает возможность электрофоретического передвижения ауксина к положительно заряженным участкам растительной ткани. Впервые зависимость градиентов БЭП растительных тканей от освещения установил в 1937 г. Clark, однако ему не удалось обнаружить корреляции между величиной латерального электрического градиента и интенсивностью транспорта ауксина. Schrank также показал, что одностороннее освещение колеоптилей овса вызывает их латеральную электрическую поляризацию. При этом затененная часть колеоптиля становилась электроположительной, что соответствовало представлениям Холодного и Вента. Более того, электрический ток (10 мкА), пропускаемый в латеральном направлении в течение 10 мин, индуцировал изгиб колеоптиля в сторону положительного полюса. Интересно, что при помещении на колеоптиль агарового блока, содержащего ИУК (0,5 - 1,0 мг/л), изгиб развивался уже через 2 мин после пропуска электрического тока силой 20 мкА.

В дальнейших опытах было обнаружено, что поляризация электрическим током сохраняется в колеоптилях овса достаточно длительное время.

Так, если в течение 2 мин пропускать электрический ток через колеоптили, обедненные ауксином, изгиб не развивается. Если же такой поляризованный колеоптиль обработать ИУК, начинает развиваться изгиб даже спустя 2-3 ч после 2-минутного пропуска тока. Шунтирование тканей колеоптиля овса различными электролитами приводило к потере способности отвечать на одностороннее освещение ростовым изгибом. Освещение белым светом колеоптилей кукурузы также вызывало появление латерального градиента биопотенциалов (+40 мВ на затененной стороне) с лаг-периодом 30-40 мин.

При освещении в ткани, по-видимому, вначале индуцируется так называемая первичная электрополяризация, вызывающая латеральное перемещение ИУК, которая в свою очередь индуцирует вторичную поляризацию, связанную с появлением потенциала положительного знака на затененной стороне, регистрируемого в большинстве экспериментов. Освещение голубым светом, наиболее эффективным при фототропизме, индуцирует в течение 5-10 мин гиперполяризацию мембранного потенциала клеток

колеоптилей кукурузы на затененной стороне. Ответная реакция наступает еще быстрее (1-2 мин), если голубому свету предшествует вспышка красного.

В последнее время, однако, появились данные, ставящие под сомнение основные положения теории Холодного-Вента о неравномерном перераспределении ауксина, как причине фототропического изгиба. В ряде случаев в фототропически изгибающихся колеоптилях и гипокотелях не удается обнаружить заметную латеральную асимметрию между освещенной и затененной сторонами в содержании свободной, экстрагируемой или диффузионной формы ИУК.

Nasegawa с коллегами повторили классические эксперименты Вента, но получили подтверждение его результатов только с помощью биотестов. При использовании же тонкослойной и газожидкостной хроматографии они обнаружили, что действительное содержание ИУК, диффундирующей из освещенной и затененной половин колеоптиля, было одинаковым. В диффузатах были выделены ингибиторы роста, концентрация которых была выше в агаровых блоках с освещенной стороны, чем с теневой. Таким образом, на освещенной стороне, вероятно, происходит накопление ингибиторов роста (возможно, ксантоксина, образующегося при фотолизе виолаксантина), которые и вызывают фототропический изгиб.

У подавляющего большинства растений удлинение стебля, по всей видимости, регулируется двумя фоторецепторами - фитохромом и рецептором голубого света. Следует отметить, что если освещение голубым светом приводит к гиперполяризации мембранного потенциала, то красный свет индуцирует деполяризацию мембраны.

#### 4.Электротропизм

Еще в 1930 г. в классических опытах Brauner и Bunning было установлено, что в электрическом поле напряженностью около 600 В/см колеоптиль овса изгибается по направлению к положительному полюсу (аноду), а корни конского боба растут по направлению к катоду. Однако в последующих исследованиях при помещении колеоптилей овса в постоянное электрическое поле напряженностью от 600 до 5000 В/см не удавалось обнаружить существенных ростовых изгибов в сторону какого-либо электрода. По-видимому, для проявления ростовых эффектов внешних электрических полей необходимо, чтобы цепь нагрузки от источника ЭДС была замкнута и через растительные ткани протекал электрический ток. Эти условия были выполнены в экспериментах японских исследователей Nozue и Wada. Они анализировали прорастание пыльцевых трубок табака в электрическом поле напряженностью от 0 до 4 В/см (рис. 56) и установили, что рост пыльцевых трубок зависит от напряженности электрического поля и направлен в сторону положительно заряженного электрода.



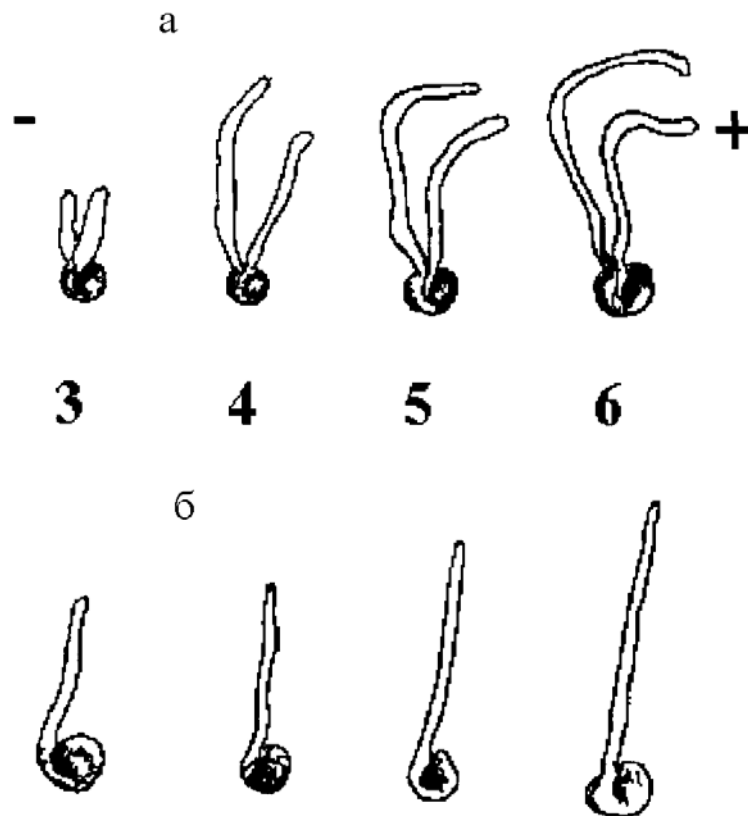


Рис.56. Электротропизм пыльцевых трубок табака [Nozue, Wada, 1993].  
 а - электрическое поле напряженностью 380 мВ/мм (катод справа); б - контрольный вариант. Цифры - время в часах от начала прорастания пыльцы.

В опытах Ishikawa и Evans было показано, что корни кукурузы также изгибаются в сторону анода, причем этот изгиб зависит от величины электрического поля (рис.57). Экзогенная ИУК (10 мкмоль/л) и ингибиторы транспорта ауксина резко подавляли эту электротропическую реакцию. Интересно отметить, что корни аgravитропных мутантов гороха оказались более чувствительными к электростимуляции, чем корни дикого типа. Эти факты свидетельствуют о том, что, несмотря на то, что в основе электро- и гравитропической реакции лежит ИУК-регулируемый рост растяжением, первичные механизмы этих двух типов тропизмов, вероятно, различны.

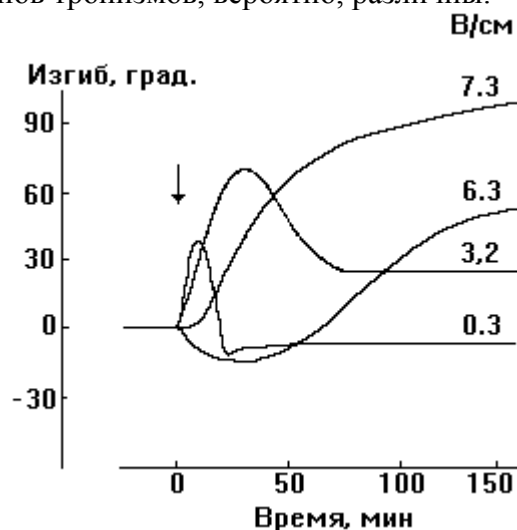


Рис.57. Электротропический изгиб корней кукурузы в электрическом поле различной напряженности [Ishikawa, Evans, 1990]. Стрелкой отмечен момент подачи напряжения.

В переменном электрическом поле (например, с частотой 60 Гц) у растительных организмов, как правило, наблюдаются снижение частоты клеточных делений и замедление растяжения клеток. Если же напряжение переменного электрического поля превышает 10 кВ/м, происходят серьезные нарушения структуры клеток и повреждение тканей.

## 5.Регенерация и корнеобразование

Для регенерации, происходящей в процессе заживления после поранения тканей животных и растительных организмов, наиболее важное значение имеет их поляризация. Gensler с помощью экстраклеточных электродов анализировал кинетику демаркационных потенциалов, возникающих при поранении стебля растений, а также влияние электрического тока на рост растений. При пропускании электрического тока (плотностью от 0,3 до 1,0 мкА/мм<sup>2</sup>) в акропетальном направлении рост стебля усиливается; индифферентный электрод при этом заземлен. Ток противоположного направления вызывал омертвление ткани в точке контакта электрода со стеблем.

В процессе заживления ран у животных наблюдались аналогичная зависимость. Поврежденная часть тканей растительного организма становится более отрицательно заряженной по отношению к интактным. В процессе заживления потенциал повреждения (демаркационный) постепенно снижается (табл.6).

Табл. 6. Потенциалы повреждения, мВ

Объект	Сразу после повреждения	Через 1 час
Акация	-32	-8
Примула	-44	-11
Валиснерия	-45	+20
Люпин	-120	-4
Картофель	-66	-47

Часто практически единственным способом индукции корнеобразования является поляризация черенка слабым электрическим током, пропускаемым в продольном направлении. Укоренение черенков роз и других цветочных растений более эффективно происходило при 10-180 минутной ежедневной обработке электрическим током от 0,5 до 60 мкА (анод у апикальной части). В результате резко сокращались сроки укоренения и повышалась приживаемость черенков. Аналогичных результатов удалось добиться в опытах с трудноукореняемыми черенками ивы, при этом с помощью ростовых биотестов показано, что пропускание электрического тока вызывает выделение в среду укоренения ростовых промоторов. Одним из таких промоторов может быть ИУК, базипетальный транспорт которой играет существенную роль в процессе корнеобразования.

## 4.Действие фитогормонов на электрические характеристики растений

Наиболее адекватным способом электрической поляризации клеток и тканей растения является воздействие фитогормонами. ИУК, например, способна вызывать значительные изменения практически всех электрофизиологических параметров растительного организма. Одной из самых ранних реакций растительной клетки в ответ на ИУК является гиперполяризация плазмалеммы. Большинство исследователей склонны

объяснять гиперполяризацию мембранного потенциала растительных клеток, развивающуюся под действием ИУК и других фитогормонов, активацией электрогенных систем транспорта ионов  $H^+$  в плазмалемме. В опытах Barbier-Brugoo методом петч-кламп показано, что этот эффект ИУК, по-видимому, связан с участием ауксинсвязывающих белков, работающих со стороны клеточной поверхности, т.е. в процессах электрогенеза и активации протонных насосов, инициируемых ауксином, вероятно необходимо участие и рецепторной системы.

На активации ауксином локализованной в плазмалемме  $H^+$ -помпы основывается теория так называемого "кислого роста", которую, однако, ряд авторов ставит под сомнение. Возражения противников теории "кислого роста" можно свести к следующим моментам: кинетика секреции протонов и кинетика роста не совпадают; обработка ауксином и кислотами действует аддитивно (и вероятно, поэтому независимо); кислые буферные смеси начинают активировать рост только с рН 5,0-4,5, достигая максимума при рН 2,0-2,5; нейтральные или щелочные буферы не способны снимать ИУК-зависимые ростовые эффекты, и, наконец, обработка фузикоцином, который также эффективно, как и ИУК активирует секрецию  $H^+$ , стимулирует только ранние этапы растяжения клеток, связанные с подкислением фазы клеточных стенок. Некоторые авторы ставят под сомнение идею "кислого роста" на основании того, что обработка ауксином вначале вызывает подкисление цитоплазмы, а снижение рН цитоплазмы, как они полагают, способствует деполяризации плазмалеммы и активации выделения протонов в апопласт.

Тщательная проверка возражений против теории "кислого роста" была проведена на колеоптилях кукурузы в 1990 г. Luthen с коллегами и позволила снять некоторые из высказанных ранее замечаний, подтвердив основные положения теории "кислого роста". Они получили ряд данных, свидетельствующих о том, что секреция ионов  $H^+$  имеет определяющее значение в регуляции ростовых процессов, стимулируемых ауксином. Полученные результаты позволяют считать, что теория "кислого роста" способна корректно описывать процессы, происходящие на ранних этапах ИУК-индуцируемого роста.

ИУК-индуцированная гиперполяризация плазмалеммы опережает на несколько минут ускорение роста, вызываемого ауксином. При этом, если кривая доза - ответ для ИУК-индуцированного роста имеет хорошо известный U-образный характер, то кривая ИУК-индуцируемой гиперполяризации имеет иной вид и может быть аппроксимирована кинетикой Михаэлиса - Ментен с  $K_M = 7,5 - 8,7 \cdot 10^{-7}$  моль/л.

При использовании микроэлектродной техники Brummer с соавторами удалось показать, что ИУК-индуцируемое подкисление цитозоля клеток корневых волосков и колеоптилей кукурузы развивается в течение нескольких секунд. Гиперполяризация мембранного потенциала (с -130 до -155 мВ) появлялась с задержкой в 2 мин. При анализе функционирования протонных насосов плазмалеммы клеток колеоптилей кукурузы на фоне моненсина - ионофора, выполняющего функции неэлектрогенного  $H^+/Na^+$ -обменника, было обнаружено, что при рН 5,8 моненсин быстро индуцировал подкисление фазы клеточных стенок и уменьшение рН цитозоля, при этом изменялся мембранный потенциал и активировался рост клеток колеоптилей (как при обработке ИУК). Если же рН среды был выше 8,0, обработка моненсином практически не вызывала сдвигов рН цитоплазмы, мембранного потенциала и скорости роста, хотя в этих условиях наблюдалось подкисление клеточных стенок. Обработка ауксином при рН 8,0 индуцировала рост растяжением, но подкисления клеточных стенок не наблюдалось. Поэтому для роста растяжением, вероятно, необходимо не столько подкисление фазы клеточных стенок, сколько сдвиг мембранного потенциала, связанный с участием локализованных в плазмалемме  $H^+$ -насосов.

В некоторых случаях обработка экзогенными фитогормонами способна индуцировать колебательный характер изменений электрофизиологических характеристик растительных клеток. Так, например в опытах Полевого и Штальберга

под действием метилового эфира ИУК возникали колебания мембранного потенциала с периодом 12-18 мин и амплитудой 18-22 мВ. При экстраклеточном отведении индуцированные ауксином изменения БЭП растительных тканей носят характер затухающих колебаний с амплитудой первой волны 20-40 мВ и частотой 30-50 мин (рис. 53).

В последнее время получены факты указывающие на то, что действие ИУК на ионные потоки через плазматическую мембрану (в том числе и на секрецию  $H^+$ ) может осуществляться через регуляцию активности калиевых, анионных и кальциевых каналов. При этом в первую очередь оказываются задействованными различные типы  $Ca^{2+}$ -каналов. Gehring с соавт. удалось измерить динамику содержания  $Ca^{2+}$  в цитоплазме при гормональном воздействии с помощью флуоресцентного  $Ca^{2+}$ -зонда fluo-3 и конфокального микроскопа. Они установили, что обработка ауксином уже через 4 минуты приводит к возрастанию Са в цитоплазме клеток колеоптилей кукурузы с 280 до 380 нМ.

На рис. 58 приведена гипотетическая схема мембранного действия ИУК. Суть этой схемы состоит в том, что наиболее первичным процессом, индуцируемым в растительной клетке ИУК, является активация ионных (анионных и кальциевых) каналов плазмалеммы. Обработка клетки ИУК способна активировать, вероятно, как потенциалзависимые, так и рецептуруправляемые Са-каналы. Потенциалзависимые Са-каналы, по-видимому, включаются после деполяризации мембраны за счет активации ауксином анионных каналов и выхода из клетки анионов. Функционирование рецептуруправляемых Са-каналов может модулируется ауксином непосредственно или через промежуточные продукты, образуемые после взаимодействия ИУК с рецепторами, локализованными на поверхности клетки. Ауксин, таким образом, вызывает прежде всего активацию анионных и кальциевых каналов и, как следствие, увеличение содержания ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме. Избыток  $Ca^{2+}$  внутри клетки способен инициировать мощный поток цитоплазматического калия через  $Ca^{2+}$ -зависимые  $K^+$ -каналы наружу и вызывать гиперполяризацию мембранного потенциала. Увеличение концентрации ионов  $K^+$  снаружи клетки в свою очередь будет активировать локализованную в плазмалемме  $H^+$ -АТФазу, которая, расщепляя АТФ, в режиме антипорта будет выкачивать протоны наружу клетки и закачивать в цитоплазму калий до его исходного уровня.

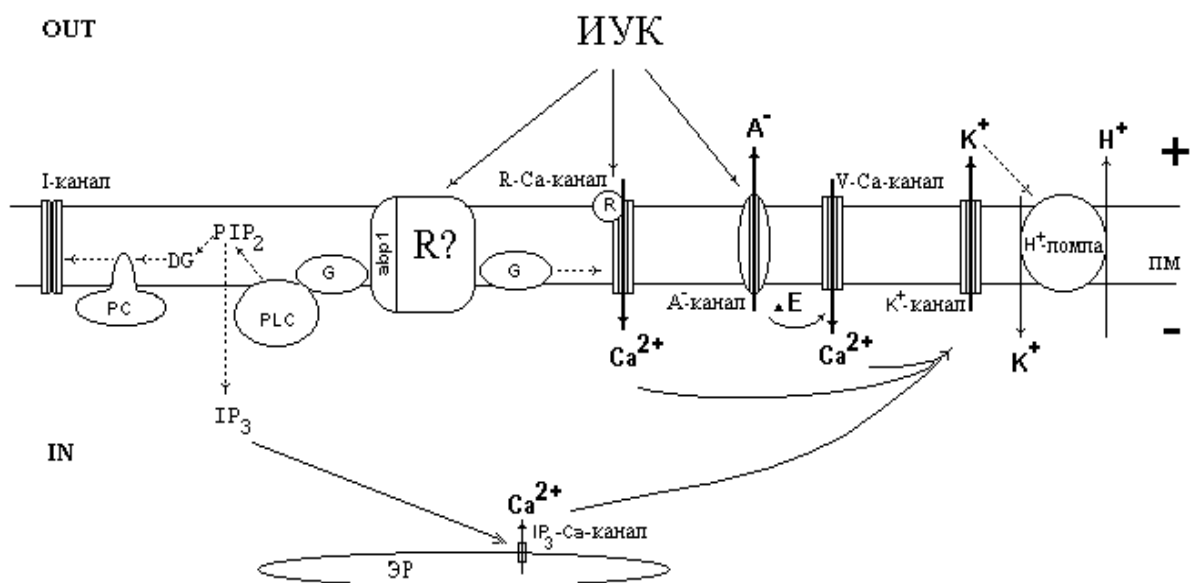


Рис.58 Мембранный механизм действия ИУК.

пм - плазмалемма; ЭР - эндоплазматический ретикулум; R - рецептор; abp-1 - ауксинсвязывающий белок; I-канал - ионный канал; R-Са-канал - рецепторуправляемый Са-канал; А<sup>-</sup>-канал - анионный канал; V-Са-канал - потенциалзависимый Са-канал; IP<sub>3</sub>-Са-канал - IP<sub>3</sub>-регулируемый Са-канал; K<sup>+</sup>-канал - Са-активируемый K<sup>+</sup>-канал; H<sup>+</sup>-помпа - H<sup>+</sup>-АТРаза; G - G-белок; PLC - фосфолипаза С; PC - протеинкиназа С; PIP<sub>2</sub> - фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; IP<sub>3</sub> - инозитол-1,4,5-трифосфат; DG - диацилглицерол.

Следует учитывать, что повышение содержания ионов Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме за счет активации Ca<sup>2+</sup>-каналов инициирует включение еще целого каскада процессов, которые могут иметь непосредственное отношение к активации ИУК роста растяжением. ИУК активирует фосфолипазу с и фосфоинозитидный цикл. Образующийся IP<sub>3</sub> способен активировать Ca<sup>2+</sup>-каналы эндомембран и высвободить Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных компартментов. Ионы Ca<sup>2+</sup> и DG активируют протеинкиназу С, которая в свою очередь способна модулировать работу многих мембранных белков, участвующих в ионном транспорте.

Newman изучал базипетальный транспорт меченой ИУК из агарового блока, помещенного на апикальную часть отрезков колеоптилей овса. Средняя скорость передвижения метки составила 10-14 мм/ч, с такой же скоростью в базипетальном направлении распространялась и волна биопотенциалов. Однако, несмотря на то, что ауксин в акропетальном направлении активно не перемещается, при обработке ИУК базального конца отрезка колеоптилей кукурузы возникала такая же электрическая реакция, как и при добавлении гормона к апикальному концу. На этом основании был сделан вывод, что ИУК-индуцируемые колебания БЭП не зависят от транспорта гормона и, по-видимому, являются отражением только процессов ИУК-стимулируемого роста.

Другие фитогормоны - цитокинины, этилен, гибберелловая и абсцизовая кислоты - также способны инициировать ионные потоки через клеточные мембраны и влиять на биоэлектрические характеристики растительных клеток и тканей, однако их роль в электрогенезе растений менее исследована.

## 7.Участие градиентов биоэлектрических потенциалов в регуляции ростовых процессов

Для изучения влияния биоэлектрических потенциалов на обмен веществ в растениях применяют различные методические приемы. Один из них заключается в том, что участки тканей, между которыми регистрируется разность потенциалов, закорачивают солевым мостиком. Варьируя сопротивление мостика, можно в ходе эксперимента изменять (в сторону уменьшения) градиент электрических потенциалов. В опытах с коллегами было установлено, что шунтирование растений в продольном направлении уменьшает нативный градиент электрических потенциалов и скорость передвижения  $^{32}\text{P}$  и  $^{45}\text{Ca}$  в восходящем направлении, а  $^{14}\text{C}$ -сахарозы в нисходящем направлении у проростков пшеницы, корней лука, стеблей гречихи.

Недостатком шунтирования является то, что при этом можно только уменьшать естественные градиенты электрических потенциалов. Поэтому представляют интерес методические подходы, которые позволяют увеличивать или инвертировать нативные градиенты БЭП. Результаты таких экспериментов приведены на рис.59. Увеличение естественного электрического градиента между мезокотилем и корневой системой, например, у проростков кукурузы до  $-300$  мВ усиливало рост в длину и надземной части, и корневой системы проростков. Инверсия знака потенциала мезокотила (до  $+350$  мВ) стимулировала рост надземной части на 20% и более, но тормозила рост корней. При смещении потенциала мезокотила до  $-150$  мВ сырой вес проростков возрастал почти на 40%, а сухой - на 60-100% по сравнению с контролем. При инверсии знака потенциала мезокотила ( $+200$  мВ по отношению к корню) накопление биомассы увеличивалось более чем на 40% только в надземной части, но не в корнях. Таким образом, смещение потенциала мезокотила в отрицательную сторону вызывает активацию ростовых процессов во всех частях проростков; смещение же потенциала мезокотила в положительную сторону, т. е. инверсия естественного градиента БЭП, усиливает рост надземной части проростков кукурузы, но тормозит рост корневой системы. Следовательно, изменение естественных электрических градиентов растительных тканей за счет внешнего источника ЭДС может оказывать существенное влияние на ростовые процессы.

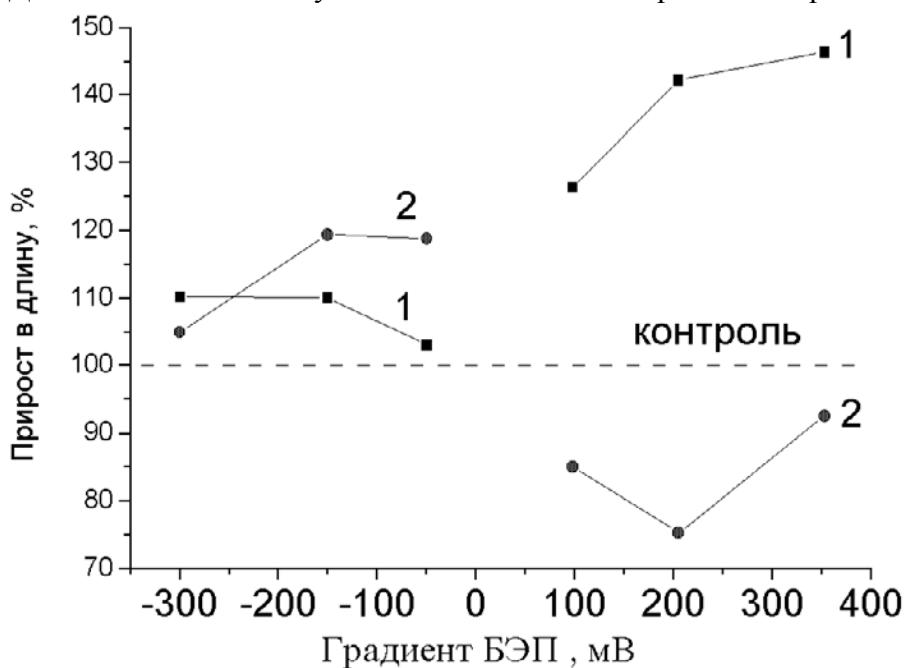


Рис.59. Влияние электрического градиента между надземной частью и корнем проростков кукурузы на рост в длину листа (1) и корня (2).

Анализ поглотительной деятельности корневой системы проростков кукурузы показал, что изменение потенциала мезокотила как в положительную, так и в

отрицательную сторону активирует накопление проростками азота, фосфора, калия и кальция. При отрицательном потенциале надземной части наиболее сильно стимулировалось поступление в нее калия, а при подведении к мезокотилу анода - фосфора, который подавался в питательный раствор в форме аниона. Электрический потенциал надземной части проростков оказывает более сильное влияние на передвижение ионов противоположного с ним знака заряда, что косвенно свидетельствует о возможности электрофоретического механизма действия продольного градиента электрических потенциалов на транспорт ионов. Однако поглощение катионов и анионов усиливалось не только при увеличении нативного электрического градиента, но и при его инверсии, что не позволяет объяснить обнаруженные эффекты простым электрофорезом ионов. Таким образом, увеличение или инверсия естественного градиента БЭП вдоль проростков кукурузы существенным образом сказывается на характере накопления в растении минеральных элементов, что может быть одной из причин изменения ростовых процессов.

При выяснении роли БЭП и электрических токов в регуляции процессов обмена веществ в растительном организме часто возникает вопрос, какого порядка внешнее воздействие можно использовать. Пропускание через стебель растения в продольном направлении электрического тока силой 15-25 мкА подавляет процесс базипетального транспорта  $^{14}\text{C}$ -ИУК на участке, через который проходит электрический ток, однако видимых повреждений тканей при этом не наблюдается. Повышение же силы тока до 50 мкА вызывает потемнение и увядание электризованных тканей у проростков фасоли. Поэтому в большинстве опытов исследователи стараются подобрать такую силу тока, которая не превышала бы приведенные выше значения.

В своих опытах Black с коллегами пропускали через растения томатов в продольном направлении электрический ток силой от 3 до 30 мкА. Они обнаружили не только изменения в поглощении минеральных элементов под действием электрического тока, но и незначительную активацию ростовых процессов, причем стимулирующее действие последнего зависело от его величины и длительности пропускания. Если, например, поглощение калия томатами под влиянием электрического тока силой 3 мкА усиливалось через 3,5 ч, то при увеличении силы тока до 7 мкА стимулирующий эффект проявлялся только через 12 ч. Через 24 ч от начала электризации поглощение ионов  $\text{K}^+$  томатами в опытном и контрольном вариантах выравнивалось.

В длительных экспериментах, составляющих несколько часов, трудно разобраться в конкретных механизмах поляризующего эффекта электрических градиентов. Поэтому нами была разработана методика, позволяющая непрерывно оценивать действие электрического тока на рост в длину с помощью электромеханического датчика линейного смещения (механотрона) с чувствительностью 0,1 мкм. Для изучения действия электрического тока на рост отрезков осевых органов растений была сконструирована специальная камера, состоящая из двух ячеек, в одну из которых помещался растительный объект, а из другой ячейки с помощью полоски фильтровальной бумаги на верхний срез отрезка подавался раствор заданного состава. Постоянный электрический ток через растительные ткани пропускаться с помощью платиновых электродов, смонтированных в стенки ячеек камеры. Показания усилителя биоэлектрических потенциалов и механотронного преобразователя регистрировались на самописце.

Нам удалось установить, что пропускание через отрезки колеоптилей кукурузы в продольном направлении электрического тока силой от 1 до 6 мкА повышает скорость удлинения колеоптилей только в том случае, когда к их апикальной части подводился анод (рис. 60). При изменении направления тока (катод у апикальной части колеоптиля) значительных изменений в скорости роста не наблюдалось. Активирующий эффект проявлялся в среднем с лаг-периодом 2,5 мин и возрастал пропорционально величине электрического тока. При выключении тока скорость роста возвращалась к исходной, если ток пропускаться в течение 15 минут. При более длительной поляризации отрезков (в

течение часа и более) скорость роста после его выключения была почти 2 раза выше исходной. Аналогичное действие электрический ток оказывал на рост в длину отрезков междоузлий гороха. Ростстимулирующий эффект электрического тока проявлялся в большей степени у колеоптилей, декапитированных на 1 мм ниже верхушки, чем у колеоптилей, декапитированных на 4 мм. Этот факт косвенно свидетельствует о зависимости действия электрического тока на рост от уровня ИУК в ткани, поскольку в колеоптилях ауксин, как правило, продуцируется клетками, находящимися в верхушке.

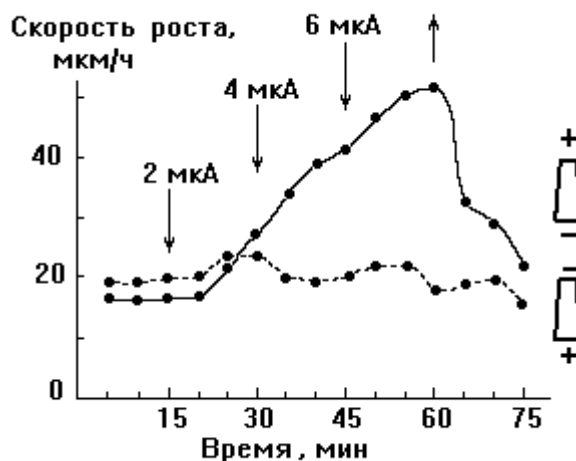


Рис.60. Действие постоянного электрического тока на рост в длину отрезков колеоптилей кукурузы. Стрелками показаны моменты включения (↑) и выключения тока (↓).

Существует предположение, что поляризация отрезков осевых органов растений влияет на активность мембранных белков-переносчиков ауксина, участвующих в процессе активного транспорта этого фитогормона по тканям. В таком случае ингибиторы транспорта ауксина должны подавлять стимулирующее действие электрического тока на рост. Действительно, как видно из рис. 61, нафтилфталамовая (НФК) и триодбензойная (ТИБК) кислоты, а также хелатор ионов кальция ЭГТА, которые угнетают полярный транспорт ауксина, подавляли также и стимулирующее действие электрического тока на рост в длину отрезков междоузлий гороха. Аналогично эти соединения влияли и на ростстимулирующий эффект электрического тока у отрезков колеоптилей кукурузы.

Процесс дальнего транспорта ауксина происходит как по апопласту, так и с участием мембранных переносчиков этого фитогормона. В плазмалемме клеток колеоптилей и корней кукурузы обнаружен сайт, связанный с транспортом ИУК и чувствительный к ТИБК и НФК. Предположительно этот белок участвует в процессе выделения из клеток ионизированной формы ИУК (ИУК<sup>-</sup>). Помимо этого НФК-чувствительный переносчик ауксина может принимать участие в регуляции мембранного транспорта ионов  $Ca^{2+}$ , а также в фото- и гравитропической реакции.



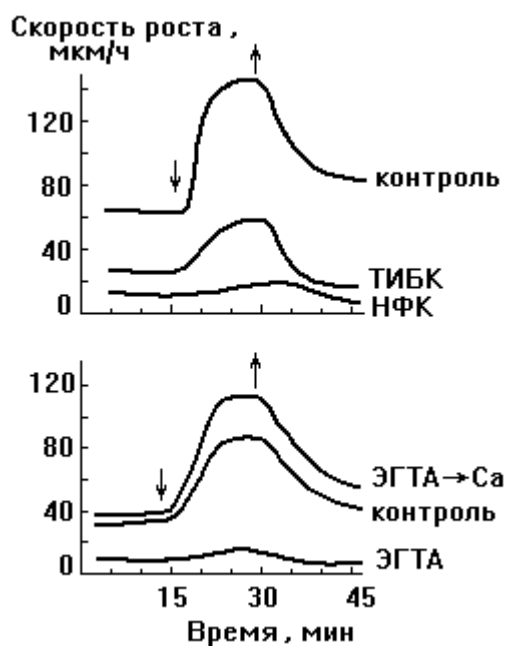


Рис.61. Влияние триодбензойной и нафтилфталамовой кислот, а также ЭГТА на рост отрезков междоузлий гороха под действием электрического тока (6 мкА, анод у апикальной части).

Таким образом, ускорение роста в длину отрезков осевых органов растений под действием электрического тока может быть связано с изменениями в работе системы активного базипетального транспорта ИУК. В таком случае под действием электрического тока должен меняться процесс транспорта этого фитогормона. Поскольку добавление кальция в инкубационную среду отрезков, предобработанных ЭГТА, восстанавливало активирующий эффект тока (см.рис. 61), то можно предположить, что для проявления действия электрического тока на рост необходимы также и ионы  $Ca^{2+}$ .

Уровень ауксина и его передвижение в растении имеют решающее значение в процессах поляризации и дифференциации клеток и тканей. Градиенты концентрации ИУК, создавая позиционную информацию, действуют как мощнейший морфогенетический фактор, а процесс активного передвижения этого фитогормона в базипетальном направлении является основным фактором, обеспечивающим формирование осей симметрии у высших растений.

Идея о возможности перемещения ауксина от мест синтеза к зонам роста за счет разности электрических потенциалов впервые была высказана еще в 1932 г. Холодным и Вентом (Went) и послужила основой разработанной ими теории тропизмов. Однако, как мы уже отмечали, постоянно появляются данные, которые не могут быть объяснены в рамках этой гипотезы.

В табл.7 и на рис. 62 приведены результаты наших опытов, в которых изучалось действие электрических градиентов на транспорт меченого ( $^{14}C$ -ИУК) и эндогенного (диффузионного) ауксина в отрезках колеоптилей кукурузы. Было обнаружено, что, если к апикальной части отрезков подводился анод, скорость базипетального потока  $^{14}C$ -ИУК возрастала (см. табл. 7). В том случае, когда апикальная часть колеоптилей была заряжена отрицательно, передвижение ауксина в базипетальном направлении шло слабее. Следовательно, электрический ток ускоряет передвижение меченого фитогормона к катоду, что противоречит электрофоретическому механизму транспорта ИУК согласно представлениям Холодного и Вента.

Таблица 7. Распределение  $^{14}\text{C}$ -ИУК вдоль отрезков колеоптилей кукурузы под действием электрического тока (6 мкА) в течение 40 мин. (+) или (-) - знак потенциала апикальной части

Сегменты	Распределение $^{14}\text{C}$ -ИУК, имп/(мин·сегм)		
	Контроль	+	-
1-апикальный	1200±160	1120±130	630±120
2	670±130	800±290	530±90
3	70±20	240±180	30±10
4	0	180±60	0

В отрезках колеоптилей кукурузы, которые были предобработаны ингибиторами полярного транспорта ауксина НФК и ТИБК, стимулирующий эффект электрического тока на транспорт  $^{14}\text{C}$ -ИУК не проявлялся. Изучение действия электрического тока на транспорт эндогенной ИУК (анализируемой с помощью твердофазного иммуоферментного метода) показало, что при электростимуляции возрастает количество ауксина, секретируемого отрезками колеоптилей кукурузы в базипетальном направлении (рис.62). Таким образом, внешнее электрическое поле влияет на процессы базипетального транспорта, экзогенной  $^{14}\text{C}$ -ИУК, и эндогенного ауксина. В обоих случаях пропускание через растительную ткань электрического тока стимулирует транспорт ИУК в направлении отрицательно заряженного электрода, что не может быть объяснено в рамках теории тропизмов Холодного-Вента.

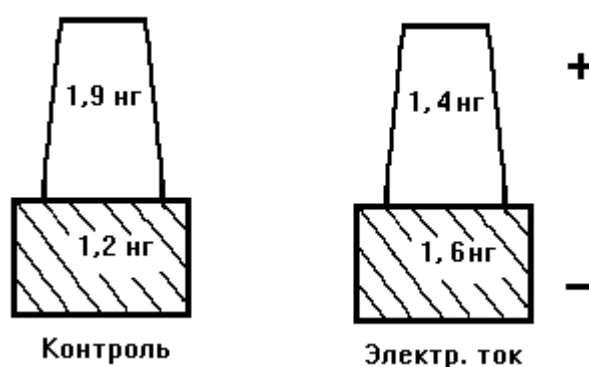


Рис.62. Влияние постоянного электрического тока (6 мкА) на секрецию (за 1,5 ч) ИУК базальным участком колеоптиля кукурузы.

Goldsworthy и Rathore изучали действие электрического тока силой 1-2 мкА на рост и дифференциацию каллуса табака и обнаружили, что если каллусная ткань заряжена отрицательно и в среде присутствует ИУК, то ускоряются закладка, формирование и рост побегов. Вероятно, как и в наших опытах, электрический ток стимулировал транспорт ИУК из среды к отрицательно заряженному каллусу и активировал его морфогенез. Эти факты также не укладываются в схему электрофоретического механизма транспорта ИУК согласно гипотезе Холодного-Вента. Поскольку стимулирующий эффект электрического тока на развитие каллуса табака подавлялся ингибитором полярного транспорта ауксина ТИБК, можно допустить, что активирующий эффект электрического тока на дифференциацию клеток каллуса тоже опосредован изменениями в работе системы полярного транспорта ИУК.

Нами было высказано предположение, что и нативные, и приложенные извне электрические градиенты способны влиять на работу мембранных белков-переносчиков ауксина, изменяя их активность или локализацию в плазматической мембране, что и является причиной изменения параметров активного базипетального транспорта ИУК. Тот факт, что ингибиторы полярного транспорта ауксина НФК и ТИБК способны подавлять стимулирующий эффект электрического тока на рост и транспорт  $^{14}\text{C}$ -ИУК, подтверждает предположение о том, что поляризация осевых органов растений

электрическим током влияет на функционирование системы полярного транспорта ИУК.

Для объяснения механизма мембранного полярного транспорта ауксина часто используют "хемиосмотическую" гипотезу, предложенную Rubery и Shelldrake в 1974 г. Суть ее заключается в следующем: ИУК как слабая кислота (рК 4,7) в слабокислой среде клеточных стенок и межклетников находится в основном недиссоциированном состоянии. За счет липофильных свойств недиссоциированная молекула ауксина способна проникать в клетку по градиенту концентрации и градиенту рН. Попав в цитоплазму, рН которой, как правило, имеет слабощелочное значение, большая часть молекул ИУК диссоциирует с отщеплением протона (рис.63). По мере накопления гормона в цитоплазме создается градиент его концентрации, по которому анион ИУК<sup>-</sup> будет стремиться покинуть клетку. Однако анионы ИУК<sup>-</sup>, практически нерастворимые в липидах, уже не смогут свободно диффундировать через плазмалемму. Выведение ионизированной формы гормона из клетки осуществляется специфическими белками-переносчиками, которые сконцентрированы в базальной части мембраны растительной клетки, что обеспечивает транспорт ауксина преимущественно в базипетальном направлении. Однако при этом остается неясным механизм асимметричного распределения переносчиков ауксина в клеточной мембране. Мы предположили, что эта асимметричность обусловлена локальными градиентами электрических потенциалов, в соответствии с их суммарным электрическим зарядом (см.рис. 63).

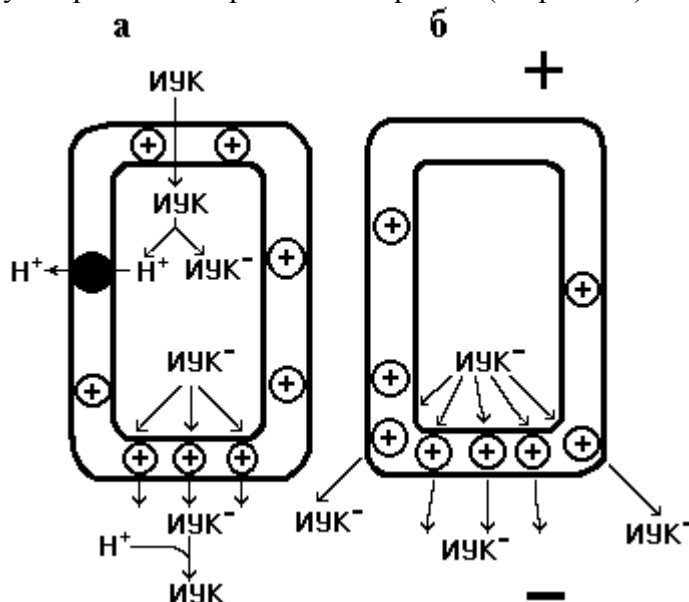


Рис.63. Возможный механизм действия электрических полей на процесс полярного транспорта ИУК. а - контроль; б- клетка в электрическом поле.

Мембранные белки имеют высокую подвижность и постоянно перемещаются в латеральном направлении. В мембранах нативных клеток из-за наличия цитоскелета скорости латеральной диффузии, по-видимому, гораздо ниже. Для латерального передвижения белков в мембранах достаточно незначительных градиентов БЭП, которые возникают в процессе основной жизнедеятельности клетки. Выявлено, например, что латеральная диффузия идет уже при градиенте потенциалов в 0,8 - 40 мВ на клетку. В растительных, а также в животных клетках и тканях зарегистрированы градиенты потенциалов от 20 до 60 мВ и электрические токи в пределах от 0,1 до 10 мкА/см<sup>2</sup>.

В плазмалемме клеток колеоптилей кукурузы обнаружены белки, связывающиеся с ауксином, которые предположительно имеют суммарный положительный заряд. В электрическом поле эти белки должны перемещаться в сторону отрицательно заряженных участков клетки. Если апикальные части клеток заряжены положительно, а базальные - отрицательно, эти белки (переносчики ауксина ?) будут концентрироваться

на базальной части каждой клетки, транспортирующей ИУК (рис.63.б). В результате должна возрасти скорость базипетального транспорта ауксина. Именно такое направление электрического тока вызывало активацию полярного транспорта ИУК и стимулировало рост растяжением (см.табл.7. и рис.60 и 62). Поэтому действие электрических полей на растительные организмы может быть опосредовано изменением активности (локализации в клетке) мембранных белков, обеспечивающих базипетальный транспорт ауксина. Вероятно, именно таким образом электрические градиенты способны контролировать распределение ИУК в растении и регуляцию процессов роста и развития.

## Глава 6.

### **ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ХЛОРОПЛАСТАХ И МИТОХОНДРИЯХ**

Одним из свойств, характерных для фотосинтезирующих тканей растения, является способность реагировать на световое воздействие изменением электрического потенциала. Методика наблюдения этих эффектов весьма проста. неполяризующийся электрод через солевой мостик подводится к фотосинтезирующим тканям растения, электрод сравнения прикладывается либо к нефотосинтезирующим органам (корень), либо к участкам, постоянно находящимся в затененном состоянии (отдельные участки стебля и черешка листа). Электроды соединяются с усилителем постоянного тока и регистрирующим устройством.

#### **1.Светозависимая электрическая реакция растительных клеток и тканей**

Впервые светозависимую биоэлектрическую реакцию растений обнаружил в 1925 г. Waller. Он изучил несколько десятков видов растений и установил, что все растения реагируют на включение света. Светоиндуцированные электрические реакции регистрировались не только в листьях, но и в других органах растения, содержащих хлорофилл. В определенных условиях различные растения отвечали на включение света однотипными реакциями, хотя форма этих реакций могла иметь существенные видовые различия. Другие типы воздействий (например, колебания температуры, изменения газового состава среды, механические стимулы) не могли вызвать электрическую реакцию, инициируемую включением света. Чувствительность клеток листа к световому воздействию превосходит его чувствительность к любым другим факторам внешней среды.

Для возникновения электрического ответа достаточно 5%-ного изменения исходной освещенности. На рис. 64 показана электрическая реакция листьев бобов и кукурузы в ответ на включение света мощностью  $0,5 \text{ Вт/м}^2$ , полученная в экспериментах Рыбина с сотр. Освещение вызывает многофазный (как правило, трехфазный) переходный процесс, начинающийся с отклонения БЭП листа в область положительных значений. Амплитуды трех фаз реакции обозначены как  $E^c_1$ ,  $E^c_2$  и  $E^c_3$ . (Индекс "с" означает что параметр относится к реакции на включение света. Для обозначения аналогичных параметров электрической реакции в ответ на выключение света используют индекс "т"). При варьировании интенсивности освещенности изменяется амплитуда всех трех фаз реакции, однако число колебаний и их полярность, как правило, не меняются.

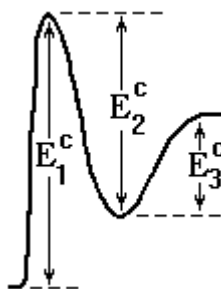


Рис.64. Электрическая реакция листьев растений в ответ на включение света (Рыбин и др., 1980).

Изменение электрических характеристик листа при освещении, механизм светозависимой биоэлектрической реакции связаны прежде всего с фотоактивацией пигментных систем. На спирогире к моменту деления удалось собрать хлоропласты в одной из половинок клетки таким образом, что после деления одна из дочерних клеток содержала хлоропласты, а другая нет. Светоиндуцированные колебания электрических потенциалов обнаруживались только в клетке, которая содержала хлоропласты. У фотосинтетических мутантов, содержащих белые клетки, электрическая реакция на освещение не регистрировалась. Наиболее эффективным было воздействие монохроматическим светом, совпадающим с максимумами поглощения хлорофиллов, содержащихся в I и II фотосистемах. Группой Рыбина было обнаружено два максимума (в красной и синей части спектра), наиболее эффективных для индукции светозависимой электрической реакции. Коротковолновый максимум у всех трех фаз реакции ( $E_1^c$ ,  $E_2^c$  и  $E_3^c$ ) совпадал и составлял 435 нм. Положение же максимума в красной части спектра для каждой из трех фаз электрической реакции отличалось и регистрировалось соответственно на длинах волн 680, 710 и 650 нм.

Новак и Иванкина выделили две компоненты электрической реакции на свет. Одна из них, формирующая первую позитивную волну, имела спектральный максимум 680 нм и подавлялась диуроном. Другая, связанная с негативацией потенциала листа, оказалась нечувствительной к диурону и имела спектральный максимум на длине волны 710 нм. Обработка кофактором циклического фотофосфорилирования феназинметасульфатом при подавлении ДХММ II фотосистемы вызывала повышение амплитуды 2-й фазы ( $E_2^c$ ) электрической реакции растения на свет. Поэтому можно предположить, что 1-й компонент реакции ( $E_1^c$ ) связан с участием II фотосистемы, а 2-й компонент ( $E_2^c$ ), вероятно, является результатом активации светом I фотосистемы.

Изучение светозависимой биоэлектрической реакции с помощью микроэлектродной техники показало, что изменение мембранного потенциала клетки при освещении и затенении носит 2-3 фазный характер и продолжается 20-40 мин. Освещение в большинстве случаев вызывает деполяризацию (в течение 2-3 мин) мембранного потенциала, за которой следует гиперполяризация (10-15 мин), сменяющаяся фазой перехода в нормальное световое состояние. По сравнению с темнотой, на свету зеленая клетка обычно находится в гиперполяризованном состоянии, при этом мембранный потенциал может достигать достаточно больших значений. Так, например, Лялин при варьировании уровня освещенности и рН у клеток элодеи регистрировал мембранный потенциал -400 мВ. У обычных клеток потенциал покоя варьирует от -160 до -200 мВ.

## 2. Методы исследования фотоэлектрических процессов в хлоропластах

Первичные стадии фотосинтеза связаны прежде всего с преобразованием энергии света в энергию АТФ и восстановленного НАДФ в системе внутренних мембран хлоропластов (тилакоидах). При этом в процессе трансформации световой энергии в химическую наиболее важным промежуточным этапом является создание ионных градиентов и потенциала на мембране тилакоида. Электрические процессы и связанное с ними перемещение ионов между тилакоидом и стромой влияют на скорость транспорта электронов в электронтранспортной цепи хлоропластов, на активность АТФазы и некоторых ферментов, связанных с фиксацией углекислоты, а также являются механизмом, за счет которого энергия света перераспределяется между двумя фотосистемами. Изучение фотоэлектрических процессов в хлоропластах может дать информацию о транспорте  $H^+$ , ионных потоках и проводимости мембраны тилакоидов и хлоропластов, распределении ионов между тилакоидами и стромой на свету, роли двух фотосистем в генерации локальных и делокализованных полей в фотосинтетических мембранах. Рассмотрим методы изучения фотоэлектрических процессов в хлоропластах.

При измерении мембранного потенциала очень часто применяют оптические, например флуоресцентные зонды. Для широкого круга биологических объектов наиболее подходящими потенциалзависимыми зондами являются мероцианиновые и оксоноловые красители. При изменении мембранного потенциала происходят изменение интенсивности флуоресценции и сдвиг максимума поглощения красителей. Для измерения мембранного потенциала хлоропластов могут быть использованы оксоноловые красители и, в частности оксонол-6. Фотоиндуцированные ответы этого зонда в хлоропластах в условиях длительного освещения совпадают по кинетике с изменениями потенциала, регистрируемого с помощью микроэлектродов.

Второй способ исследования электрических процессов заключается в регистрации электрохромных изменений абсорбции хлоропластов в области 520 нм. Принцип метода состоит в том, что сильные электрические поля способны сдвигать спектр поглощения пигментов, при этом происходит переход одного из электронов в молекуле красителя в возбужденное состояние и, как следствие, изменение положения спектра поглощения этого вещества. Под действием электрических полей напряженностью  $10^5$  В/см электрохромный сдвиг спектров поглощения красителей варьирует от долей нм до нескольких нм. В электрическом поле встроенные в мембрану фотосинтетические пигменты служат как бы своеобразными молекулярными вольтметрами. При регистрации абсорбции на фиксированной длине волны электрохромный сдвиг будет проявляться в виде изменения величины абсорбции пигментов. В определенных пределах зависимость между амплитудой изменения поглощения света длиной волны 520 нм и напряженностью электрического поля в мембране носит линейный характер и поэтому может быть использована для измерения мембранного потенциала. Напряженности электрического поля  $10^5$  В/см, характерной для биологических мембран при их толщине  $100 \text{ \AA}$  и мембранном потенциале 100 мВ, также вполне достаточно для наблюдения электрохромного эффекта, поскольку электрохромный сдвиг при этом может достигать десятков нм.

Наиболее прямым способом измерения мембранного потенциала является микроэлектродный метод. Первые измерения мембранного потенциала хлоропластов были выполнены на гигантских пластидах клеток листа *Peperomia metallica* московскими биофизиками Булычевым, Андриановым, Куреллой и Литвиным. В своих опытах они использовали стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика 0,1 - 0,3 мкм, заполненные KCl или холинхлоридом. Разность потенциалов между микроэлектродом, введенным в хлоропласт, и электродом сравнения, помещенным в цитоплазму (или во внешний раствор), регистрировалась быстродействующим усилителем, соединенным с осциллографом, что позволяло следить за процессами внутри клетки с интервалом

времени  $10^{-4}$  с. С помощью этого метода были также изучены фотоэлектрические процессы на хлоропластах водоросли *Spirogyra* и печеночного мха *Anthoceros*.

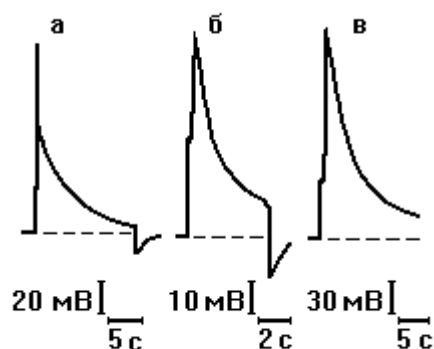


Рис.65. Фотоэлектрические изменения потенциала, измеренного микроэлектродами, на хлоропластах *Peperomia metallica* (а) и *Anthoceros* (б), а также предполагаемая кинетика электрического потенциала на тилакоидной мембране (в) [Булычев и др., 1980].

Электрические реакции на включение света имели сходную кинетику и отличались лишь в деталях (рис. 65). Включение света вызывало смещение потенциала в положительную сторону на 30-70 мВ (иногда до 120 мВ) в течение 20-200 мс и последующее медленное (секунды) уменьшение потенциала до нового стационарного уровня. При удачном введении микроэлектрода фотоэлектрическую реакцию удавалось регистрировать с хорошей воспроизводимостью в течение 10-20 мин. Булычев с соавт. считают, что регистрируемые ответы отражают реальную картину изменений разности потенциалов на тилакоидной мембране, так как существует высокая вероятность попадания кончика микроэлектрода в ламеллярную систему. Фотогенерация электрического потенциала происходит без латентного периода, имеет высокую скорость и обнаруживает тесную связь с работой двух фотосистем. Совпадение величин мембранного потенциала, измеренных микроэлектродами и другими методами, а также совпадение кинетики изменения мембранного потенциала и электрохромных изменений поглощения света при 520 нм свидетельствуют о том, что электрическая утечка в тилакоидной мембране при тщательной постановке опыта с микроэлектродами, вероятно, незначительна.

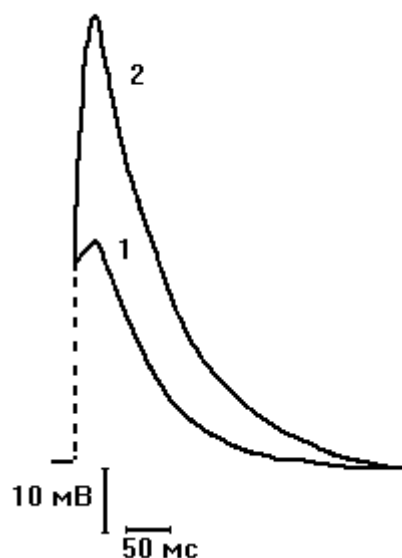


Рис.66. Изменения электрического потенциала в хлоропластах листа *Peperomia metallica*, индуцируемые вспышкой длительностью 80 мкс (1) и световым импульсом продолжительностью 20 мс (2) [Булычев и др., 1980].

Те же авторы исследовали изменения мембранного потенциала хлоропластов *Peperomia metallica*, индуцируемые короткими (80 мкс) и относительно длинными (20 мс) вспышками света (рис.66). Амплитуда ответа при длительном освещении в 2-3 раза больше, чем при короткой вспышке, которая, по-видимому, вызывает однократное срабатывание реакционных центров. Кинетика фотоэлектрического процесса, индуцируемого короткой вспышкой, имеет три фазы: 1) быстрое нарастание потенциала (в пределах 200 мкс); 2) медленное нарастание потенциала в темноте или поддержание его на одном уровне (20 мс); 3) медленный темновой спад потенциала со временем ( $t/2 = 50 - 200$  мс). Нарастание потенциала при длительном освещении включает две стадии: быструю (1 мс) и относительно медленную (20-200 мс), после чего потенциал медленно уменьшается до стационарного уровня (+ 10 мВ). При этом фаза уменьшения потенциала коррелирует во времени с образованием трансмембранного градиента рН.

При импульсном освещении хлоропластов электрохромное увеличение поглощения в области 520 нм протекает за 3-20 нс. За это время происходит разделение зарядов в реакционном центре, и появляются локальные электрические поля в мембране, которые преобразуются в трансмембранную разность электрических потенциалов между тилакоидом и стромой за время, составляющее в среднем 10 мс.

### **3.Методы изучения электрохимических процессов в митохондриях**

Разность электрохимических потенциалов ионов водорода ( $Dm_H^+$ ) на сопрягающих мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий выполняет функцию основного высокоэнергетического интермедиата в окислительном и фотофосфорилировании. В митохондриях и бактериях основной вклад в величину  $Dm_H^+$  дает разность электрических потенциалов между водными фазами, разделенными сопрягающей мембраной. На митохондриях, окисляющих субстрат, может возникать разность электрических потенциалов порядка 200 мВ.

Для измерения мембранного потенциала митохондрий очень эффективен метод проникающих ионов. Этот метод в некотором смысле является прямым, поскольку разность электрических потенциалов - это работа по переносу единичного пробного заряда между двумя точками. В методе проникающих ионов в качестве пробных зарядов используются некоторые синтетические катионы и анионы (рис. 67), работа по переносу зарядов которых оценивается по изменению их концентрации снаружи митохондрий. У энергизованных митохондрий, заряженных внутри отрицательно, проникающие катионы входят внутрь, а анионы выбрасываются наружу.



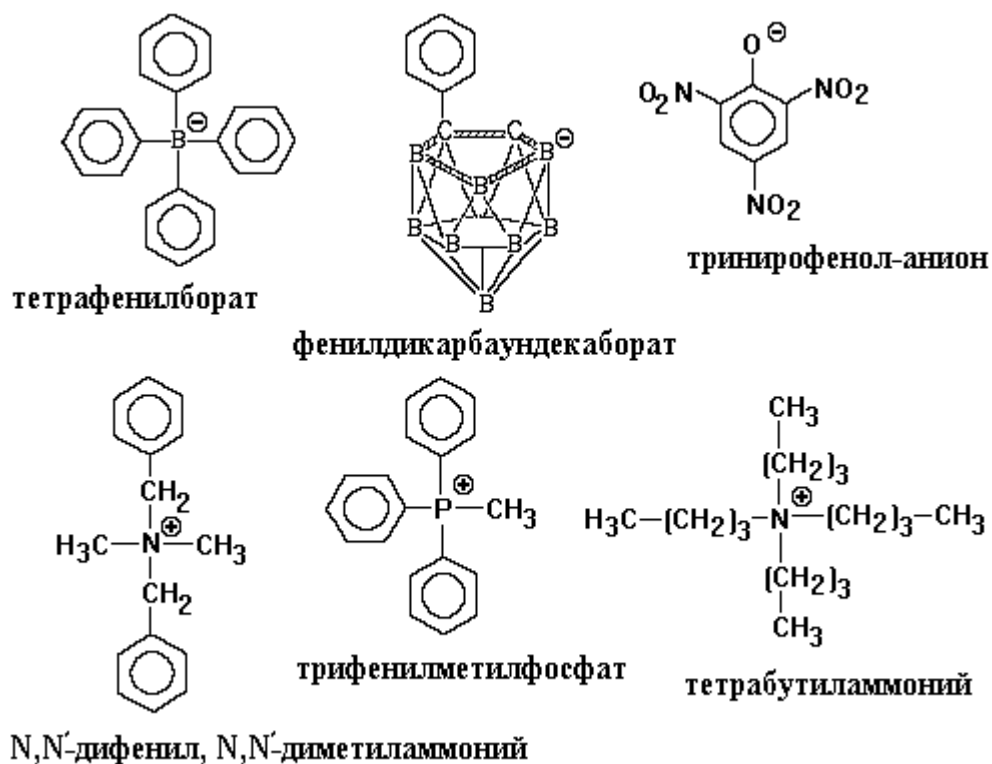


Рис.67. Некоторые типы синтетических проникающих ионов.

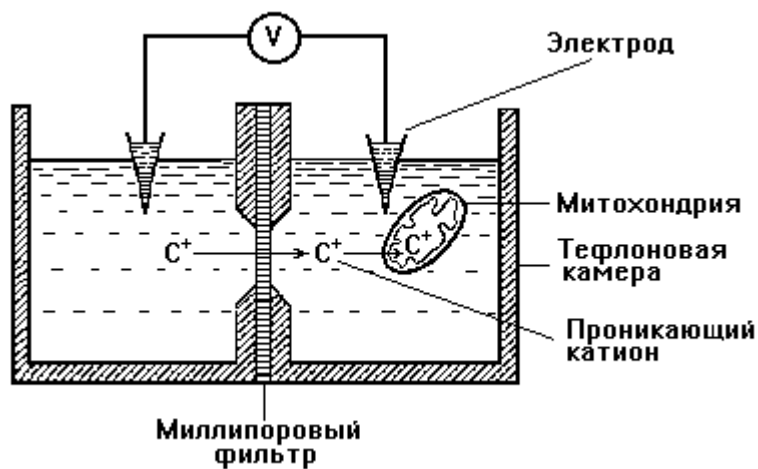


Рис.68. Установка для измерения мембранного потенциала митохондрий методом проникающих ионов [Либерман и др., 1969].

Для измерения концентрации проникающих ионов можно использовать фосфолипидную мембрану, которая для них является идеальным селективным электродом. Такая мембрана для проникающих анионов уже при концентрации  $10^{-8}$  моль/л и десятикратном изменении их содержания в растворе согласно уравнения Нернста (5) дает потенциал около 60 мВ. Катионы проникают через обычные фосфолипидные мембраны хуже, однако и для них можно подобрать такие мембраны, что уравнение (5) начнет выполняться при концентрации катионов порядка  $10^{-6}$  моль/л. В качестве проникающего аниона можно использовать, например, фенилдикарбаундекаборан (ФКБ<sup>-</sup>), а проникающих катионов - тетрафенилфосфоний (ТФФ<sup>+</sup>) или калий в присутствии валиномицина. ТФФ<sup>+</sup> очень удобен для определения мембранного потенциала, так как его концентрация снаружи митохондрий аккуратно

измеряется даже если она составляет  $10^{-7}$  моль/л. При этом, если мембранный потенциал митохондрий равен около -200 мВ, концентрация ТФФ<sup>+</sup> в матриксе может достигать  $10^{-4}$  моль/л. На рис.68 приведена схема установки, которая была использована Либерманом с коллегами для измерения мембранного потенциала митохондрий ( $E_{\text{МТХ}}$ ). Для этого надо знать разность потенциалов на измерительной мембране ( $E_{\text{ИЗМ}}$ ), а также отношение суммарного объема митохондрий к объему окружающей среды ( $\alpha$ ). Либерман приводит уравнение для расчета  $E_{\text{МТХ}}$ :

$$E_{\text{МТХ}} = E_{\text{ИЗМ}} + \frac{RT}{F} \ln \alpha - \frac{RT}{F} \ln \left( 1 + \alpha - e^{E_{\text{ИЗМ}}F/RT} \right). \quad (21)$$

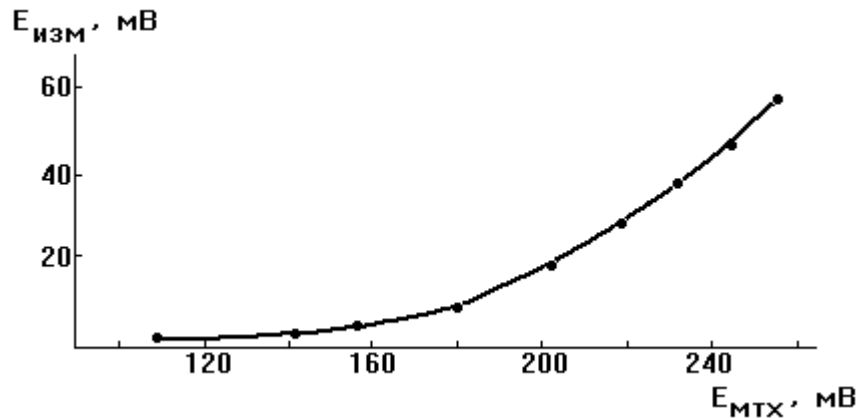


Рис.69. Зависимость разности потенциалов на измерительной мембране ( $E_{\text{ИЗМ}}$ ) от разности потенциалов на митохондриальной мембране ( $E_{\text{МТХ}}$ ) при  $\alpha = 5 \cdot 10^{-4}$ .

Перед экспериментом необходимо проводить калибровку, т.е. построив зависимость  $E_{\text{ИЗМ}}$  от  $E_{\text{МТХ}}$  при определенном значении  $\alpha$ . Как видно из рис. 69, при  $\alpha$  равном  $5 \cdot 10^{-4}$  метод мало чувствителен, если  $E_{\text{МТХ}}$  меньше 140 мВ. Определяя  $E_{\text{ИЗМ}}$  при разных концентрациях митохондрий в измерительной ячейке и сопоставляя данные эксперимента с этими кривыми, можно рассчитать  $E_{\text{МТХ}}$  и  $\alpha$ . На рисунке 70 представлены результаты непосредственного измерения мембранного потенциала митохондрий при их энергизации и обработке ингибиторами в случае проникающего катиона ТФФ<sup>+</sup> и проникающего аниона ФКБ<sup>-</sup>.

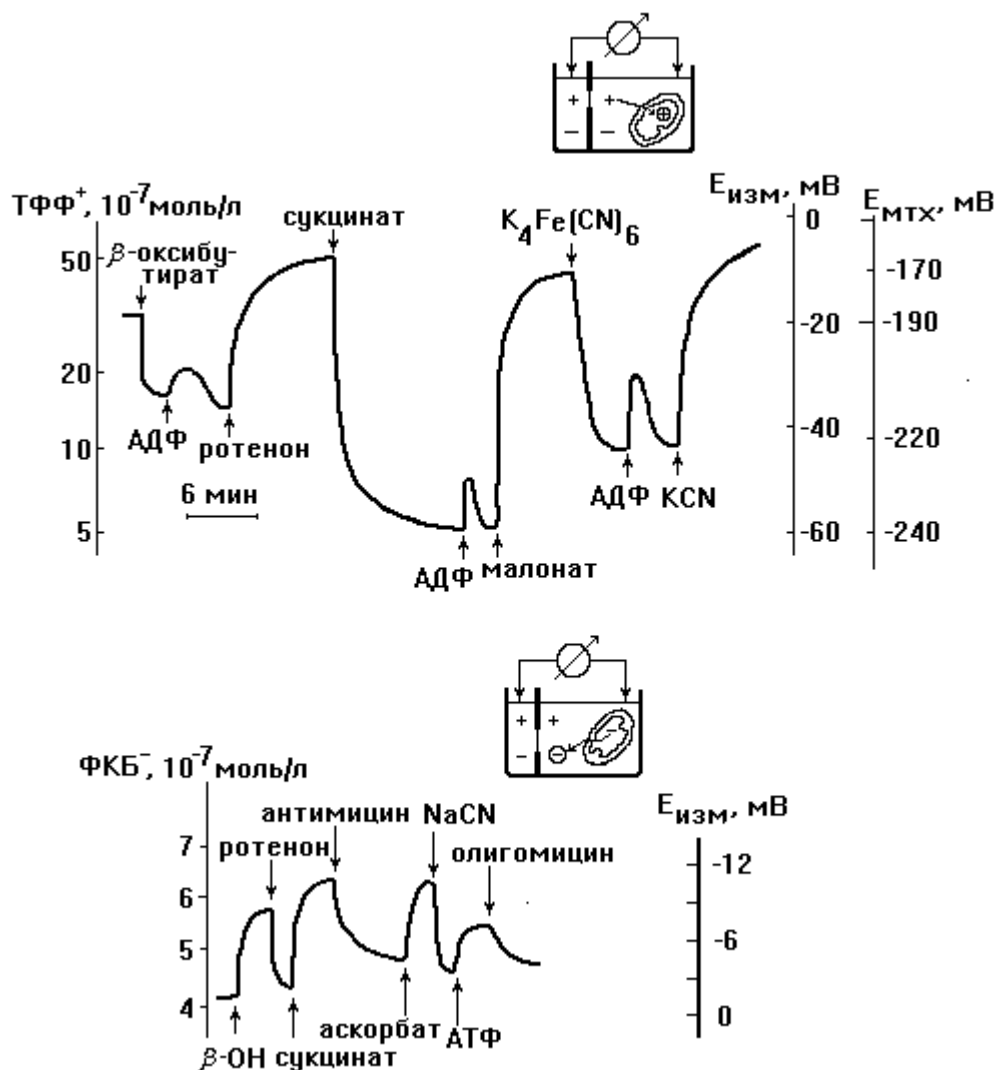


Рис.70. Изменение концентрации проникающих катионов ( $TFF^+$ ) и анионов ( $FKB^-$ ), а также разности потенциалов на измерительной мембране ( $E_{изм}$ ) при энергизации и ингибировании митохондрий.

В последующих работах группам Скулачева и Либермана удалось встроить искусственные фосфолипидные пузырьки - липосомы, инкрустированные ферментами, способными генерировать мембранный потенциал, в плоскую искусственную мембрану и измерить разность электрических потенциалов, возникающую между растворами, разделенными этой мембраной. В качестве такой мембраны оказались удобными тефлоновые фильтры, пропитанные смесью фосфолипидов в декане. Результаты этих измерений хорошо совпадали с данными, полученными методом проникающих ионов. Однако при анализе функционирования субмитохондриальных частиц электрометрический метод имеет несомненные преимущества по сравнению с методом проникающих ионов. Во-первых, появляется возможность зарегистрировать быструю кинетику образования и спада мембранного потенциала, поскольку скорость диффузии проникающих ионов сильно ограничивает возможности регистрирующей системы. И, во-вторых, этот метод позволяет контролировать вклад в мембранный потенциал конкретных участков электротранспортной цепи митохондрий только тех ферментов окислительного фосфорилирования, которые встроены в мембрану.

## **ИМПУЛЬСНАЯ ФОРМА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ**

Любой, даже самый примитивный организм может ответить на самые разнообразные изменения в окружающей среде каким-либо действием, причем это действие будет в том или ином отношении полезно для организма и в конечном итоге направлено на поддержание его существования. В простейшем случае это будет уход от грозящей опасности, какая-то защитная реакция или стремление к благоприятным условиям. У простейших эта реакция проявляется в виде таксисов, у растений - в виде тропизмов, у животных организмов - в форме рефлексов.

### **1. Процессы раздражимости и возбудимости у растений**

Способность реагировать на изменения в среде полезными для себя действиями - древнейшее свойство всякой живой системы, ибо без этих способностей никакой организм не смог бы существовать. С другой стороны, это свойство является одним из отличительных признаков живой материи от неживой. Живые системы способны реагировать на очень многие изменения в среде, но не на все, к тому же эти изменения должны обладать определенной степенью интенсивности, называемой порогом действия.

Изменения окружающей среды, оцениваемые живой системой, называются раздражителями. Раздражения могут исходить как из внешней среды, так и от внутренней - других клеток, тканей и органов. Однако во всех случаях раздражения будут внешними по отношению к конкретной клетке или органу. В качестве раздражителей могут выступать свет, гравитация, температура, различные химические вещества, влажность, электромагнитные поля и т.д. Павлов писал, что возбуждение представляет собой процесс преобразования внешней энергии, происходящий в клетке под влиянием внешних раздражителей. То состояние, в которое приходит структура живого организма под действием раздражителей, называется возбудимостью. Клетки, группы клеток или отдельные белковые структуры, обладающие повышенной чувствительностью к определенным видам раздражителей, обусловленной особенностью их строения, называются рецепторами.

Явление раздражимости и возбудимости, с одной стороны, лежит в основе взаимодействия организма как целой системы с элементами его внутренней среды, а с другой - определяет реакцию организма на внешние факторы. Поэтому свойство раздражимости и возбудимости обеспечивает и целостность растительного организма, и его адекватную реакцию на изменения факторов внешней среды. Свойством возбудимости обладает цитоплазма любых клеток. В реакции организма на изменения в среде можно выделить три стадии: 1) возникновение возбуждения в месте действия раздражителя, 2) передача возникшего возбуждения к месту реализации ответной реакции и 3) сама ответная реакция. У простейших организмов и растений вторая или третья стадия может отсутствовать.

Дарвин считал, что свойство раздражимости также присуще растениям, как и животным организмам. Он писал, что у всех растений имеется раздражимая система, которая перерабатывает и передает все внешние раздражения другим частям организма. В течение последних 20 лет жизни Дарвин изучал вопросы раздражимости у насекомоядных и лазящих растений, а также в ходе грави- и фототропической реакции. Он обнаружил, что у растений имеются рецепторные органы и ткани (кончики корня и

колеоптиля, усики, железистые волоски или щупальца, определенные участки листа и стебля), от которых раздражения передаются к эффекторам.

В ответ на любое раздражение специализированная клетка, ткань или орган реагируют неспецифически, то есть реакциями, являющимися основными функциями этих образований. Насонов отмечал, что признаками возбужденного состояния клеток являются отрицательный электрический заряд, всегда появляющийся на поверхности возбужденного участка по отношению к невозбужденному; освобождение и выход из клеток некоторых ионов (например калия); резкая активация (в ряде случаев) обмена веществ, сопровождающаяся повышением температуры. Однако точно такие же изменения наблюдаются и при повреждении клетки: помутнение и увеличение вязкости цитоплазмы, коагуляция и желатинизация содержащихся в ней коллоидов, возрастание способности цитоплазмы и ядра связывать различные красители, которые начинают концентрироваться в неживых участках клетки. Насонов называл эти признаки повреждения (или возбуждения) термином "паранекроз". Неповрежденные клетки слабо связывают различные красители. При повреждении способность красителей (например, метиленовой сини, нейтрального красного) проникать в ткани резко повышается, при слабых нарушениях эти изменения обратимы.

Наиболее общим и постоянным показателем возбуждения являются существенные ионно-структурные изменения клеток, которые легче всего зарегистрировать по изменению их электрических свойств, появлению потенциалов или токов действия. Введенский полагал, что существует своеобразная форма ответной реакции на внешнее воздействие, которую необходимо рассматривать как наиболее общую и первичную реакцию всех живых организмов на изменения окружающей среды, - парабиоз. Эта реакция представляет собой стойкое стационарное возбуждение, которое не распространяется в виде волны, а медленно развивается в месте действия раздражителя. Парабиотическая реакция возникает в ответ на неадекватные воздействия и подавляется наркотиками. В зависимости от силы раздражителя и специфических свойств клетки потенциалы возбуждения бывают двух типов: местные (локальные, демаркационные) и потенциалы действия. Локальные потенциалы зависят от силы воздействия и распространяются на небольшие расстояния с постепенно уменьшающейся интенсивностью (с декрементом, т.е. с затуханием) по мере удаления от места возникновения.

## **2.Вариабельный потенциал**

Поврежденная часть листа, стебля или корня растения, как правило, приобретает более отрицательный потенциал по отношению к интактным участкам, называемый потенциалом повреждения, демаркационным или вариабельным потенциалом. Его значение варьирует от - 20 до -120 мВ. Особенность этой формы электрической активности растений состоит в зависимости ее от интенсивности внешнего воздействия и быстром затухании при распространении (см. табл. 6). Несмотря на то, что потенциал повреждения у растений носит локальный характер, его петли тока затрагивают большую часть окружающих тканей. Прижигание ограниченного участка листа, например, создает демаркационные токи, которые можно зарегистрировать практически по всей его поверхности.

Вариабельный потенциал по форме отличается от потенциала действия длительной нерегулярной нисходящей ветвью импульса и представляет собой такой тип передачи возбуждения в растениях, распространение которого, по крайней мере частично, поддерживается диффузией некой "раневого" субстанции. Вариабельный потенциал регистрируется в растениях, например, при таких повреждающих воздействиях как разрез, разрыв, разминание, термические и химические ожоги (рис.71).

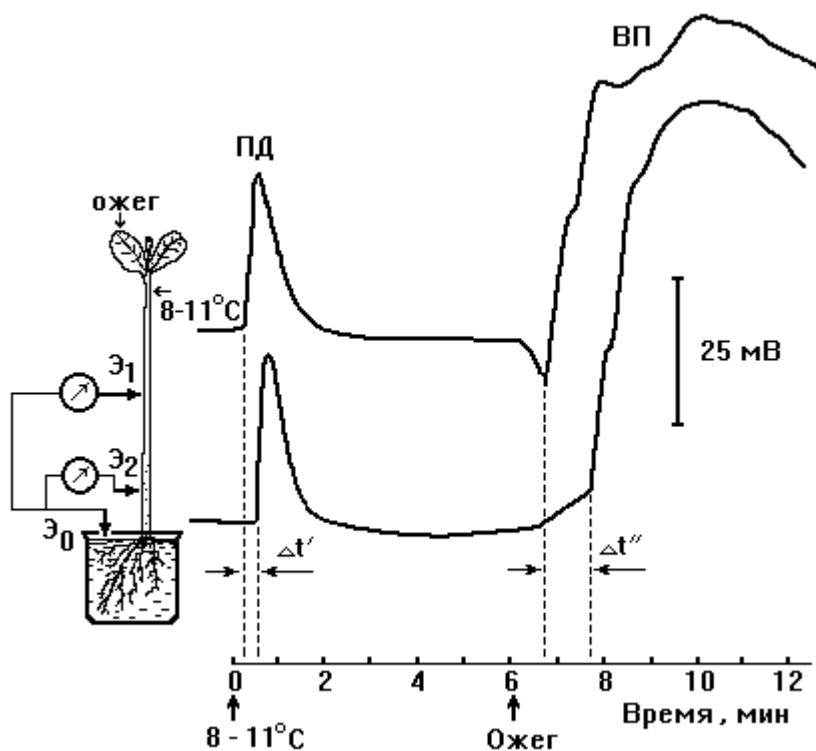


Рис.71. Электрические реакции проростков тыквы на охлаждение и последующий ожог, регистрируемые двумя электродами (Э<sub>1</sub> и Э<sub>2</sub>) [Опритов и др., 1991].  
 Э<sub>0</sub> - электрод сравнения, ПД - потенциал действия, ВП - переменный потенциал.

У животных организмов процесс передачи возбуждения условно можно разделить на два этапа - электрический и химический. Электрический этап передачи возбуждения связан с распространением импульса потенциала действия, а химический - с диффузией определенных химических медиаторов, в ходе которой электрический сигнал трансформируется в химический и реализуется в форме определенной физиологической реакции.

Возможность химического способа передачи возбуждения у высших растений наблюдается в форме переменного потенциала. По сравнению с потенциалом действия переменный потенциал отличается изменчивой формой и амплитудой импульса и описывающая его кривая имеет более пологую форму нисходящей части (см. рис. 71). Он способен возникать в период абсолютной рефрактерности (после появления потенциала действия), характеризуется меньшей скоростью распространения и большей длительностью импульса, достигающей нескольких десятков минут. В определенных пределах амплитуда и длительность переменного потенциала пропорциональны интенсивности или площади повреждения.

Наиболее характерная особенность переменного потенциала связана с его способностью проходить через неживые ткани или через водный раствор. Впервые это явление в 1916 г. обнаружил Рикка. Он считал, что распространяющееся возбуждение у высших растений имеет химическую природу и связано с распространением определенной раневой субстанции, названной впоследствии фактором Рикка. В качестве фактора Рикка могут служить мезоинозитол, некоторые олигосахариды или факторы движения листьев - тургорины, которые некоторыми авторами идентифицируются, как производные бензойной кислоты. Однако реальный механизм формирования, распространения и функциональная роль переменного потенциала пока еще не выяснены. Наиболее обоснованным считается предположение, высказанное известным американским специалистом в области электрофизиологии растений Барбарой Пиккард о том, что повреждение тканей вызывает высвобождение раневого вещества, которое

диффундирует к электровозбудимым клеткам и инициирует потенциал действия, распространяющийся впереди переменного потенциала. Основываясь на этом предположении, электрическая реакция, индуцируемая повреждающими факторами, по-видимому, является комбинацией химической и электрической составляющих процесса возбуждения. Исходя из этого можно полагать, что физиологическая роль переменного потенциала в растении связана с теми ответными реакциями, которые индуцируются в клетках потенциалом действия.

### 3. Потенциал действия

В 1866 г. русский ученый Леваковский обнаружил с помощью неполяризующихся электродов и гальванометра у *Mimosa pudica* наличие электрических токов, похожих на токи в мышцах животных. Однако историю электрических явлений у растений, вероятно, следует начинать с исследований Ломоносова, который еще в 1756 г. ставил опыты с "чувствительной американской травой", раздражая ее "электричеством". Он выяснил, что "раздражение электричеством повышает чувствительность растений к механическому прикосновению". Причем эта чувствительность имеет сродство к электрическому воздействию.

В начале XX века индийский ученый Чандра Бос из Калькутты, закончивший кафедру физики Кембриджского университета, прислал для публикации статью о том, что в проводящих тканях высшего растения могут возникать и распространяться потенциалы действия (ПД), подобные потенциалам действия в нервных волокнах. Полученные Босом результаты были настолько неожиданными, их вначале отказались публиковать, так как не были уверены, что эти данные не могут быть результатами эксперимента, поскольку у растений не может быть системы ответных электрических реакций, как у животных организмов.

В действительности же, Босу впервые с помощью сконструированного им высокочувствительного измерительного оборудования удалось открыть у так называемых чувствительных растений (мимоза, биофитум, десмодиум) быстро распространяющиеся электрические импульсы в ответ на физическое и химическое раздражения. Оказалось, что эти растения не столь уж медлительны в ответных реакциях на внешние воздействия, причем скорость передачи возбуждения в известных пределах возрастала с увеличением температуры и интенсивности раздражения, а также зависела от предшествующих возбуждений. Очень высокие скорости механических движений, которым предшествовали электрические сигналы, были зарегистрированы им при ловле насекомых у насекомоядных растений, в процессе опыления у тычинок, в тропизмах и настигах.

Последующие работы Хоувинка, Сибакка и Умрата подтвердили справедливость представлений Боса о наличии потенциалов действия у высших растений. Умрат обнаружил потенциалы действия и у обычных высших растений, не обладающих быстрыми локомоторными реакциями. Наиболее же важное значение в получении доказательств существования у обычных растений потенциалов действия, их физиологической роли, механизмов возникновения и распространения имели работы московских (Гунар, Горчаков, Паничкин, Синюхин) и нижегородских электрофизиологов (Опритов, Ретивин, Пятыгин). Именно этим группам электрофизиологов удалось получить убедительные доказательства того, что распространяющиеся импульсы возбуждения высших растений обладают всеми характеристиками потенциала действия: электрическим механизмом распространения и генерации, возможностью суммации подпороговых стимулов, подчинением правилу "все или ничего", рефрактерностью, возможностью электрической стимуляции и генерации в ритмическом режиме.

Потенциал действия представляет собой изменение электрических потенциалов, возникающие в раздраженных клетках (мембранного потенциала) и тканях (тканевого электрического потенциала) при появлении в них волны возбуждения. Токи действия являются переменными по направлению и величине. Потенциал действия возникает только в том случае, если сила раздражения достигает некоторой пороговой величины. Появление потенциала действия может наблюдаться и тогда, когда несколько подпороговых импульсов следуют друг за другом, т.е. у растений так же, как и у животных организмов, происходит суммация раздражений, которая приводит к тому же эффекту, что и пороговое раздражение, при условии, что воздействия следуют через небольшие интервалы времени. Очень сильные раздражения могут вызывать необратимые повреждения клеток.

Потенциал действия, как сказано выше, возникает только в том случае, если вызываемая раздражителем деполяризация мембранного потенциала превысит некоторое пороговое значение, после которого процесс деполяризации резко ускоряется и становится необратимым. Этот процесс связан с активацией участвующих в электрогенезе ионных каналов различных типов (рис. 72). Мембрана может даже поменять знак потенциала на противоположный (это явление носит название "овершут"). Затем в результате работы ионных насосов мембранный потенциал возвращается к исходному значению. В растительных клетках величина порога возбуждения зависит от объекта, температуры, типа раздражителя и варьирует от 10 до 60 мВ. Порог изменения возбуждающего стимула может быть незначительным. В опытах Опритова с коллегами, например, для инициации ПД в проводящих пучках тыквы было достаточно температурного стимула в 1-2°C.

В процессах генерации ПД у растений так же, как и у животных организмов, может наблюдаться явление аккомодации, когда порог возбуждения зависит от скорости нарастания раздражающего воздействия. Аккомодация имеет важное значение при адаптации организма к новым условиям и служит хорошей характеристикой его пластичности при стрессовых ситуациях.

При действии на растительные ткани пороговых или сверхпороговых стимулов потенциал действия возникает не сразу, а после некоторого латентного периода, который у различных растений составляет от десятых долей секунды до сотен секунд. Величина латентного периода определяется характером раздражителя и зависит от способа нанесения раздражения.



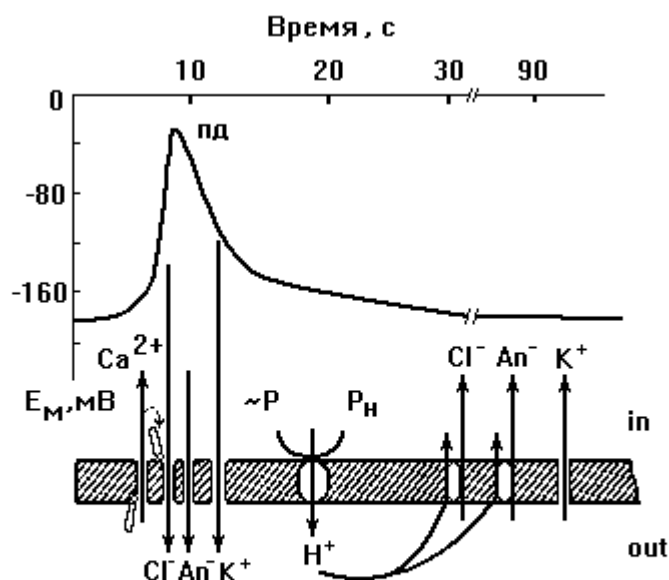


Рис.72. Схема ионных потоков при генерации потенциала действия у высших растений [Опритов и др., 1991].

После возникновения потенциала действия в клетке наступает абсолютный рефрактерный период, который характеризуется тем, что даже сверхпороговые раздражения не вызывают появления электрической реакции. В относительный рефрактерный период генерация ПД уже может происходить, но только в ответ на раздражения, интенсивность которых выше пороговых значений. Продолжительность абсолютного и относительного рефрактерных периодов у растений длиннее, чем у животных. Так, например, у венериной мухоловки они составляют соответственно 0,6 и 30 с, у биофитума - 25-50 и 30-70 с. Полная нечувствительность (после появления импульса ПД) у мимозы к механической стимуляции достигает 90 с, а у традесканции к тепловому стимулу - 120 с. В нервах млекопитающих длительность абсолютной рефрактерной фазы равна 0,0005 с, а относительной - 0,01 с.

Общая продолжительность импульса ПД в клетках высших растений варьирует от 0,5 с у венериной мухоловки до нескольких десятков секунд у обычных растений, в то время как в нервах млекопитающих она составляет всего 0,2 - 2 мс.

Скорость распространения ПД у высших растений достаточно велика и сопоставима со скоростью распространения возбуждения у некоторых животных организмов. У венериной мухоловки, например, она равна 20 см/с, а у мимозы - 4 см/с. В растениях, не обладающих быстрыми локомоторными реакциями, скорость потенциала действия по проводящим тканям невысока и составляет 0,08 - 0,5 см/с.

Амплитуда импульса потенциала действия у высших растений близка к значениям, которые регистрируются на нервах позвоночных животных, и колеблется от единиц до нескольких десятков мВ. У насекомоядных растений, растений с быстрыми локомоторными движениями и у водорослей амплитуда может быть еще выше. У мимозы, например, она достигает 180 мВ, у росянки -- 80-90 мВ. В клетках проводящих пучков протоксилемы и флоэмы мимозы при прохождении через них возбуждения регистрируются электрические импульсы с амплитудой 140+12 мВ. Эта величина превышает амплитуду ПД, обычно регистрируемую в нейронах. Однако в растениях, в отличие от животных, в процессе генерации импульса ПД, как правило, не происходит изменения знака мембранного потенциала, т.е. нет овершута.

Таким образом, у высших растений "силовой" параметр импульса потенциала действия (его амплитуда) весьма близок к таковому в нервных волокнах животных организмов, тогда как его временные характеристики отличаются большей длительностью. Последнее обстоятельство, вероятно, связано с несовершенством системы проведения электрического импульса в растениях и с большей зависимостью электрических процессов от обмена веществ. Несовершенство функционирования сигнальной системы растительных организмов по сравнению с животными проявляется и в наличии декремента (снижения по мере распространения) скорости и амплитуды импульса ПД, которое может составлять 50 % и более. И, наконец, для растений так же, как и для животных, может иметь место реципрокность распространения потенциала действия, когда импульсы ПД распространяются только в одном из направлений.

Помимо одиночных импульсов в растениях может наблюдаться и ритмическая форма генерации потенциалов действия, которые могут индуцироваться при действии как постоянного раздражителя, так и раздражителя, интенсивность которого варьирует. В случае короткого рефрактерного периода и невысокой частоты периодичности действия раздражителя возможно усвоение растениями ритмики возбуждающего стимула. При появлении серий (пачек) импульсов потенциала действия скорость их распространения увеличивается.

Важное значение в распространении возбуждения по растительному организму отводится его проводящей системе. Как правило, способностью генерировать и проводить потенциал действия обладают те клетки проводящей системы, которые имеют наиболее высокий потенциал покоя. Микроэлектродные измерения показали, что у мимозы, тыквы и борщевика такой способностью обладают мелкие удлинённые паренхимные клетки флоэмы, протоксилемы и, возможно, метаксилемы. Именно эти клетки образуют, например, у мимозы многочисленные ряды вдоль пучка. При этом различие в строении проводящей системы одно- и двудольных растений проявляется также и в характере проведения импульса ПД. У растений, по-видимому, только проводящая система способна к проведению импульсов ПД, поскольку при полном удалении в стебле пучков способность отвечать на раздражение генерацией импульсов ПД теряется. Однако, если нарушить целостность пучка, способность к распространению возбуждения полностью не исчезает, снижается лишь количество импульсов ПД и их амплитуда; правда, иногда импульс ПД может преодолевать повреждённый участок, не изменяя своих параметров. В последнем случае, вероятно, происходит электротоническое распространение возбуждения по паренхимным клеткам, окружающим сосуды.

В процессе прохождения по растению волна возбуждения может переходить от одного проводящего пучка к другому - как правило, от более мелкого к более крупному. При умеренных и адекватных раздражителях потенциал действия может распространяться по отдельному проводящему пучку независимо от других. При очень сильных раздражителях, в том случае, когда возбуждение одновременно достигает двух или нескольких пучков, может сформироваться общий для нескольких пучков импульс потенциала действия. Основой этих взаимодействий также, по-видимому, являются электротонические явления. Однако все эти процессы обнаружены только в наземной части растительного организма, в корневой же системе пока еще не удалось зарегистрировать распространение ПД.

Механизм возникновения и распространения возбуждения в растениях так же, как и у животных, связан с изменениями ионной проницаемости и колебаниями мембранного потенциала клеток, по которым перемещается импульс ПД.

Принцип образования ПД в клетках животных организмов заключается в следующем. При возбуждении резко (в сотни раз) возрастает проницаемость плазматической мембраны для ионов  $\text{Na}^+$ . По градиенту концентрации натрия из окружающей среды входит в клетку и вызывает деполяризацию мембранного потенциала. Удаление положительных зарядов из клетки происходит двумя путями. Во-

первых, в начале возбуждения незначительно (в 10-15 раз) увеличивается проницаемость мембраны для ионов  $K^+$ , которые по градиенту концентрации начинают выходить из клетки. По мере снижения мембранного потенциала поток ионов калия постепенно усиливается, являясь причиной реполяризации мембраны. Во-вторых, вошедшие в клетку ионы  $Na^+$  активируют  $Na^+,K^+$ -АТФазу, которая выкачивает из клетки натрий в обмен на калий из окружающей среды в отношении 2/3, что обеспечивает восстановление исходного ионного статуса клетки и потенциала покоя.

У высших растений в качестве носителей зарядов при возбуждении выступают прежде всего ионы  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  и  $Cl^-$ . Опритов с сотр. показали, что при возбуждении клеток высших растений (так же, как и харовых водорослей) в первую очередь активируются потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы (см.рис.72). Ионы  $Ca^{2+}$  по градиенту концентрации входят в клетку и активируют  $Ca^{2+}$ -зависимые  $Cl^-$ -каналы. Выходящий из клетки поток ионов

$Cl^-$  вызывает деполяризацию мембранного потенциала, которая приводит к возникновению реполяризующего потока ионов  $K^+$  из клетки через  $K^+$ -каналы. В восстановлении исходного мембранного потенциала и ионного баланса между клеткой и внешней средой также участвует локализованная в плазмалемме  $H^+$ -АТФаза, которая, выкачивая из клетки ионы  $H^+$ , закачивает калий.

В процессе генерации потенциала действия плазмалемма деполяризуется почти до нуля за 100 мс, а затем реполяризуется до исходной величины приблизительно за 2 с. Деполяризация мембраны, инициируемая фитогормонами (АБК, ИУК), элиситорами, фитотоксинами, красным и синим светом может происходить за счет угнетения  $H^+$ -помпы, активации анионных, кальциевых или неселективных каналов, модуляции работы  $K^+$ -каналов. Фаза реполяризации связана с закрытием анионных каналов, включением  $H^+$ -помпы и активацией таких типов ионных каналов, как, например,  $K^+_{out}$ -каналы.

У животных при прохождении волны возбуждения ионные сдвиги затрагивают цитоплазму и окружающую среду. В растительной клетке процесс генерации ПД должен быть связан с изменением ионного статуса не только цитоплазмы и апопласта, но, по-видимому, и вакуоли. Поэтому при изучении механизма возникновения ПД в клетках растений необходимо учитывать динамику ионного состава такого крупного клеточного компартмента, как вакуоль.

Механизм распространения возбуждения у многих биологических объектов, например харовых водорослей, мышечных волокон и особенно нервных тканей, объясняет теория местных токов. Согласно этой теории, распространение импульса по нейрону идет скачкообразно по окружающему раствору от одного перехвата Ранвье к другому. В процессе возбуждения происходит локальная деполяризация мембраны. В результате между возбужденным и покоящимся участками нейрона возникают электрический градиент и электрический ток, который, распространяясь в аксиальном направлении, приводит в возбужденное состояние последующие участки нейрона. Поэтому процесс передачи нервного импульса ускоряется при повышении электропроводности среды и зависит от длины участка нейрона, покрытого миелином, непроводящего электрический ток.

Пока нет строгих доказательств применимости теории местных токов к высшим растениям. Однако существуют факты, которые указывают на то, что данная теория, по-видимому, может объяснить механизм распространения возбуждения и в растительных организмах. Установлено, например, что скорость распространения возбуждения по пучкам зависит от электропроводности окружающей среды. В опытах Сibaoka при погружении черешка мимозы в 0,001, 0,01 и 0,1 моль/л растворы NaCl скорость распространения ПД повышалась соответственно на 15, 30 и 60 %. Еще одним аргументом в пользу электрического механизма передачи возбуждения в растениях является возможность передачи импульса ПД в поперечном направлении от одного возбудимого

элемента к другому, а также тот факт, что потенциал действия в ряде случаев способен преодолевать поврежденные участки с помощью солевого мостика.

В механизмах возникновения и распространения импульса возбуждения в растительных и животных организмах много сходного. В то же время в процессе генерации потенциалов действия у растений имеется ряд специфических особенностей. В растительных тканях распространение волны возбуждения в большей степени связано с функционированием анионных каналов. При возбуждении клетки происходят активация анионных каналов, выход анионов из цитоплазмы и локальная деполяризация мембраны. Изменение мембранного потенциала является причиной активации соседних анионных каналов и распространения возбуждения на другие участки клеточной мембраны. Таким образом, в отличие от животных организмов, в растениях распространение электрического возбуждения вероятно в первую очередь определяется возникновением локальных потоков анионов через анионные каналы плазмалеммы.

Раздражители, вызывающие генерацию ПД в растениях, делят на механические, химические, температурные, световые электрические и др. Механическое раздражение путем прикосновения, трения или сотрясения может вызвать импульс ПД и через некоторое время - движение листьев, например, у мимозы и тычинок в цветке. В результате трения о почвенные частицы в прорастающих эпикотильях гороха возникает серия импульсов ПД, которые, вероятно, являются одной из причин повышения содержания (в механически раздражаемых тканях) фитогормона этилена и, как следствие, нераспрямления крючка.

В некоторых случаях при слабом давлении, ударе, изгибе или умеренной деформации растительных тканей появляется только местная импульсная электрическая реакция, причем энергия механических стимулов, которые инициируют эту местную импульсную форму электрической активности, сопоставима с энергией механического воздействия дождя или ветра. Так, например, если порог возникновения импульсов при механическом раздражении в среднем составляет  $10^{-4}$  Дж, то энергия падающей капли дождя диаметром 5 мм равна  $10^{-1}$  н.

Повреждения тканей при порезах и уколах чаще всего индуцируют появление распространяющихся по растению ПД. Иногда повреждающие стимулы вызывают появление только переменного потенциала, который в свою очередь может вызвать потенциал действия.

Раздражения химическими веществами условно делят на два типа: раздражения физиологически активными веществами и ионная стимуляция. Воздействие сильными электролитами (например, KCl) в концентрации 1-0,1 моль/л приводит к появлению потенциала действия. Хлорид калия является своего рода эталонным раздражителем, поскольку инициирует возникновение именно ПД, а не переменного потенциала или местной электрической активности. Аналогичным образом действуют различные плазмолитики. При увлажнении и подсыхании тканей (особенно корневой системы) могут возникать распространяющиеся импульсы ПД. Раздражение фитогормонами и другими физиологически активными веществами также вызывает генерацию ПД.

В ходе температурной стимуляции при умеренном нагревании происходит гиперполяризация, а при охлаждении - деполяризация мембранного потенциала, что, вероятно, объясняется изменением энергетики клетки и, как следствие, изменением активности электрогенных ионных насосов. Опритов с сотр. показали, что охлаждение растительных тканей на  $5^{\circ}$  С (или даже на  $1-2^{\circ}$  С) со скоростью  $2^{\circ}$  С/мин вызывает генерацию распространяющихся ПД. Поскольку такие перепады температур весьма часты в естественных условиях, то авторы рассматривают этот способ раздражения наиболее адекватным для высших растений.

Электростимуляция не относится к числу естественных воздействий на растительные организмы, но адекватна природе потенциала действия. У животных организмов очень удобным параметром, характеризующим степень (меру) возбудимости

при электрическом воздействии является хронаксия, т.е. то минимальное время, в течение которого должен действовать ток, равный двум реобазам, чтобы вызвать пороговое возбуждение (реобазы - минимальная пороговая величина электрического раздражения постоянным током бесконечной длительности). В табл. 8 приведена хронаксия у некоторых животных и растительных объектов.

Таблица 8. Хронаксия у животных и растительных объектов

Объект	Исследуемый орган	Хронаксия, мс
Мимоза	Листья	30
Медуза	Мантия	20
Дождевой червь	Нервная цепочка	20
Пиявка	"-----"	30
Краб	Мышцы клешни	30
Виноградная улитка	Двигательные нервы	20
Лягушка	Нервы икроножной мышцы	0,3 - 0,6
	Мышцы желудка	30 - 100

В фитофизиологии важно ответить на вопрос несет ли импульсная электрическая активность в растительном организме какую-либо функциональную нагрузку или нет. Если распространяющееся возбуждение играет определенную роль в процессах жизнедеятельности растения, импульсную электрическую активность следует рассматривать как один из способов регуляции обмена веществ, иными словами, это должна быть такая же важная физиологическая функция, как рост, транспорт веществ, фотосинтез. Если же импульсная форма электрической активности не несет в растениях существенной функциональной нагрузки, то ее необходимо исследовать в сравнительно эволюционном плане, для того, чтобы понять, как в филогенезе шло становление систем, ответственных за адекватную оценку и реакцию живых организмов на разнообразные раздражители. Существует, однако, большая группа растений, у которых процессы, способствующие появлению и распространению импульсов потенциалов действия, жизненно необходимы для отправления наиболее важных физиологических функций. Это насекомоядные растения и растения с быстрыми локомоторными функциями.

#### 4. Электрические сигналы насекомоядных растений

В настоящее время известно более 500 видов насекомоядных растений, относящихся к 7 семействам, филогенетически довольно далеким друг от друга. Все насекомоядные растения делят на несколько групп.

К первой группе относят растения, обладающие листьями-ловушками, которые способны совершать особые глотательные движения (рис.73). К ним относятся водные или земноводные виды утрикулярии (пузырчатка). Как только рачок (дафния, циклоп и т.п.) касается клапана, он легко отходит внутрь, а животное увлекается струей воды и засасывается внутрь пузырька. В ряде случаев добычей утрикулярии могут стать мальки рыб или головастики. Разрежение внутри пузырька создается за счет работы расположенных на его задней стенке специальных всасывающих желез, которые отсасывают воду из полости пузырька, и поэтому уже через 15-20 мин пузырек будет способен совершить глотательное движение.

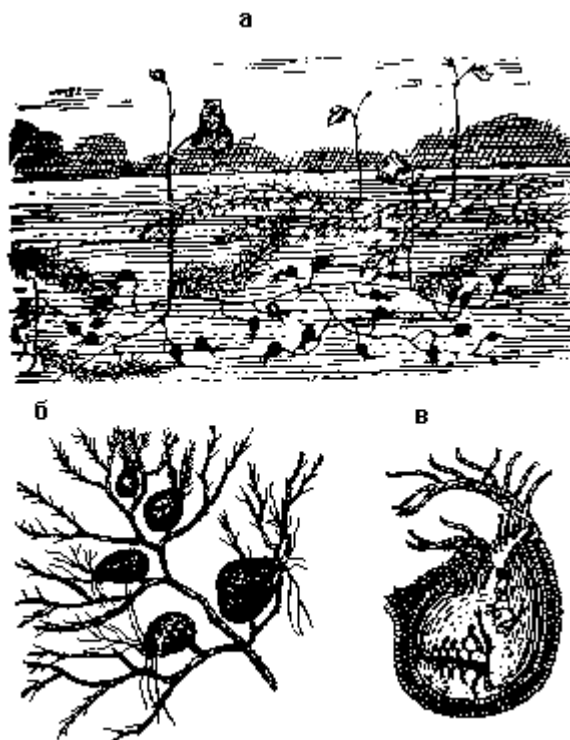


Рис.73. Утрикулярия.

а - общий вид; б - веточка с ловчими пузырьками; в - ловчий пузырек в разрезе.

К второй группе относятся растения, листья которых выделяют на своей поверхности липкую жидкость, совершают удерживающие добычу движения и подвергают ее действию протеолитических ферментов. Наиболее известным представителем этой группы растений является росянка, которая имеет очень слаборазвитую корневую систему и листья, на которых расположены щупальца (рис.74). Насекомое, коснувшись листа, прилипает к нему и чем энергичнее оно бьется, тем сильнее изгибаются щупальца по направлению к добыче. Щупальца росянки обладают необычайно высокой чувствительностью к механическому и химическому раздражению. Изгиб щупалец становится заметным уже через 10-20 с после воздействия.

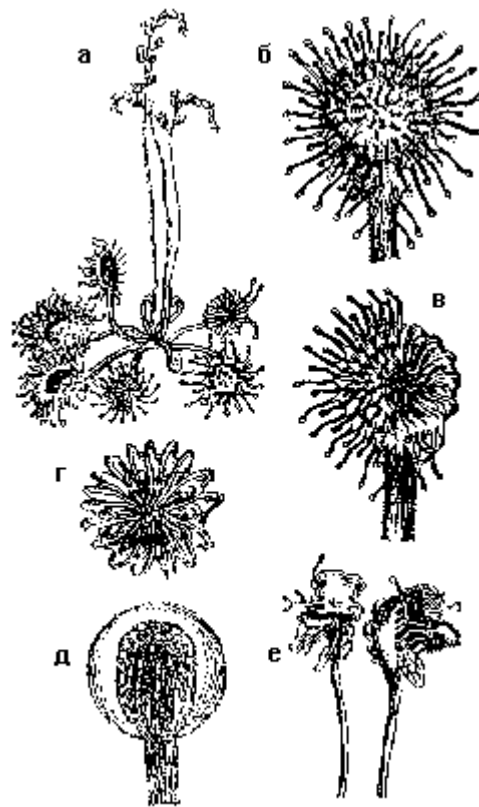


Рис.74. Росянка.

а - общий вид; б - раскрытый лист росянки; в, г - частично и полностью закрытый лист; д - увеличенное изображение головки щупальца; е - лист росянки, поймавшей муху.

Третья группа насекомоядных растений имеет листья-ловушки, совершающие быстрые движения захлопывания. При попадании насекомого, например, на листья-ловушки венериной мухоловки вначале наблюдается их быстрое захлопывание (как книги), после чего идет медленное и более плотное смыкание половинок листа, выделение в возникшую полость секрета и переваривание добычи (рис.75). Захлопывание листьев-ловушек происходит только тогда, когда насекомое задевает расположенные на листе три волоска-рецептора. К этой группе растений относится также водное растение альдрованда, которое питается рачками и внешне похоже на водные виды пузырчатки, но имеет аналогичные венериной мухоловке листья-ловушки (рис.76).



Рис.75. Венера мухоловка.  
а - общий вид; б - раскрытый ловчий лист; в - поперечный срез листа в закрытом состоянии.

Питающиеся насекомыми саррацении и непентессы имеют листья-ловушки в виде кувшинов с пищеварительными ферментами на дне. Привлекаемые яркой окраской этих растений насекомые, скатываются по скользким стенкам листьев-кувшинов, вязнут в липком растворе протеолитических ферментов и перевариваются.

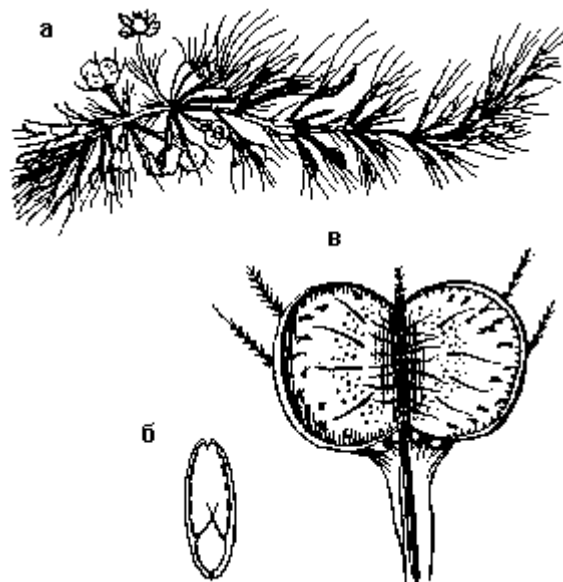


Рис.76. Альдрованда.  
а - веточка растения; б - поперечный срез листа в закрытом состоянии; в - раскрытый лист.

Почти все этапы пищевого поведения насекомоядных растений контролируются электрическими сигналами. У росянки практически любая клетка поверхности щупалец способна реагировать на прикосновение снижением мембранного потенциала, инициируя таким образом возникновение потенциала действия, распространяющегося к основанию



волоска и далее по всей поверхности листа. Механическое раздражение является причиной изгиба не только того щупальца, которое восприняло раздражение, но и других, которые изгибаются в направлении первоначального источника распространения ПД, скорость распространения последнего составляет 0,5 см/с.

Для закрытия листа венериной мухоловки необходимо два стимула: насекомое должно либо дважды воздействовать на один и тот же чувствительный волосок-рецептор, либо последовательно на два различных волоска, при этом интервал между двумя раздражениями не может превышать 20 с. Если повторное раздражение происходит спустя 40-50 с после первого, признаков движения листьев-ловушек практически не обнаруживается. Аналогичным образом для закрытия листьев-ловушек альдрованды должны произойти два последовательных раздражения чувствительной щетинки. При первом воздействии на чувствительный волосок венериной мухоловки регистрируется снижение мембранного потенциала клеток основания волоска, которое передается по наружной поверхности листа во всех направлениях со скоростью 2 см/с. Если вскоре раздражения повторяются, возникает распространяющийся потенциал действия, являющийся сигналом для захлопывания ловушки через  $0,6 + 0,05$  с.

Закрытия листа венериной мухоловки можно добиться и электрической стимуляцией. И в этом случае захлопывание листьев-ловушек наблюдается только после повторного импульса электрического тока. Венерина мухоловка, как и росянка, способна реагировать хватательными движениями и на химические раздражители. При этом, например, в процессе переваривания пойманного насекомого появляются импульсы потенциалов действия; вероятно, благодаря им лист поддерживается в закрытом состоянии до конца переваривания добычи. В случае закрытия листа-ловушки только механическим стимулом он раскроется через 10 ч, и при этом импульсы потенциалов действия не появляются. Если же в ловушке находится насекомое, она остается закрытой многие сутки, и это ее замкнутое состояние будет поддерживаться периодически возникающими импульсами ПД, генерирующихся под влиянием химических раздражителей - продуктов переваривания жертвы.

## 5. Функциональная роль потенциала действия

Очень высокие скорости проведения импульса потенциала действия наблюдаются не только у насекомых, но и у растений с быстрыми локомоторными движениями - у мимозы, кислицы, биофитума и др. В ответ на прикосновение, например, у мимозы возникает электрическое возбуждение, приводящее к складыванию листьев, распространяющееся по растению со скоростью 4 см/с. Аналогичную реакцию можно вызвать у мимозы и слабым электрическим током порядка 0,6 мкА, однако при этом электрический импульс необходимо повторить дважды.

Механическое раздражение нектарника у липы, имитирующее движение насекомого, вызывает немедленную генерацию потенциала действия, распространяющегося по железистым клеткам во флоэму проводящих пучков и стимулирующего образование нектара. Даже при легком механическом раздражении лопастей рыльца пестика инкарвиллеи и минулус они закрываются, образуя влажную камеру, благоприятную для прорастания пыльцевых зерен, принесенных насекомыми. В основе этого процесса также лежит потенциал действия, распространяющийся к месту сочленения лопастей пестика и инициирующий их движение. Умеренное механическое давление на эпикотиль бобовых растений приводит к возникновению ПД, вызывающего выделение этилена и утолщение эпикотилия. Этот процесс, вероятно, происходит и при прорастании, как результат механического давления почвенных частиц на ткани проростка.

Процесс прорастания пыльцы также сопровождается появлением потенциала действия, распространяющегося по направлению к завязи. Молдавский электрофизиолог Духовный изучал этот процесс на кукурузе. Он установил, что сразу после нанесения пыльцы у клеток рыльца пестика можно зарегистрировать 2-5 колебаний потенциала покоя с амплитудой 8 мВ. Однако, поскольку промытый кварцевый песок вызывал почти такие же колебания, можно полагать, что первичная электрическая реакция пестика - это результат механического раздражения. Через несколько минут в пестике возникает вторая группа колебаний потенциала покоя, которая, вероятно, является результатом химического взаимодействия продуктов выделения пыльцы с рыльцем, поскольку песок их уже не инициировал.

Вслед за первичной биоэлектрической реакцией наступает период генерации импульсов потенциала действия. С началом появления пыльцевых трубок возникает первый ПД (рис. 77), который со скоростью 1,1 см/с перемещается в направлении завязи. Интересно, что перед генерацией ПД мембранный потенциал в возбудимых клетках пестика, участвующих в проведении импульса, возрастает на 16-27 мВ. При дальнейшем прорастании пыльцы происходит генерация еще двух импульсов, характеристики которых очень близки к первому ПД. Отличие состоит лишь в том, что они имеют большую скорость распространения, чем первый ПД, т.е. наблюдается эффект "проторения", и что второй и третий ПД, достигнув завязи, вызывают там местную электрическую реакцию, сходную с той, которая наблюдается в клетках рыльца пестика при нанесении пыльцы. Все эти процессы происходят в течение 1,5 ч от начала прорастания пыльцы.

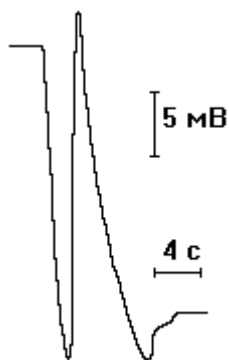


Рис.77. Потенциал действия, возникающий в рыльце пестика на начальном этапе прорастания пыльцы кукурузы [Духовный, 1980].

По мере того, как начинается более интенсивный рост пыльцевых трубок и активное внедрение их в ткани пестика, наступает этап высокой электрической активности, характеризующийся генерацией большого числа импульсов ПД, чередующихся с местной электрической реакцией. Импульсы с амплитудой от 15 до 38 мВ почти без затухания распространяются по направлению к завязи. На рис. 78 показан лишь небольшой участок этого этапа, который в среднем тоже длится около 1,5 ч. В этот период мембранный потенциал в среднем на 20 мВ выше, чем в невозбужденном состоянии клетки. Если измеряющий электрод помещен так, что пыльцевая трубка успевает прорасти в зону, расположенную ниже него, импульсы ПД уже не регистрируются и потенциал покоя клеток возвращается к исходному значению. В это время в завязи также происходит активация электрогенеза, которая проявляется в ритмической генерации серий ПД.

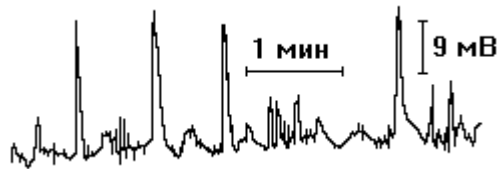


Рис.78. Генерация потенциалов действия и местная электрическая активность в клетках пестика кукурузы в период интенсивного роста пыльцевых трубок [Духовный, 1980].

Ритмическая электрическая активность завязи состоит из двух этапов (рис.79): продолжительность первого этапа составляет около 35 мин, второго - около 20 мин, причем второй этап наступает в среднем через 40 мин после окончания первого. При одновременной регистрации мембранного потенциала клеток пестика и завязи Духовному удалось обнаружить, что смена типов ритмической электрической активности в завязи, по-видимому, задается одиночными ПД, поступающими в завязь из столбика.

Затем, вплоть до проникновения пыльцевых трубок в зародышевый мешок наблюдается генерация лишь одиночных импульсов ПД, которые без декремента достигают завязи. После оплодотворения импульсы ПД прекращаются, в завязи регистрируются только волнообразные колебания потенциала покоя клеток, которые дают начало волне возбуждения, распространяющейся вдоль стебля растения. Интересно, что опыление пылью других линий или гибридов кукурузы характер электрогенеза существенно не изменяет, пыльца же подсолнечника при попадании на пестик кукурузы вызывает появление только редких одиночных импульсов ПД.

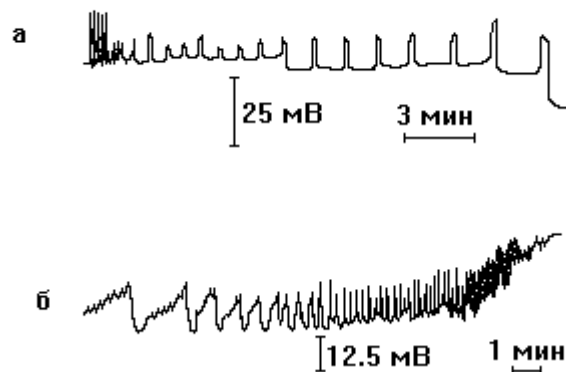


Рис.79. Первый (а) и второй (б) этапы ритмической электрической активности клеток завязи кукурузы в период интенсивного роста пыльцевых трубок [Духовный, 1980].

Таким образом, способность растений к генерации распространяющегося электрического импульса позволяет весьма эффективно обеспечивать координацию функций в процессах пищевого поведения, а также при механических, химических, температурных и других раздражениях. При этом электрофизиологическая сигнализация является весьма эффективным способом регуляции жизнедеятельности не только у растений насекомоядных и с быстрыми локомоторными реакциями, но и у обычных растительных организмов.

## 6. Ритмические колебания биоэлектрических потенциалов

Биологические системы как на микро-, так и на макромолекулярном уровне чрезвычайно сложны. В то же время они высокоупорядочены, компактны и фактически представляют собой эффективные молекулярные машины. Живые системы способны хранить самым эффективным образом информацию, необходимую для управления,

воспроизведения и других процессов жизнедеятельности организма. В последнее время резко повысился интерес к изучению биологических систем, в которых появляются незатухающие колебания - временные или пространственные. Если под волной обычно понимают пространственно-временную эволюцию какой-либо переменной величины, то осцилляцией называют только временную составляющую этой переменной. При осцилляции происходит одновременное колебание изучаемого параметра во всех точках данного объема.

Биологические колебания охватывают широчайший диапазон частот - от миллисекунд до нескольких лет. Их можно наблюдать в отдельных клетках, тканях или органах, в целых организмах и популяциях. Эндогенные ритмы часто связывают с самоподдерживающимися колебаниями или автоколебаниями. Ритмоводители (ведущие центры, пейсмекеры) с периодом колебаний в несколько минут, а также метаболические волны возбуждения (со скоростями в мкм/с) тесно связаны с переносом веществ и морфогенетической информации. Именно колебательные процессы приводят к возникновению хорошо упорядоченной пространственной организации живых объектов.

Turing показал, что химические реакции в сочетании с диффузией могут приводить к возникновению определенной упорядоченной пространственной структуры. На этой основе появилась возможность создания теории формирования пространственных структур, математически доказывающей, что определенная комбинация компонентов реакции, их взаимодействия и диффузии может вызвать появление волны и формирование устойчивой пространственной структуры (это относится и к живым организмам). В развивающихся живых системах наряду с внутриклеточной должна существовать и межклеточная связь для управления пространственным развитием. С помощью волновых процессов (в виде концентрационных волн) "биохимическая" информация передается на макроскопические расстояния за времена, которые на несколько порядков меньше, чем характерные времена диффузии. Поэтому пространственно-временные эффекты чрезвычайно важны в морфогенезе и развитии всех живых организмов, тем более, что основные характеристики автоколебательных процессов и биохимических часов являются генетически наследуемыми признаками.

Наука об автоволновых процессах, основные ее понятия и методы исследований находятся пока в процессе становления. Термины "автоволновой процесс", "автоволна" были предложены физиком Хохловым. Автоволновые процессы (АВП) в живых системах условно делят на четыре группы: АВП в возбудимых клетках и тканях, в биохимических реакциях, в сообществах живых организмов и при морфогенезе.

Распространяющиеся волны импульсной электрической активности со скоростью 20-60 см/с и длительностью от 0,2 до 10 мс зарегистрированы на мембранах возбудимых клеток. Связь между клетками осуществляется с помощью автоволн химических медиаторов и электрических ионных токов. Автоволновые явления проявляются и в сообществах живых особей - при их размножении, взаимодействиях типа хищник-жертва и т.д. Впервые теория автоволновых процессов была применена при описании распространения генов в популяциях. Автоволны, возникающие на основе осцилляций некоторых биохимических процессов, наблюдаются в ходе дифференцировки органов и тканей. Процессы формообразования сопровождаются механическими волнами различных типов.

Волновые явления играют важную роль в процессах роста и регенерации у многих животных и растительных организмов. Головка водоросли *Acetabularia* после ампутации регенерирует в течение недели, при этом наблюдаются электрические волны, распространяющиеся вверх по растению со скоростью около 400 мкм/с.

Хорошим объектом для изучения автоволновых процессов является миксомицет *Dictyostelium discoideum*, поведение которого - удачный пример, доказывающий необходимость автоколебательных явлений для жизненного цикла в ходе морфогенеза. Амебы, выходящие при благоприятных условиях из созревшего плодового тела

миксомицета, вначале равномерно распределяются в доступном им пространстве и вегетативно воспроизводятся, пока не исчерпается имеющаяся пища. Затем наступает первая стадия развития миксомицета - его агрегация. В какой-то момент времени некоторые амeboидные клетки начинают периодически выделять циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). Эти клетки получили название пейсмекеров (водителей ритма). Морфологически они не отличаются от остальных амев. Соседние с водителями ритма клетки, после того как до них дошел волновой сигнал (концентрационная волна цАМФ), начинают двигаться по направлению к ведущим центрам и в то же время (также периодически) испускать цАМФ. Так распространяется химический сигнал, вызывающий агрегативное движение всей популяции, определяемое только градиентами концентрации цАМФ и частотой его секреции амевами-водителями ритма. Период испускания цАМФ ведущими центрами составляет несколько минут, а скорость волны химического сигнала - несколько мкм/с. Когда несколько тысяч амев соберутся вокруг ведущего центра, они образуют плотную массу, имеющую вид слизевого плазмодия, который начинает двигаться. Это движение тоже носит периодический характер с волновыми сжатиями, распространяющимися вдоль тела плазмодия. Через некоторое время движения плазмодия прекращаются, и начинается формирование стеблеподобного плодового тела с головкой, содержащей споры. В благоприятных условиях споры покидают плодовое тело и распространяются в имеющемся пространстве, после чего весь процесс повторяется. Полный цикл занимает 8-10 ч.

Таким образом, именно периодическое испускание импульсов определенного метаболита (цАМФ) из организующего центра является причиной образования структурированного морфогенетического поля и последующего ориентированного движения отдельных клеток. То, что существенна именно периодическая природа испускания цАМФ, было продемонстрировано Darmon с коллегами. Они установили, что периодическое (через 5 мин) воздействие цАМФ на равномерно распределенные амевы инициирует агрегацию миксомицета; при непрерывном сигнале этого не наблюдалось. Аналогичные автоволновые движения, регулируемые межклеточной цАМФ, были обнаружены Goodwin в процессе развития эмбриона курицы. Интересно отметить, что период колебаний в изменении содержания ионов  $Ca^{2+}$ , измеренный с помощью люминисцентного белка акворина, в цитоплазме плазмодия составлял от 1,5 до 3,0 мин и был близок к периоду сократительного ритма.

Автоволновые процессы наблюдаются на различных стадиях эмбриогенеза и морфогенеза. Интересный пример пространственных волновых явлений на фоне непрерывного развития и поведения при регенерации щупальца морского гидроида *Tubularia* описал Goodwin. После ампутации щупальца сначала происходит медленная миграция клеток к травмированному концу тела гидроида; этот процесс продолжается около 5 ч. Затем наступает 8-часовая фаза, во время которой совершаются периодические сжатия (с периодом 8-10 мин). Эти волны сжатия сначала распространяются нерегулярно из нескольких центров, но в конце концов становятся регулярными и когерентными и исходят из одного ведущего центра. Далее в течение периода, продолжающегося около 5 ч, происходит медленное накопление клеток в области, где появится новое щупальце. В процессе регенерации гидранта, по-видимому, также происходит периодическое испускание какого-то метаболита, который создает морфогенетические организующие центры, управляющие биологическим развитием. Ведущие центры с периодом колебаний в несколько минут и метаболические волны возбуждения со скоростями в несколько мкм/с, по всей видимости, тесно связаны с переносом веществ (морфогенетической информации) и передвижением клеток, что в итоге и приводит к хорошо упорядоченной пространственной организации.

Инициацию морфогенеза можно вызвать многими, в том числе и стрессовыми, воздействиями. Ответная реакция, как правило, развивается не линейно, а в колебательном режиме. Чаще всего стрессовые воздействия инициируют электрические

осцилляции растительных тканей. В ряде случаев импульсную электрическую активность удается индуцировать некоторыми внешними факторами. Так, например, обработка клеток нителлы 10 ммоль/л раствором хлорида калия индуцирует осцилляции мембранного потенциала с частотой от 7 до 20 колебаний в минуту и амплитудой от 20 до 70 мВ (рис.80).

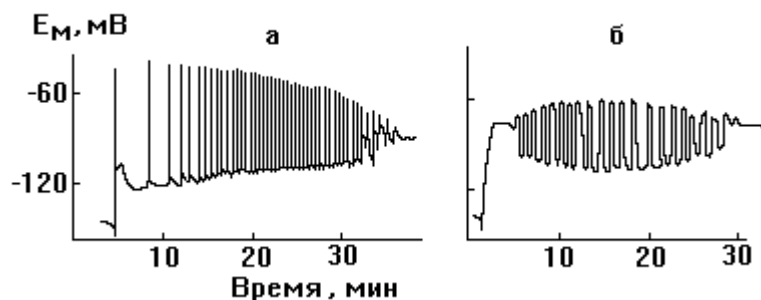


Рис.80. Два примера (а и б) ритмических осцилляций мембранного потенциала плазмалеммы, индуцированных в клетке нителлы 10 ммоль/л раствором КСl [Раденович, 1985].

Saftner и Raschke измеряли мембранные потенциалы замыкающих клеток устьиц нескольких видов растений и обнаружили, что добавление в среду ионов  $Ca^{2+}$  до концентрации 30 ммоль/л вызывает осцилляции мембранного потенциала с периодом 2 мин и амплитудой около 20 мВ. Шабала показал, что периодическое световое воздействие на резонансной частоте ритмических колебаний биопотенциалов стимулирует ряд морфогенетических процессов у кукурузы, фасоли, томатов и ячменя. При этом было обнаружено явление удвоения периода вынужденных светоиндуцированных колебаний БЭП у листьев кукурузы и фасоли. Это изменение периода колебаний БЭП автор объясняет переходом плазматической мембраны из одного устойчивого состояния в другое при плавном изменении управляющего параметра.

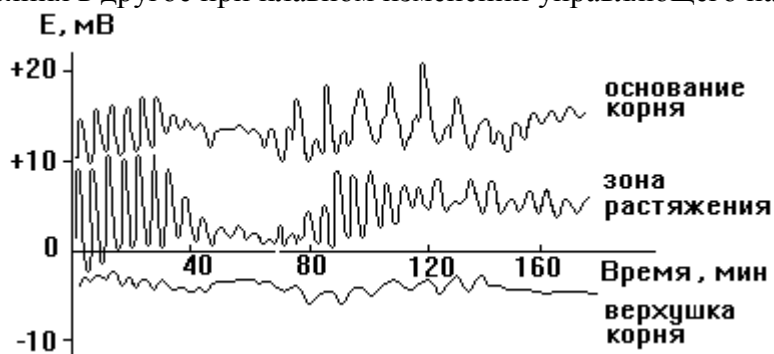


Рис.81. Ритмические колебания биопотенциалов различных зон корней конских бобов [Jenkinson, 1962].

В некоторых случаях при изучении эндогенной электрической активности растений удается зарегистрировать спонтанные ритмические колебания биоэлектрических потенциалов с различной частотой и амплитудой. Чаще всего обнаруживаются циркадные колебания, а также колебания, связанные с изменением светового режима. На рис.81 показаны ритмические изменения БЭП корней бобов. Можно видеть, что, несмотря на зависимость характера колебаний от зоны корня, их частота практически одинакова. При измерении мембранных потенциалов клеток корней кукурузы (рис.82) было обнаружено несколько типов спонтанной импульсной электрической активности. В ряде случаев в растениях удается зарегистрировать импульсную электрическую активность длительностью 0,1-1,0 с и амплитудой до 100 мкВ.

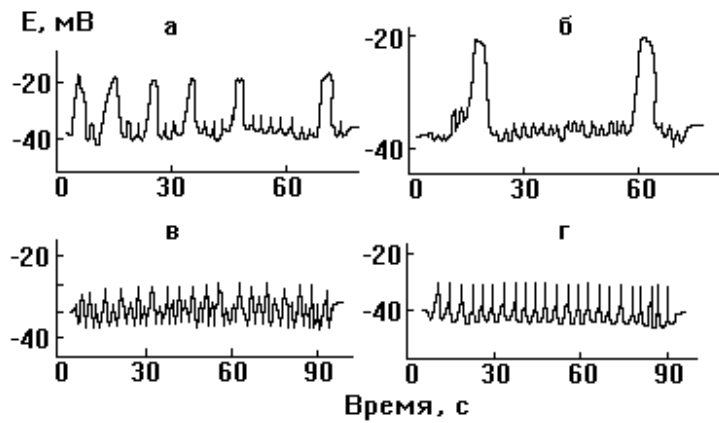


Рис.82. Ритмические биоэлектрические сигналы клеток корней кукурузы [Раденович, 1985].

а - сигналы индуцированы введением в ткань микроэлектрода, б - спонтанно возникающие импульсы на фоне осцилляций мембранного потенциала, в, г - примеры неоднородных и однородных импульсов. Питательный раствор: 0,1 ммоль/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 ммоль/л  $\text{NaHCO}_3$ , 0,4 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 0,2 ммоль/л  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ .

Если в сложной системе можно выделить несколько подсистем, функционирование каждой из которых описывается автоколебательной кинетикой, и эти подсистемы хотя бы частично связаны между собой, то происходит синхронизация автоколебаний на так называемой частоте синхронизации. Благодаря синхронизации в живых объектах вся система и все процессы правильно самоорганизуются в пространстве и во времени. В основе многих из этих процессов лежат химические реакции, промежуточные ингредиенты которых могут меняться автоколебательно. Примером такого типа синхронизации являются колебания концентрации ионизированного кальция в цитозоле.

Впервые  $\text{Ca}^{2+}$ -волны обнаружены в клетках животных организмов. Так, например, в процессе оплодотворения яйцеклетки в точке проникновения сперматозоида возникает  $\text{Ca}^{2+}$ -волна, распространяющаяся по цитоплазме. При этом в поле видимости флуоресцентного микроскопа с помощью  $\text{Ca}$ -чувствительного зонда акворина за 2 мин наблюдения у яйцеклетки рыб регистрировалось около 5 колебаний (рис. 83). Эти волны распространяются либо от точки вхождения сперматозоида, либо от анимального полюса и сопряжены с перестройкой системы актиновых филаментов. Волны полимеризации актина, распространяющиеся в кортексе от места вхождения сперматозоида, обнаружены в яйце морского ежа, в противоположном направлении - у представителей ракообразных и кольчатых червей. Следует отметить, что хемотаксис у сперматозоидов в первую очередь определяется градиентом концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , формируемым вокруг себя яйцеклеткой.

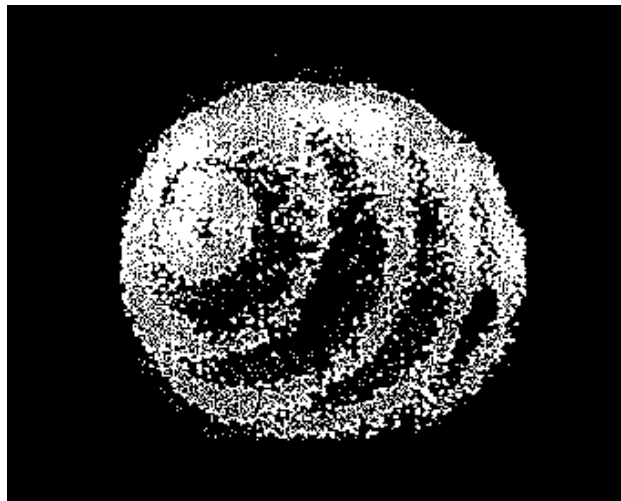


Рис.83. Сферические кальциевые волны, индуцируемые в цитоплазме яиц *Medaka* проникновением спермия [Yoshimoto, Hiramoto, 1991].

Оплодотворение яйцеклеток многих животных сопровождается повышением концентрации ионов кальция в цитоплазме, который играет триггерную роль в эмбриональном цикле деления клеток. При этом с помощью Са-селективного электрода, а также различных флуоресцентных зондов (фура-2, флуо-3 и др.) было установлено, что концентрация ионов кальция в различных частях оплодотворенной яйцеклетки неодинакова: существуют участки с повышенной и пониженной концентрацией ионов кальция. Оказалось, что при оплодотворении происходит только локальное увеличение концентрации ионов кальция (50 нмоль/л) в месте проникновения сперматозоида в яйцеклетку, связанное с кальциевым потенциалом действия. Далее, после некоторого латентного периода (около 15 с), наблюдается вторичное повышение концентрации ионов кальция в этом участке оплодотворенной яйцеклетки до уровня 2 мкмоль/л. Этот процесс продолжается циклически, что приводит к появлению передвигающейся со скоростью 5-100 мкм/с кальциевой волны, носящей автокаталитический характер.

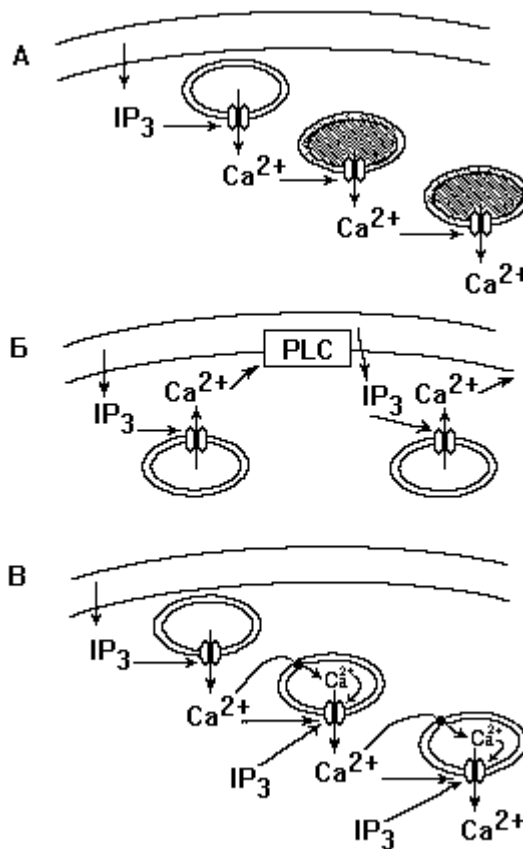


Рис.84. Три модели (А, В, С), объясняющие механизм распространения Ca<sup>2+</sup> волны в клетке [Miyazaki e.a., 1993].

Существует несколько возможных механизмов генерации Са-осцилляций. По мнению Gillot и Whitaker, генерация кальциевой волны в яйцеклетке происходит под влиянием диффундирующих из сперматозоида Са-зависимых мессенджеров-активаторов. В качестве одного из них может выступать инозитол-1,4,5-трифосфат (IP<sub>3</sub>), который может также синтезироваться и в самой яйцеклетке после активации G-белков и фосфолипазы С (PLC). Возможные механизмы участия IP<sub>3</sub> в формировании кальциевой волны показаны на рис. 84. После раздражения рецептора стимулируются G-белки, которые активируют PLC, и начинается синтез IP<sub>3</sub>. Образующийся IP<sub>3</sub> начинает взаимодействовать с рецепторами, расположенными на мембранах соответствующих



внутриклеточных кальциевых депо (эндоплазматический ретикулум и т.п.), индуцировать открывание  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и высвобождение ионов кальция в цитоплазму. Модель на рис. 84, А предполагает, что  $\text{IP}_3$  инициирует локальное повышение содержания кальция в цитоплазме только на первом этапе. Далее происходит только  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированное высвобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных "запасников", обладающих риаудиновыми рецепторами. Согласно модели изображенной на рис. 84, Б, имеет место цикличность между  $\text{IP}_3$ -индуцированным высвобождением кальция и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым синтезом  $\text{IP}_3$ . Модель на рис.84, В основывается на  $\text{IP}_3$ -индуцированной активации  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Однако при внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  более 300 нмоль/л активирующий эффект  $\text{IP}_3$  на функционирование  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов исчезает. Кальций начинает закачиваться внутрь соответствующего депо различными кальциевыми насосами и накапливаться до следующего момента образования волны. Следует отметить, что в генерации кальциевой волны в цитоплазме помимо  $\text{IP}_3$ -чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов могут принимать участие и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, активирующиеся гуанидиновыми рецепторами эндоплазматического ретикулума. Таким образом, в цитоплазме могут формироваться наномолярные градиенты ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (десятки нмоль/л) на расстоянии до 100 мкм в течение нескольких миллисекунд.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Болдырев А.А., Котелевцев С.В., Ланио М. и др.* Введение в мембранологию. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
- Бос Д.Ч.* Избранные произведения по раздражимости растений: В 2 томах. М.: Наука, 1964. Т.1. 437 с. Т.2. 395 с.
- Вахмистров Д.Б.* Пространственная организация ионного транспорта в корне: 49-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1991. 48 с.
- Галактионов С.Г., Юрин В.М.* Ботаники с гальванометром. М.: Знание, 1979. 143 с.
- Духовный А.И.* Электричество в жизни цветка. Кишинев: Штиинца, 1980. 30 с.
- Кларксон Д.* Транспорт ионов и структура растительной клетки. 1978. М.: Мир, М. 368 с.
- Коловский Р.А.* Биоэлектрические потенциалы древесных растений. Новосибирск: Наука, 1980. 176 с.
- Крутецкая З.И., Лонский А.В.* Биофизика мембран. СПб.: Изд-во СПбГУ, 1994. 287 с.
- Левицкий Д.О.* Кальций и биологические мембраны. М.: Высшая школа, 1990. 124 с.
- Маслоброд С.Н.* Электрофизиологическая полярность растений. Кишинев: Штиинца, 1973. 172 с.
- Маслоброд С.Н.* Электрический "язык" растения. Кишинев: Штиинца, 1981. 136 с.
- Медведев С.С.* Электрические поля и рост растений // Электронная обработка материалов. Кишинев, 1990. N 3. С. 68-74.
- Медведев С.С.* Физиологические основы полярности растений. Труды СПб о-ва естествоиспытателей. СПб.: Кольна, 1995. 159 с.
- Методы изучения мембран растительных клеток / Под ред. В.В.Полевого и др. СПб: Изд-во ЛГУ, 1986. 193 с.
- Нобел П.* Физиология растительной клетки (физико-химический подход). М.: Мир, 1973. . 287 с.
- Оприлов В.А., Пятыгин С.С., Ретивин В.Г.* Биоэлектrogenез у высших растений. М.: Наука, 1991. 214 с.
- Оприлов В.А., Ретивин В.Г.* О механизме распространяющегося возбуждения у высших растений // Физиология растений. 1982. Т. 29, N 25. С. 915-924.
- Плонси Р., Барр Р.* Биоэлектричество. М.: Мир, 1992. 366 с.
- Раденович Ч.* Ритмические электрические сигналы у растений // Физиол. и биохимия культ. растений. 1985. Т.17. N 6. С.523-529.
- Регистрация одиночных каналов / Под ред. Б.Сакмана и Э.Неера. М.: Мир, 1987. 448 с.
- Рубин А.Б.* Биофизика: В 2 книгах. Книга 2. Биофизика клеточных процессов. М.: Высшая школа, 1987. 303 с.
- Светозависимая биоэлектрическая активность листьев растений / Под ред. И.А.Рыбина. Свердловск: Изд-во Уральского ун-та, 1980. 112 с.
- Скулачев В.П.* Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989. 564 с.
- Юрин В.М., Гончарик М.Н., Галактионов С.Г.* Перенос ионов через мембраны растительных клеток. Минск. Изд-во "Наука и техника". 1977. 160 с.
- Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П.* Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Минск: Навука і Тэхніка, 1991. 271 с.
- Tester M.* Plant ion channels: whole-cell and single-channel studies // New Phytol. 1990. V.114. P. 305-340.