**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений**

ЛУКАШЕВИЧ

Валентин Артурович

**Действие наночастиц меди на электрические характеристики мембраны клеток *Nitella flexilis***

Дипломная работа

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Соколик А.И.

Допущена к защите

«\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2017 г.

Зав. Кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений

Доктор биологический наук, В. В. Демидчик

Минск, 2017

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

[РЕФЕРАТ 3](#_Toc484470332)

[ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 6](#_Toc484470333)

[ВВЕДЕНИЕ 7](#_Toc484470334)

[ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 9](#_Toc484470335)

[1.1. Характеристика наночастиц. Основные пути проникновения наночастиц в окружающую среду. 9](#_Toc484470336)

[1.2. Биологическая активность наночастиц. 9](#_Toc484470337)

[1.3 Роль меди в растительных организмах. Токсикологическая характеристика меди. 11](#_Toc484470338)

[1.4 Транспортные системы цитоплазматической мембраны. Краткая характеристика калиевых каналов. Потенциал-зависимые калиевые каналы. 14](#_Toc484470339)

[1.5. Общие принципы устройства установок для электрофизиологических исследований. 15](#_Toc484470340)

[1.6. Основные подходы к постановке микроэлектродных исследований. 17](#_Toc484470341)

[1.7. Современные методики микроэлектродных исследований. 18](#_Toc484470342)

[ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 20](#_Toc484470343)

[2.1. Оборудование и материалы, применявшиеся в данной работе. 20](#_Toc484470344)

[2.3. Техника заполнения, сборки и подготовки миероэлектрода и электрода сравнения к работе. 22](#_Toc484470345)

[2.5. Подготовка объекта исследования. 23](#_Toc484470346)

[2.6. Введение МЭ в клетку и последующая регистрация электрических параметров мембраны. 24](#_Toc484470347)

[2.7. Проведение фиксации мембранного потенциала. Исследуемая физиологическая активность клеток. 24](#_Toc484470348)

[2.8 Ход эксперимента. 25](#_Toc484470349)

[̊ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 26](#_Toc484470350)

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 33](#_Toc484470351)

[CПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 35](#_Toc484470352)

# РЕФЕРАТ

Работа 38 с, 5 частей, 15 рисунков, 5 таблиц, 16 источников

НАНОЧАСТИЦЫ, КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА, МЕДЬ, ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ, ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН, *NITELLA FLEXILIS*.

Объектом исследования являются интернодальные клетки харовой водоросли *Nitella flexilis*.

Цель работы – сравнить влияния воздействия суспензий медных макро- и наночастиц на электрические характеристики цитоплазматических мембран клеток харовой водоросли *Nitella flexilis* и на основе полученных данных сделать вывод о наличии либо отсутствии принципиальной разницы в физиологической активности медных макрочастиц и наночастиц.

В ходе работы был поставлен ряд электрофизиологических опытов с целью установления изменения ряда электрических параметров цитоплазматической мембраны клеток *Nitella flexilis* в ответ на внесение суспензий медных макро- и наночастиц различных концентраций.

В результате исследования установлено, что суспензии медных макро- и наночастиц обладают высокой физиологической активностью, которая выражается в падении мембранного потенциала и повышении проводимости калиевых каналов внутрь- и наружу-направленного тока. При сравнении зависимости величины эффекта внесения суспензий медных частиц от времени экспозиции клетки в суспензии и от концентрации частиц сделан вывод, что минимальное время для получения достоверных различий в характеристиках цитоплазматических мембран составляет 5 минут, а наиболее заметный эффект при внесении суспензий частиц заметен для более высоких концентраций (5 мг/л и 30 мг/л). При сравнении воздействия макро- и наночастиц в аналогичных условиях проведения опыта (одинаковое время экспозиции и концентрация суспензий) наночастицы показывают больший эффект на изменение проводимости потенциал-чувствительных калиевых каналов, при этом достоверных различий между макро- и наночастицами на изменение мембранного потенциала не было отмечено.

Полученные экспериментальные данные имеют фундаментальное значение в вопросах установления физиологических активностей наноматериалов, а также практическое значение в экологии в вопросах установления потенциальной токсичности наноматериалов для растений.

**РЭФЕРАТ**

Работа 36 с, 5 часткаў, 15 малюнкаў, 5 табліц, 16 крыніц

НАНАЧАСЦІЦЫ, КЛЕТАЧНАЯ МЕМБРАНА, МЕДЗЬ, ПАТЭНЦЫАЛ-АДЧУВАЛЬНЫЯ КАЛІЕВЫЯ КАНАЛЫ, ЭЛЕКТРЫЧНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКІ КЛЕТАЧНЫХ МЕМБРАН, *NITELLA FLEXILIS*.

Аб’ектам даследавання з’яўляюцца інтернадальныя клеткі харавай вадараслі *Nitella flexilis*.

Мэта работы – параўнаць ўплыву ўздзеяння завісяў медных макра- и наначасціц на электрычныя характарыстыкі цытаплазматычных мембран клетак харавай водараслі *Nitella flexilis* и на аснове атрыманых дадзеных зрабіць выснову аб наяўнасці або адсутнасці прынцыповай розніцы ў фізіялагічнай актыўнасці медных макрачасціц і наначасціц.

У ходзе работы быў пастаўлены шэраг электрафізіялагічныя досведаў з мэтай ўстанаўлення змены электрычных параметраў цытаплазматычнай мембраны клетак *Nitella flexilis* ў адказ на ўнясенне завісяў медных макра- і наначасціц розных канцэнтрацый.

У выніку даследавання ўстаноўлена, што завісі медных макра- і наначасціц валодаюць высокай фізіялагічнай актыўнасцю, якая выяўляецца ў падзенні мембраннага патэнцыялу і павышэнні праводнасці каліевае каналаў внутрь- і вонкі-накіраванага току. Пры параўнанні залежнасці велічыні эфекту ўнясення завісяў медных часціц ад часу экспазіцыі клеткі ў завісі і ад канцэнтрацыі часціц зроблена выснова, што мінімальны час для атрымання дакладных адрозненняў у характарыстыках цытаплазматычных мембран складае 5 хвілін, а найбольш прыкметны эфект пры унясенні завісяў часціц мае месца для больш высокіх канцэнтрацый (5 мг/л і 30 мг/л). Пры параўнанні ўздзеяння макра- і наначасціц ў аналагічных умовах правядзення досведу (аднолькавы час экспазіцыі і канцэнтрацыя завісяў) наначасціцы паказваюць большы эфект на змяненне праводнасці патэнцыял-адчувальных каліеевых каналаў, пры гэтым дакладных адрозненняў паміж макра- і наначасціцамі на змяненне мембраннага патэнцыялу не было адзначана.

Атрыманыя эксперыментальныя дадзеныя маюць фундаментальнае значэнне у пытаннях устанаўлення фізіялагічных актыўнасцяў нанаматэрыялаў, а таксама практычнае значэнне ў экалогіі ў пытаннях ўстанаўлення патэнцыйнай таксічнасці нанаматэрыялаў для раслін.

**ABSTRACT**

Work 36 с, 5 parts, 15 pictures, 5 tables, 16 sources

NANOPARTICKLES, CELL MEMBRANE, COPPER, POTENTIAL-GATED POTASSIUM CHANNELS, ELECTRICAL CHARACTERISTICS OF CELL MEMBRANES, *NITELLA FLEXILIS*.

The subject of the study are internodal cells of keratinous algae *Nitella flexilis*.

The purpose of this work is to compare the effects of suspensions of copper macro- and nanoparticles on the electrical characteristics of cytoplasmic membranes of *Nitella flexilis* algae cells and, on the basis of the data obtained, to conclude that there is a difference in the physiological activity of copper macroparticles and nanoparticles.

In the course of the work, a number of electrophysiological experiments were performed to determine the change of electrical parameters of the cytoplasmic membrane of *Nitella flexilis* cells in response to the addition of copper macro- and nanoparticles suspensions in various concentrations.

As a result of the study it was found that suspensions of copper macro- and nanoparticles possess high physiological activity, which is expressed in the decline of the membrane potential and in the increase of the conductivity of the potassium outward- and inward-rectifying channels. When comparing the dependence of the magnitude of the effect of introducing copper particles’ suspensions on the exposure time of the cell in suspension and on the particle concentration, it was concluded that the minimum time for obtaining significant differences in the characteristics of cytoplasmic membranes is 5 minutes, and the most perceptible effect when introducing suspensions of particles is noticeable for higher concentrations (5 mg/L and 30 mg/L). When comparing the effects of macro- and nanoparticles under similar experimental conditions (the same exposure time and concentration of suspensions), nanoparticles show a greater effect on the change in the conductivity of potential-sensitive potassium channels, and no significant differences between macro- and nanoparticles were observed in the change in the membrane potential.

The obtained experimental data are of fundamental importance in the issues of establishing the physiological activities of nanomaterials, as well as practical importance in ecology in questions of determining the potential toxicity of nanomaterials for plants.

# ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Amp – усилитель

C – емкость

CPU – персональный компьютер/центральный процессор

R – сопротивление

wt% – массовая доля

ΔE – разность электрических потенциалов

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

АФК – активные формы кислорода

БАВ – биологически активное вещество.

ИПВ – искусственная прудовая вода

МВАХ – мгновенные вольт-амперные характеристики

МП – микропипетка

МЭ – микроэлектрод

ФР – физиологический раствор

ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

ЭС – электрод сравнения

# 

# ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы становятся все более серьезными факторами загрязнения окружающей среды в связи с ростом распространенности наноматериалов в промышленном производстве. Распространение наночастиц в окружающей среде и доказанная высокая биологическая активность делает их весьма интересным объектом исследований. Тем более на данный момент информации о встречаемости наночастиц в продуктах питания, воде, почве, а также их накоплении и поведении в растениях достаточно мало [5]. В то же время высокая физиологическая активность представляет интерес для фармакологии в плане создания неспецифических антибактериальных препаратов, способных составить альтернативу антибиотикам [16]. Это делает наночастицы крайне интересным объектом в биологии растений.

В первую очередь наночастицы в живом организме проявляют свою биологическую активность при взаимодействии с клеточными мембранами, таким образом, именно изменения состояния цитоплазматической мембраны играют ключевую роль в проявлении биологической активности наночастиц. Таким образом, резонно использовать методы оценки состояния клеточной мембраны с целью определения эффектов, оказываемых наночастицами. В данно работе применяется методика фиксации мембранного потенциала с использованием микроэлектродной техники, позволяющей быстро и с высокой чувствительностью оценить влияние различных факторов на активность цитоплазматической мембраны.

В настоящее время существует ряд альтернативных методик фиксации мембранного потенциала, таких как петч-кламп [3; 4; 11] и одноэлектродная локальная фиксация потенциала [3; 4]. В данной работе применяется метод фиксации потенциала, адаптированный для работы с клетками *Nitella flexilis* [12].

**Цель:** определение влияния медных наночастиц на физиологическое состояние мембран клеток харовой водоросли *Nitella flexilis* методом фиксации потенциала в сравнении с медными макрочастицами.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести опыты по определению влияния суспензий макрочастиц и наночастиц на физиологическую активность мембран клеток *Nitella flexilis* в зависимости от концентрации частиц в суспензии и времени экспозиции клетки в суспензии. Провести для этого ряд экспериментов с использованием микроэлектродной техники для определения изменения мембранного потенциала проводимости потенциал-зависимых калиевых каналов.

2. Сравнить физиологические активности суспензий медных макрочастиц и наночастиц одинаковых концентраций.

**ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**1.1. Характеристика наночастиц. Основные пути проникновения наночастиц в окружающую среду.**

Наночастицами являются изолированные объекты, как правило твердофазные, имеющие диаметр от 1 до 100 нм. Подобные сверхмалые размеры обуславливают ряд специфических свойств наноматериалов, не свойственных веществам того же химического состава, но иной физической природы.

Рост загрязнения наночастицами окружющей среды связан с ростом распрстраненности наноматериалов в жини человека и крупном промушленном производстве. Наночастицы наиболее активно применяются в микроэлектронике (покрытие серебрянми наночастицами элементов микросхем, контактов и т.д.), медицине (медицинские препараты в форме наночастиц обладают повышенной физиологической активностью), лакокрасочной, пищевой промышленности.

В первую очередь биологическую угрозу представляют аэрозоли наночастиц металлов и их оксидов, образующиеся на промышленных производствах. Наиболее распространенными поллютантами являются аэрозоли наночастиц SiO2, Fe2O3 и CuO, причем соединения меди показывают наибольшее токсическое воздействие по сравнению с оксидами железа и кремния [14]. Следует обратить внимание на то ,что даже такой инертный материал, как оксид кремния, в форме наночастиц проявляет биологическую активность. Так же подобный способ проникновения наночастиц в человеческий организм является на данный момент наиболее изученным, в отличие от поступления наночастиц в пище, так как вопрос накопления наночастиц в растениях изучен мало [5]. Наночастицы в форме аэрозолей распространяются вокруг промышленных предприятий, что вызывает загрязнение всей экосистемы в целом, в первую очередь водоемов, откуда уже наночастицы способны накапливаться в живых организмах. Проблема заключается в том, что до сих пор не существует достаточно четких определений ПДК для такого рода поллютантов, что затрудняет оценку экологической безопасности наноматериалов [5].

**1.2. Биологическая активность наночастиц.**

Биологические эффекты наночастиц во многом отличаются от эффектов, вызванных аналогичными материалами в более привычной форме (ионы либо суспензии крупных частиц).

Влияние наночастиц на биологические системамы включает ряд дигнамических взаимодействий между поверхностью наночастиц и биологическими молекулами. Подобные взаимодействия определяют биодоступность наночастиц для организма. Они включают в себя формирование белковой оболочки вокруг наночастиц, обертывание наночастиц на клеточной поверхности, эндоцитоз и внутриклеточный биокатализ [7]. Взаимодействия наночастиц с живыми объектами определяются следующими компонентами состемы наночастица-живой организм:

1. Поверхность наночастиц, характеристики которой определяются составом наночастицы.

2. Взаимодейтсвия твердой и жидкой фаз, за твердую фазу принимается материал наночастицы, за жидкую – окружение ,в котором она находится. Следует учитывать, что наночастица способна вызывать серьезные изменения окружающего ее раствора.

3. Контактная зона взаимодействия жидкости, твердого вещества наночастицы и биологического субстрата (например – клеточной мембраны).

Наночастицы способны неспецифически сорбироваться на поверности клеток за счет характеристик своей поверхности, таких как заряд, шероховатость, гидрофобность [7]. Так же некоторые наночастицы способны сорбироваться на клетке специфично и вызывать таким образом реакцию эндоцитоза, однако для многих наночастиц описана возможность проникновения в клетку через плазмалемму без задействования эндоцитоза вообще [7].

Показано цитотоксическое действие наночастиц металлов и их оксидов на клетки различных типов. Для человека в первую очередь важено воздействие на клетки эпителия дыхательных путей. Наночастицы способны проникать сквозь клеточные мембраны, подобно липофильным соединениям, и оказывать токсическое воздействие в следствие генерации АФК и возникновении оксидативного стресса. При этом действие оксида меди на эпителиоциты было подобно воздействию избыточных концентраций H2O2 [8].

Так же отмечен бактериоцидный и бактериостатический эффект на ряд бактериальных организмов. В данном случае подобное действие связывается с повреждением клеточной стенки бактерий наночастицами, так как была показана лучшая выживаемость грамотрицательных бактерий по сравнению с грамположительными, однако каким образом наночастицы нарушают структуру муреиновой оболочки, на данный момент достоверно не известно. В данном случае наночастицы выступают в роли потенциальных неспецифических заменителей антибиотиков, особенно при лечении инфекций, вызванных грамположительными бактериями [16]. На рисунке ниже показано сравнение антимикробной активности суспензий медных наночастиц различной концентрации и хитозана, одного из распространенных неспецифических антибактериальных агентов:

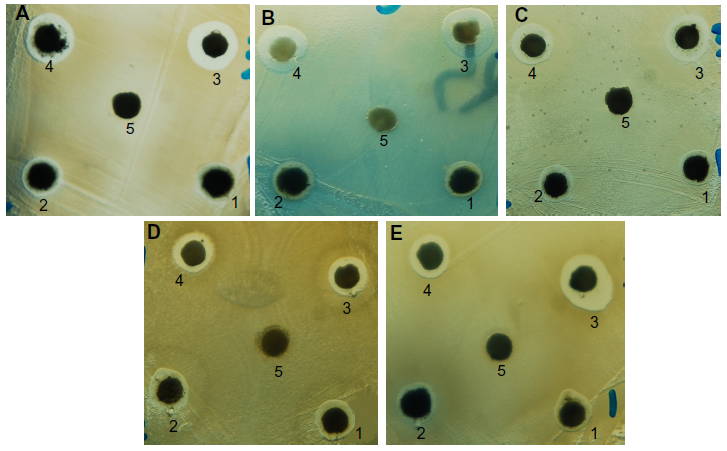


Рисунок 1.1. Антимикробная активность медных наночастиц различных концентраций в сравнении с хитозаном, светлая кайма вокруг бумажного круга с раствором действующего вещества – зона ингибирования роста микроорганизмов на питательном субстрате. A – метилин-резистентный штамм Staphylococcus aureus, B – Pseudomonas aeruginosa, C – Salmonella choleraesuis, D – Bacillus subtilis, E – Candida albicans. 1-4 – наночастицы в концентрациях 0,05 wt%, 0,1 wt%, 0,2 wt%, 0,5 wt% соответственно, 5 – хитозан [16].

Как уже упоминалось выше, исследований, показывающих физиологическое действие наночастиц на растения, на данный момент мало, однако можно предполагать, что наночастицы [5], помимо токсического эффекта, вызванного своим химическим составом, будут оказывать дополнительное действие за счет накопления в растительной клеточной стенке.

**1.3 Роль меди в растительных организмах. Токсикологическая характеристика меди.**

Суспензии медных макро- и наночастиц создают условия избытка меди для харовой водоросли, соответственно, для данной работы интересно отметить особенности токсического воздействия данного металла на растение, т.к. они, скорее всего, будут проявляться в ходе эксперимента.

Избыточное накопление меди в окружающей среде связано с человеческой деятельность, особенно с такими ее видами, как использование в сельском хозяйстве медьсодержащих удобрений, тяжелая промышленность, добывающая промышленность, сброс недостаточно очищенных отходов бытового и промышленного происхождения [7; 14].

Медь – это жизненно важный для нормального роста и развития растений микроэлемент, который в то же время является потенциально токсичным. Медь является кофактором многих металлопротеинов, однако избыток в клетке, достигаемый при уже относительно небольших концентрациях меди в среде, вызывает ряд проблем для растения [8]. Таким образом медь с экологической точки зрения часто относят к весьма опасным поллютантам, которые достаточно легко накапливаются в растении, а биодеградация этого элемента затруднительна [15].

В то же время в растительных клетках существует ряд механизмов, призванных предотвратить токсичное действие ряда элементов, в том числе и меди [8]. Они предполагают предотвращение накопления ионов меди в свободной, токсичной форме (пути детоксикации металлов), и целенаправленная доставка меди в те клеточные компартменты, где этот элемент используется в качестве кофактора.

Физиологически активна медь в состоянии ионов Cu+ Cu++. Медь необходима в качестве компонента систем фотосинтеза, клеточного дыхания в митохондриях, гормональной сигнализации, кофактора ряда оксидоредуктаз [15], метаболизме клеточной стенки, расходуется при клеточном ответе на оксидативный стресс [7].

В случае недостатка меди в субстрате растения проявляют ряд симптомов недостатка питания, которые в основном связаны с дефектами развития молодых листьев и репродуктивной системы [8; 15].

Окислительно-восстановительные свойства меди, которые и делают данный элемент жизненно важным, в то же время определяют его токсичность [8; 14]. Цикл окисления-восстановления между двух- и одновалентным ионами меди может вызвать образование гидроксил-радикалов, которые в свою очередь вызывают окислительный стресс, поражение ДНК, липидов и большинства других органических молекул клеток, а в конечном итоге оказывает угнетение работы и развития целых органов растения [15], в первую очередь корневой системы.

В сверхвысоких концентрациях медь способна вызвать такие глубокие эффекты, как хлороз и полная дехлорофиллизация листьев, остановка роста корней, некроз тканей [8].

Среднее содержание меди в растительных тканях составляет 10 мкг/г сухой массы. Нормальные концентрации меди в почве/субстрате для растений колеблются от 10-6 до 10-9 М [8], но даже при оптимальных концентрациях металла отмечена его биотрансформация до неактивных форм и выведение из минерального транспорта.

Эффекты нехватки меди, вызванные в дефектах развития листьев, связаны с тем, что медь является важным компонентом биосинтеза пластоцианина, одного из компонентов ФС I. Так же выявлена связь между нехваткой меди и снижением количества/активности ФС II.

Токсический эффект избытка меди на фотосинтетический аппарат проявляется в большей степени при на ФС II, нежели на ФС I. Ионы меди атакуют сайты донора и акцептора электрона в фотосистеме, что вызывает предотвращение реакции фотолиза воды.

В первую очередь токсичность меди проявляется в нарушении функции фастительной ЦПМ, что связано с повышением проводимости ЦМП для множества ионов и макромолекул и снижением стабильности мембраны в целом [15]. Подобные эффекты поражения ЦПМ достаточно легко отследить за счет электрофизиологических методов, в первую очередь повышение проводимости ионных каналов и изменение мембранного потенциала будут свидетельствовать об изменениях в состоянии ЦПМ.

На данный момент собрано мало информации о том, как происходит транспорт ионов меди в растении. Однако установлено несколько систем, в целом соответствующим системам транспорта других ионов тяжелых металлов. Следует учитывать, что большинство транспортеров, специфичных к ионам меди, будут осуществлять преимущественно транспорт либо одно-, либо двухвалентого катиона.

Медные АТФазы P-типа. Один из представителей P-АТФаз тяжелых металлов, обнаруженных у ряда живых организмов, в том числе и растительных. Существует несколько видов подобных АТФаз, высокоспецифичных к меди. К ним относят членов HMA-подсемейства, охарактеризованного у *Arabidipsis thaliana* и *Oryza sativa* [8]. Среди восьми HMA-транспортеров существует три, ответственных за транспорт меди, один из которых чувствителен к действию этилена, что указывает на вовлеченность транспорта меди в стрессовый ответ растения, причем как и на токсический эффект самого иона, так и на сторонние стрессоры (типа оксидативного).

Медные СОРТ-транспортеры. В арабидопсисе обнаружено пять белков данного семейства. Данные белки имеют N-концевой метионин- и гистидин-богатый домен, ответственный за специфичное связывание с ионами меди. СОРТ1 и СОРТ2 белки показывают наибольшую специфичность к ионам меди, причем СОРТ1 – к одновалентным ионам [8].

СОРТ1-белок обнаружен в корнях, зародыше растений, что говорит о важности меди в процессах роста и развития (а именно лимитированных концентраций иона) [8].

Медные шапероны относятся к относительно недавно открытому семейству низкомолекулярных белков, металлошаперонов [15], и ответственны за цитоплазматический транспорт соответствующих ионов металлов.

Механизмы устойчивости к медным ионам, как и к большинству тяжелых металлов, связаны с переводом меди в физиологически неактивную форму (формирование хелатных комплексов), накоплением избыточного количества меди в вакуолях и регуляции активного транспорта медных ионов за счет специфических транспортеров [8].

Токсическую активность медь способна проявлять в весьма низких концентрациях, как уже упоминалось выше. Было показано понижение активности корней кукурузы в ответ на внесение растворов медного купороса различных концентраций (от 1 до 10000 мкМ/л) [15], при этом активность корней в приведенном опыте снижалась уже при минимальных концентрациях меди.

**1.4 Транспортные системы цитоплазматической мембраны. Краткая характеристика калиевых каналов. Потенциал-зависимые калиевые каналы.**

Калиевые каналы – суперсемейство трансмембранных белков, ответственных за пассивный транспорт ионов калия через цитоплазматическую мембрану [9]. Являются наиболее распространенными транспортными мембранными белками, обеспечивающими регуляцию осмотического давления, мембранного потенциала, а так же сопряженного транспорта других ионов в клетке. Встречаются у представителей всех клеточных живых организмов [9; 13].

Суперсемейство калиевых каналов включает в себя группу потенциал-зависимых калиевых каналов, то есть группу каналов, активация которых происходит при определенных значениях мембранного потенциала. Данный тип калиевых каналов наиболее интересен в рамках данной работы, так как за счет применения методики фиксации мембранного потенциала мы можем вызвать активацию отдельной группы потенциал-чувствительных каналов и оценить ее проводимость.

Потенциал-зависимые калиевые каналы разделяются на две большие группы: калиевые каналы наружного выпрямления (либо калиевые каналы наружного тока), ответственных за выход ионов калия наружу, обеспечивая восстановление мембранного потенциала, активируются при деполяризации, и калиевые каналы внутреннего выпрямления (калиевые каналы внутрь-направленного тока), активируемые при гиперполяризации мембраны и обеспечивающие аккумуляцию калия [13]. Данные каналы так же относятся к семействам однонаправленных-калиевых каналов и неспособны осуществлять транспорт калия в противоположных направлениях, как например часть неиндуцибельных/независимых калиевых каналов [6].

Широчайшая распространенность калиевых каналов в природе и их преобладание на мембране связано с тем, что калий является ключевым макроэлементом, обеспечивающим регуляцию осмотического давления в клетке, фотосинтеза, водного баланса и стабильности белков [13].

Калиевый канал – это тетрамер, состоящий из четырех альфа-субъединиц. Каждая субъединица имеет шесть трансмембранных доменов, формирующих гидрофобное ядро канала (нумеруются с S1 по S6) [13]. Внутренняя поверхность канала гидрофильна и образована заряженными аминокислотами. На S4-домене имеются группы положительно заряженных аминокислот, определяющих потенциал-чувствительность канала, а поворот между пятым и шестым доменами (пороформирующий, Р-домен) ответственен за селективность калиевого канала [13].

Механизм действия и специфичности ионного канала обусловлен тем, что ион проходит через канал в дегидратированном состоянии [6; 13]. Полярные группы аминокислот, в первую очередь на селективном фильтре (поре канала) соответствуют структуре определенного гидратированного иона и неспособны эффективно заместить молекулы воды в гидратной оболочке тех ионов, которые не соответствуют данному каналу.

**1.5. Общие принципы устройства установок для электрофизиологических исследований.**

Существует три основных способа применения микроэлектродной техники в физиологии:

1. Измерение мембранного потенциала.

2. Подведение электрического тока внутрь клеток.

3. Подведение в клетку «микроструи» раствора какого-либо действующего вещества. Эта группа методов получила название ионофорез или микроэлектрофорез и является самым быстрым способом доставки действующего вещества в клетку. МЭ одновременно выполняет функции доставки экспериментального раствора в клетку и измерения мембранного потенциала/тока за счет наличия в нем нескольких каналов [1].

Не следует забывать, что в клетку может вводится одновременно несколько МЭ, в зависимости от задач эксперимента. Ниже будет рассмотрен пример типичной установки для выполнения микроэлектродных исследований с одним МЭ (рис 1.1).

АЦП

CPU

Amp

МЭ

ЭС

1

Рисунок 1.2. Схема внутриклеточной регистрации мембранного потенциала [1]. 1 – клетка, МЭ – микроэлектрод, ЭС – электрод сравнения, Amp – усилитель, АЦП – аналого-цифровой преобразователь, CPU – центральный процессор/компьютер/регистрирующая аппаратура.

Однако данная система не обеспечивает определения токов, проходящих через мембрану в условиях фиксации мембранного потенциала. Как упоминалось выше, первая методика, решившая данную проблему – друхэлектродная фиксация напряжения (two microelectrode voltage clamp), разработанная и использованная впервые Ходжкином и Хаксли для фиксации мембранного потенциала на аксоне кальмара [1]. Схема работы данной системы представлена ниже.

МЭ

ЭС

1

Amp

АЦП

P-Amp

CPU

Рисунок 1.3. Схема работы установки для двухэлектродной фиксации мембранного потенциала. 1 – токоподающий электрод, ЭС – электрод сравнения, МЭ – микроэлектрод, P-Amp – предусилитель, Amp – усилитель, АЦП – аналого-цифровой преобразователь, CPU – центральный процессор/компьютер.

Для выполнения задачи фиксации потенциала в схему вводится токоподающий электрод (1). Исследователь задает (вручную на усилителе либо через специальное ПО) необходимое значение мембранного потенциала. Ток подается через мембрану клетки до момента достижения необходимого потенциала. В подобных условиях клетка стремится вернуть нормальное для нее значение ΔE, изменяя проводимость мембраны. Любые изменения мембранного потенциала фиксируются микроэлектродом и через систему усиления, по принципу обратной связи, изменяется значения тока фиксации, тем самым продолжая удерживать значение ΔE на необходимом значении.

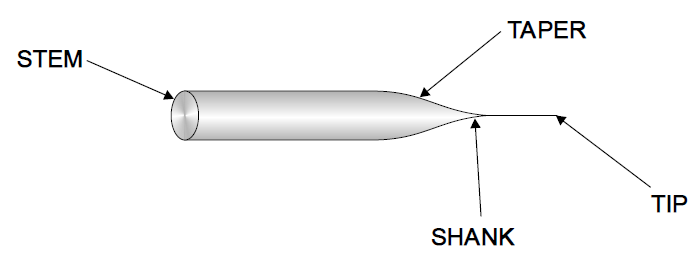
Недостатком данного метода является необходимость введения двух микропипеток в клетку. Данная проблема была решена в ходе разработок альтернативных методик фиксации ΔE, таких как patch-clamp, two-barrel microelectrode voltage clamp, single microelectrode voltage clamp, о которых речь пойдет ниже.

**1.6. Основные подходы к постановке микроэлектродных исследований.**

Ключевой момент в постановке электрофизиологического опыта – изготовление микроэлектрода, который представляет собой полуэлемент с зафиксированной на нем стеклянной микропипеткой [10; 12].

1

2



3

4

Рисунок 1.4. Обозначение отдельных частей МЭ.1 – ствол, 2 – конус, 3 – хвост, 4 – кончик.

При планировании эксперимента следует учитывать специфику объекта, размеры клетки, правильно подобрать растворы электролита и набор измерительных приборов (или же в наше время чаще – набор программ либо их компонентов). Любые микроэлектродные исследования сопряжены с механическим стрессом для клетки. Его следует свести к минимуму сокращением времени проведения различных манипуляций с объектом, избыточного освещения, а так же правильным вкалыванием в клетку [10; 12].

**1.7. Современные методики микроэлектродных исследований.**

Альтернативой двухэлектродной фиксации напряжения на мембране стал patch-clamp. Схема проведения эксперимента с использованием данного метода показана ниже (рис. 1.3).

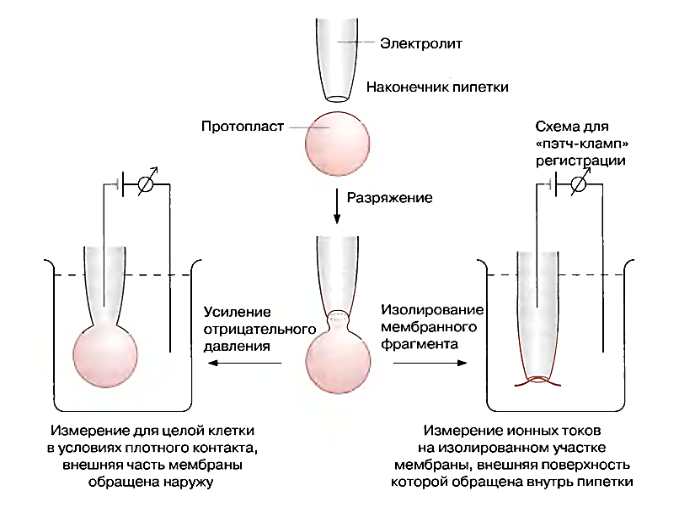


Рисунок 1.5. Способы измерения ионных токов методом patch-clamp [11].

Стеклянная пипетка с диаметром кончика около 1 мкм содержит встроенный микроэлектрод и заполнена электролитом. При создании небольшого разряжения внутри пипетки создается плотный контакт между кончиком пипетки и фрагментом исследуемой мембраны протопласта или клеточной органеллы (например, вакуоли)[3; 4; 11].

При увеличении отрицательного давления мембранный фрагмент под пипеткой разрушается и между микроэлектродом и клеточным содержимым устанавливается изолированный от внешней среды прямой проводящий путь. Таким образом можно измерить токи для всех ионных каналов в мембране (измерение для целой клетки в условиях плотного контакта, внешняя часть мембраны обращена наружу).

Еще один вариант – измерение ионных токов на изолированном участке мембраны, внешняя поверхность которой обращена внутрь пипетки. Поскольку контакт мембраны со стеклом механически очень прочен, находящийся под кончиком пипетки фрагмент можно вырвать из целой мембраны и изолировать. В этом случае можно измерить проводимость только для тех каналов, которые находятся в изолированном фрагменте [3; 4].

Электросхема в целом схожа с таковой у двухэлектродной методики, однако в петч-клампе один микроэлектрод играет роль как измерительного (определение разности потенциалов на мембране), так и токоподающего за счет многократного попеременного переключения МЭ между двумя режимами работы. Ограничения данного метода заключаются в возможности работа исключительно с протопластами, так как строение МЭ не позволяет ему пройти сквозь толщу клеточной стенки.

Данная проблема была решена в методе одноэлектродного вольт-клампа (single microelectrode voltage clamp), суть которого заключается в применении в качестве микропипетки для МЭ стандартной с тонким кончиком, позволяющей пронизывать клеточную стенку. При этом электросхема сходна с петч-кламп (то есть МЭ работает попеременно в двух режимах)[4].

Вариантом двухэлектродной фиксации напряжения является методика two-barrel microelectrode voltage clamp (двуствольный вольт-кламп), суть которой в замене двух МЭ (измерительного и токоподающего) одним двухканальным МЭ. Соответственно один из каналов функционально идентичен измерительному МЭ, второй обеспечивает подачу тока фиксации[3; 4].

**ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**2.1. Оборудование и материалы, применявшиеся в данной работе.**

В данной работе применялись следующие материалы и оборудование:

1. Культура харовой водоросли *Nitella flexilis*.

2. Набор для отбора и подготовки клеток *Nitella flexilis* к работе, включавший в себя:

* дубовые палочки;
* вазелин;
* пинцет;
* ножницы;
* чашки Петри.

3. Набор капилляров для изготовления МЭ и ЭС, установка для изготовления МЭ.

4. Электрофизиологическая установка, включающая в себя:

* бинокулярный микроскоп с системой регулируемого освещения;
* микроманипулятор;
* высокоомный усилитель;
* экранирующий стальной бокс;
* помпа и система капилляров для протока раствора (в данной работе – ИПВ, суспензии наночастиц меди на основе ИПВ с разными концентрациями медных наночастиц);
* экспериментальная камера и фиксатор для нее;
* АЦП;
* компьютер с установленным на нем ПО для работы на данной установке (В381).

Ниже представлена схема работы установки фиксации мембранного потенциала, применяемой в данной работе.

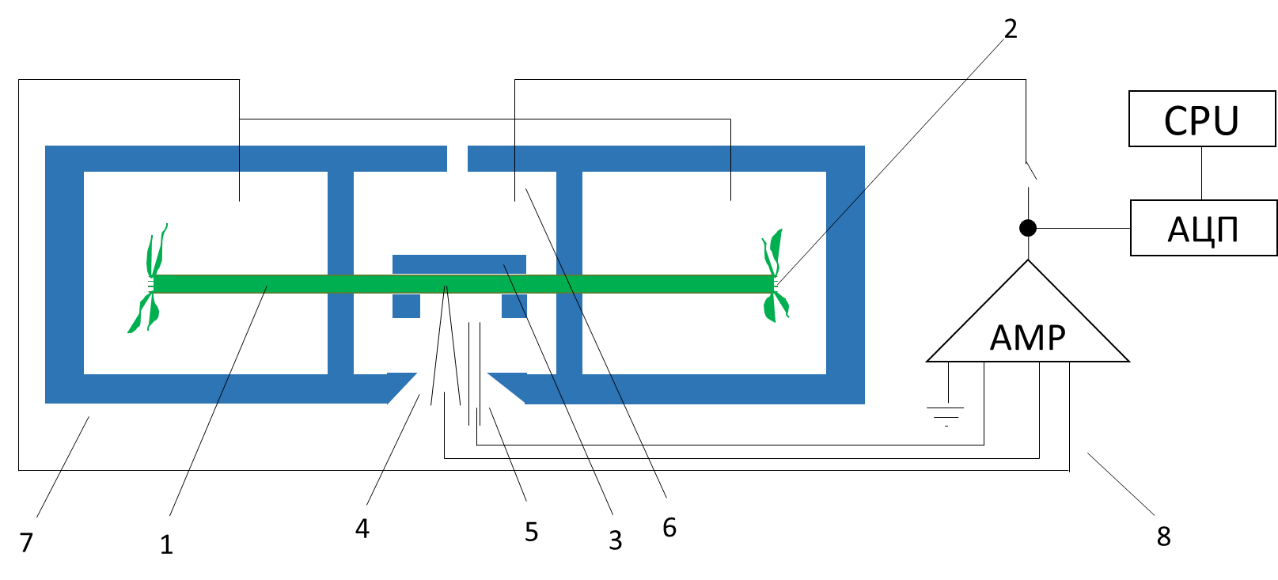


Рисунок 2.1. Схема локальной фиксации потенциалов клеток *Nitella flexilis*. 1 – Клетка харовой водоросли. Имеет открытые плазмодесмы в месте вырезания клетки из таллома (в районе узлов), 2 – узлы таллома, 3 – фиксирующий столик, 4 – МЭ, 5 – ЭС, 6 – токоподающий электрод (расположен в растворе ИПВ), 7 – экспериментальная камера, 8 – заземление, контакты заземления и концевые фрагменты клетки погружены в отсеки, заполненные 0,1 М КСl).

Экспериментальная камера разделена на три отсека. Клетка фиксируется в бороздах между отсеков вазелином, дополнительную фиксацию в центральном отсеке обеспечивает столик. МЭ и ЭС обеспечивают определение мембранного потенциала. Фиксация ΔE осуществляется за счет особенностей строения клеток *Nitella flexilis*. При вырезании клеток из таллома в районе узлов образуются участки с открытыми плазмодесмами (суть внутренняя поверхность ЦПМ соседних клеток). За счет этого сама клетка становится частью электроцепи. Токоподающий электрод работает, как и в любой системе фиксации потенциала, по принципу обратной связи, однако в данном случае он находится вне клетки. Передача тока осуществляется за счет замыкания цепи: токоподающий электрод-клетка-заземление. При этом контакты электрода и заземления изолированы, соответственно ток может пройти исключительно по клетке харовой водоросли, что обеспечивается с высокой эффективностью именно за счет наличия открытых плазмодесм. Раствор с 0,1М КСl в крайних отсеках имитирует клеточную цитоплазму и обеспечивает нормальное прохождение тока и лучшую выживаемость клетки. Таким образом, данная система фиксации мембранного потенциала зависит от строения исследуемого объекта. При замене клетки *Nitella flexilis* на другой объект, не обладающий аналогичным строением, данная установка сможет быть использована только для определения мембранного потенциала.

**2.2 Техника изготовления микропипеток.**

МЭ и ЭС изготавливаются из химически стойкого стекла, имеющего низкий коэффициент теплового расширения. Заготовки для капилляров представляют собой стеклянные трубки с диаметром отверстия 1,5-2 мм (для МЭ) или 0,4-1 мм (для ЭС). Внутри капилляра вдоль стенок расположены стеклянные нити, обеспечивающие равномерное заполнение капилляра раствором электролита. Для изготовления капилляра МЭ заготовку вытягивают на автоматической установке (т.н. микрокузница, или пуллер), осуществляющей равномерное нагревание до определенной температуры и растягивание капилляра. По достижении определенной длины установка рывком разрывает капилляр, тем самым получается два незаполненных капилляра МЭ [12].

В качестве пуллера использовался полуавтоматический пуллер KOPF Model 720 производства компании KOPF Instruments [2], работающий в одноэтапном режиме. В качестве соленоида пуллер укомплектован нихромовой спиралью диаметром 1 мм, закрученной на 2,5 оборота.

Основной трудностью является получение микропипетки с кончиком, достаточно тонким, дабы не вызвать серьезных повреждений клетки, и в то же время достаточно прочным, дабы пробить клеточную стенку клетки харовой водоросли.

**2.3. Техника заполнения, сборки и подготовки миероэлектрода и электрода сравнения к работе.**

В работе использовались хлорсеребряные электроды.

Заполнение МП (микропипетки) производится по следующей схеме:

1. Вводят каплю электролита в торец МП.

2. Ожидают заполнение МП.

3. Производят визуальную оценку качества заполнения МЭ (невооруженным глазом и под микроскопом.

При отсутствии пузырей шприцом завершают заполнение МЭ. [12].

4. Заполненный МЭ закрепляют на пластиковом держателе неполяризующегося полуэлемента.

5. Повторно проверяют собранный МЭ на наличие пузырей. В случае их отсутствия закрепляют МЭ на микроманипуляторе.

Аналогичные действия проводят и с ЭС. Качество сборки электродов проверяют непосредственно при введении их в раствор. Если все выполнено верно, значения ΔE между электродами (до введения МЭ в клетку) не должны превышать 15 мВ и должны быть стабильны.

**2.4. Приготовление растворов, использующихся в работе.**

Растворы готовятся на основе дистиллята, температура на уровне 18-22˚C. В работе применялись следующие растворы:

1. Искусственная прудовая вода (ИПВ), матричный раствор: 10-4 М КCl, 10-3 M NaCl, 10-4 M CaCl2.

2. В качестве электролита использовался 3М раствор KCl.

3. Суспензии медных макро- и наночастиц на основе ИПВ, концентрации частиц указаны ниже (п. 2.8)

4. Ростовой раствор для выращивания *Nitella flexilis*: 2\*10-2M CaCl2, 5\*10-3М NaHCO3, 5\*10-4 KH2PO4, 5\*10-4 Mg(NO3)2.

**2.5. Подготовка объекта исследования.**

*Nitella flexilis* является крайне удобным объектом для проведения ряда исследований, не только электрофизиологических. Ее преимущества в этом плане заключаются в следующем:

* большие размеры отдельной клетки (в работе использовались клетки длиной 5-7 см);
* простота культивирование (легко разводится в питательном растворе);
* высокая чувствительность (информативность) к изменениям условий внешней среды.

Выращивание талломов проводится в стеклянных сосудах с высокими бортами. На дно сосуда заливается агар, формирующий поверхность для посадки клеток. Перед заливом агара на дно укладываются пробки либо иные предметы достаточной массы, способные удерживать агар после застывания на дне сосуда. После застывания и охлаждения агара в сосуд заливается дистиллированная вода, после чего в течении недели рекомендуется не садить водоросль. Делается это с целью высвобождения воздуха из-под толщи агара, дабы предотвратить его отслоение и поднятие в процессе выращивания водоросли. Спустя неделю дистиллят сливается и заменяется питательным раствором. Посадка клеток осуществляется препаровальными иглами, при этом один из концов тяжей таллома погружается на глубину около сантиметра в толщу агара. Питательный раствор должен быть на 5-7 см выше верхушек таллома. В сосуд подсаживают ручейников, выполняющих функцию фильтрации раствора в процессе роста. Оптимальная температура культивирования 20-22 ̊С, требуется освещение лампами дневного света 8-10 ч/сут. В норме талломы дорастают до требуемых размеров в течении 1-1,5 месяцев. За это время необходимо проводить чистку дна сосуда 1-2 раза в неделю по мере загрязнения и соответственно восстановление требуемого объема питательного раствора. Обновление раствора проводится раз в неделю. После выращивания клетки извлекают из сосуда и держат в питательном растворе, откуда уже и отбирают их по мере необходимости.

Для микроэлектродного исследования отбирают вторую и третью интернодальные клетки. Отобранные клетки перемещаются в чашку Петри. Клетки, готовящиеся к эксперименту, препарируют, отрезая от соседних клеток и «боковых» листочков (отростки междоузлий) [12]. Данную операцию следует проводить за несколько часов до проведения эксперимента, дабы клетка вышла из шокового состояния, вызванного механическим вмешательством и инактивации протонной помпы, для чего следует выдержать клетку по крайней мере 6-8 часов в темноте.

Выдержанная клетка помещается в прорези экспериментальной камеры. Прорези предварительно промазываются вазелином. Вазелином же проводится фиксация клетки. В идеале клетку надо укладывать, беря ее пинцетом за обрезанные «листья» и проводить укладку в одно движение. После этого камера заполняется раствором ИПВ (центральный отсек) и КCl 0,1 М (боковые отсеки).

**2.6. Введение МЭ в клетку и последующая регистрация электрических параметров мембраны.**

Собранные МЭ и ЭС фиксируют на микроманипуляторе. Далее манипулятором подводят электроды к экспериментальной камере и вводят их в раствор. Проверяют качество подключения.[12] Если проверка удовлетворительна, подводят МЭ к клетке.

Введение МЭ следует проводить с особой осторожностью, именно на данном этапе существует наибольшая вероятность повредить клетку настолько, что проведение опыта станет невозможным. После введения МЭ освещение микроскопа отключается. Обеспечивается полная темнота в боксе.[12] Дальше, по истечении 15-20-минутного периода можно проводить измерения ΔE мембран клетки.

**2.7. Проведение фиксации мембранного потенциала. Исследуемая физиологическая активность клеток.**

В ходе работы проводилось измерение активности внутрь-выпрямляющих и наружу-выпрямляющих калиевых каналов как одни из наиболее распространенных и изученных транспортных систем ЦПМ клетки, играющих главную роль в поддержании нормального мембранного потенциала клетки. Активация калиевых каналов внутреннего выпрямления (внутрь-направленного калиевого тока) проводилась при фиксации мембранного потенциала на -160мВ, наружного – на -30 мВ. При фиксации проводилось определение МВАХ соответствующих каналов.

**2.8 Ход эксперимента.**

Исследовалось влияние различных суспензий медных наночастиц в различных концентраций на активность калиевых каналов наружного и внутреннего выпрямления. В качестве материала для изготовления взвеси были использованы чистые наночастицы, а также смесь BULK, включающая медные частицы различных размеров, в том числе и фракцию наночастиц. Сравнение эффекта различных суспензий, предположительно, позволит сделать вывод, имеется ли принципиальная зависимость степени воздействия на физиологическую активность клетки от среднего размера частиц в суспензии. Изначально планирование эксперимента было следующим:

На основе ИПВ готовились суспензии наночастиц и BULK следующих концентраций:

1. 0,5 мг/л.
2. 2 мг/л.
3. 5 мг/л.
4. 30 мг/л.

Полученные суспензии хранились при пониженной температуре в течении двух недель. По истечении указанного срока, с целью сохранения высокой активности суспензий, требовалось их повторное приготовление.

Проводилась последовательная смена суспензий с различным содержанием наночастиц (по возрастанию концентраций), без отмыва чистым ИПВ между заменами, временной интервал между сменой растворов – 5 минут. С учетом времени, необходимого на проведение фиксации мембранного потенциала и получения МВАХ, время между сменой растворов составляет 7 минут. После каждой смены раствора ждали стабилизации мембранного потенциала, после чего проводились фиксация мембранного потенциала и съем МВАХ. По достижении последней концентрации (200 мг/л) и съема МВАХ проводился отмыв раствором ИПВ без примесей и заключительный съем МВАХ. В ходе проведения опытов было решено провести дополнительные исследования с целью изучить динамику воздествия наночастиц с течением времени. Для этого использовали суспензию наночастиц одной концентрации и проводили съем МВАХ через определенные промежутки времени.

Опыты с изучение воздействия суспензий медных частиц постоянной концентрации на физиологические активности мембран клеток Nitella flexilis проводились по схеме, описанной выше. Разница заключалась в том, что в ходе эксперимента после ИПВ вносилась суспензия одной концентрации, в которой клетка экспонировалась в течении 20 минут, после чего проводился отмыв. МВАХ определялся на следующих временных промежутках после внесения суспензии медных частиц:

– 3 мин;

– 5 мин;

– 10 мин;

– 15 мин;

– 20 мин.

После 20-минутного экспонирования в суспензии медных частиц клетки отмывались раствором ИПВ и спустя 5 минут после отмыва определялись МВАХ, после чего опыт завершался.

̊**ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Анализировались следующие данные:

– изменение мембранного потенциала клеток *Nitella flexilis* при изменении условий опыта (изменение концентрации суспензии медных частиц либо времени экспонирования в растворе медных частиц);

– изменение токов при активации калиевых каналов внутреннего (-160 мВ) и наружного (-30 мВ) выпрямления;

– кривые МВАХ, полученные при фиксации мембранного потенциала на заданных значениях.

Разность потенциалов на ЦПМ определялась перед каждым замером МВАХ, после чего проводилась фиксация мембранного потенциала. Изменение мембранного потенциала отражено в таблицах ниже.

|  |  |
| --- | --- |
| ΔE, мВ  I, мкА | ΔE, мВ  I, мкА |

Рисунок 4.1. МВАХ калиевых каналов внутреннего выпрямления (фиксация ΔE на -160 мВ) при внесении суспензий макрочастиц (слева) и наночастиц (справа) в различных концентрациях. Даны усредненные значения.

|  |  |
| --- | --- |
| I, мкА  ΔE, мВ | I, мкА  ΔE, мВ |

Рисунок 4.2. МВАХ калиевых каналов наружного выпрямления (фиксация ΔE на -30 мВ) при внесении суспензий макрочастиц (слева) и наночастиц (справа) в различных концентрациях. Даны усредненные значения.

Сравнение кривых МВАХ калиевых каналов ЦМП клетки харовой водоросли свидетельствует о повышении проводимости калиевых каналов внутрь- и наружу направленного тока, что говорит о физиологической активности суспензий медных частиц, при этом наночастицы вызывают большее повышение проводимости калиевых каналов. Для точной оценки изменения проводимости каналов проводилось сравнение максимальных значений токов калиевых каналов внутреннего и наружного выпрямления.

При сравнении эффекта внесения суспензий медных нано- и макрочастиц можно отметить, что наночастицы оказывают более значительное влияние на проводимость калиевых каналов по сравнению с макрочастицами, однако достоверные различия наблюдаются лишь при высокой концентрации суспензий медных частиц. Так же следует отметить наличие эффекта необратимости действия медных частиц, о чем свидетельствует дальнейшее повышение проводимости калиевых каналов после отмыва клетки раствором ИПВ.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе выполнения данной работы были выполнены следующие задачи:

– подготовка материала для исследований (выращивание водоросли *Nitella flixilis*);

– постановка опытов с экспонированием клеток харовой водоросли в сусензиях медных макро- и наночастиц с цеью определения физологического эффекта суспензий в зависимости от времени экспонирования и концентрации частиц;

– проведен анализ полученных данных, а именно изменения потенциала покоя, входных токов при фиксации мембранного потенциала на значениях -30 и -160 мВ, анализ кривых МВАХ при фиксации мембранного потенциала на значениях -30 и -160 мВ, проведено сравнение эффекта внесения суспензий макро- и наночастиц на активности мембран клеток харовой водоросли на основе внутрь- и наружу-направленных токов.

По итогам исследования были сделаны следующие выводы:

1. Суспензии как макро-, так и наночастиц демонстрируют высокую физиологическую активность и вызывают изменения характеристик ЦПМ клеток харовой водоросли уже при минимальных концентрациях (0,5 мг/л) и спустя короткий промежуток времени (3 мин), демонстрируя при этом в ряде опытов эффект необратимости (падение мембранного потенциала и повышение проводимости калиевых каналов наблюдается после отмыва клетки раствором ИПВ).
2. При сравнении эффекта макро- и наночастиц более информативными являются данные о МВАХ и внутрь и наружу-направленных токах калиевых каналов, а не изменение мембранного потенциала. При анализе кривых МВАХ и эффекта воздействия суспензий частиц меди разной природы, концентрации и различном времени экспонирования показаны заметные различие между макро- и наночастицами.
3. Наночастицы обладают более высокой физиологической активностью в сравнении с макрочастицами, что демонстрируется более значительным повышением проводимости калиевых каналов наружного и внутреннего выпрямления, при этом наиболее показательной является концентрация 30 мг/л. При воздействии на клетку суспензиями в низких концентрациях (0,5 и 2 мг/л) в части экспериментов наблюдалось даже повышение абсолютного значения мембранного потенциала, что говорит о способности клетки адаптироваться к по крайней мере кратковременному воздействию суспензий медных частиц в небольших концентрациях (увеличение мембранного потенциала наблюдалось в промежутке 3-10 минут, после чего абсолютное значение мембранного потенциала понижалось).

**CПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Huxley A.F. The quantitative analysis of excitation and conduction in nerve / A.F. Huxley // Les Prix Nobel. – 1963. – Vol. 1963. – P. 242–260.

2. Model 720 Needle Pipette Puller, Instruction Manual // David Kopf Instruments. – P. 22.

3. Plant electrophysiology: signaling and responses. Plant electrophysiology / ed. A.G. Volkov. – Heidelberg ; New York: Springer, 2012. – 377 p.

4. Plant electrophysiology: theory and methods. Plant electrophysiology / ed. A.G. Volkov. – Berlin ; New York: Springer, 2006. – 508 p.

5. Scheringer M. Nanoecotoxicology: environmental risks of nanomaterials / M. Scheringer // Nature Nanotechnology. – 2008. – Vol. 3. – Nanoecotoxicology. – № 6. – P. 322–323.

6. Sharma T. The role of K+ channels in uptake and redistribution of potassium in the model plant Arabidopsis thaliana / T. Sharma, I. Dreyer, J. Riedelsberger // Frontiers in Plant Science. – 2013. – Vol. 4.

7. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface / A.E. Nel [et al.] // Nature Materials. – 2009. – Vol. 8. – № 7. – P. 543-557.

8. Yruela I. Copper in plants / I. Yruela // Brazilian Journal of Plant Physiology. – 2005. – Vol. 17. – № 1. – P. 145-156.

9. Кузьменков А.И. Разнообразие лигандов калиевых каналов и место токсинов скорпионов среди них / А.И. Кузьменков, А.А. Василевский, Е.В. Гришин // Успехи биологической химии. – 2015. – Vol. 55. – P. 289-350.

10. Первис Р. Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза : в 1 vols. / Р. Первис. – Мир, 1983. – Vol. 1-1.

11. Хелдт Г.В. Биохимия растений / Г.В. Хелдт. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 471 p.

12. Юрин В.М. Методические указания к лабораторным работам по специальному практикуму, раздел «Биоэлектрогенез растений» / В.М. Юрин, А.И. Соколик, В.В. Демидчик. – Минск: БГУ, 1997. – 28 p.

13. Distributed Structures Underlie Gating Differences between the Kin Channel KAT1 and the Kout Channel SKOR / J. Riedelsberger [et al.] // Molecular Plant. – 2010. – Vol. 3. – № 1. – P. 236-245.

14. Fahmy B. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells / B. Fahmy, S.A. Cormier // Toxicology in Vitro. – 2009. – Vol. 23. – № 7. – P. 1365-1371.

15. Liu J.J. Effects of copper on leaf membrane structure and root activity of maize seedling / J.J. Liu, Z. Wei, J.H. Li // Botanical Studies. – 2014. – Vol. 55. – № 1.

16. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles / M. El Zowalaty [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2013. – P. 4467.