## ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИЙ НАУК

На правах рукописи

Суслов Максим Алексеевич

## РЕАКЦИЯ ЭНДОМЕМБРАННОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТОК И ПРОЦЕССА МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВОДООБМЕНА В РАСТЕНИЯХ НА ДАВЛЕНИЕ

03.01.02 – биофизика

диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор физ.-мат. наук, профессор А.В. Анисимов

### ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДАВЛЕНИЯ И	
ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ И ВЛИЯНИИ ДАВЛЕНИЯ НА	
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЬЕКТЫ	10
1.1. Физические характеристики давления	10
1.2. Влияние давления на вязкость, времена магнитной релаксации и	
коэффициент диффузии воды и водных растворов	12
1.3. Влияние давления на метаболическое равновесие и скорость	
биохимических реакций	16
1.4. Давление как движущая сила переноса веществ	18
1.5. Корневое давление. Представления о механизмах создания	
корневого давления	21
1.6. Плазмодесмы и регуляция симпластного транспорта	25
1.7. Физиологическое влияние давления на биологические организмы	28
1.8. Давление как фактор переноса сигнальной информации	32
1.9. Итоги литературного обзора	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Объекты исследования	39
2.2. Техника создания давления	40
2.3 Методы определения тепловыделения и дыхания	42
2.4. Электронная и световая микроскопия	43
2.5. Основы ЯМР диффузометрии. Методика ЯМР измерений	43
2.6. Методы оценки проницаемости мембран	48

2.7. Характеристики ЯМР-диффузометра 54
2.8. Статистическая обработка 57
ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 58
3.1 Влияние давления на рост растений кукурузы и структурную
организацию клеток корней кукурузы 58
3.1.1. Влияние давления на рост растений кукурузы 58
3.1.2. Влияние давления на структурную организацию
эндомембранной системы клеток корней кукурузы 61
3.2. Влияние внешнего давления на водный перенос в растениях.
Фактор газового компонента 71
3.2.1. Сравнительный анализ особенностей влияния внешнего
давления до 4 МПа на магнитную релаксацию воды клеток
корня кукурузы и суспензии клеток хлореллы 72
3.2.2. Особенности диффузионных затуханий намагниченности
воды в клетках корней кукурузы (Zea mays L.) при действии
давления77
3.3. Влияние давления на трансмембранный путь переноса воды в
корне растения
3.4. Реакция на внешнее давление симпластной системы переноса
воды в растениях
3.5. Вероятная схема модуляции давлением проводимости
плазмодесм, применительно к механизмам изменения тургорного
давления
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 108
ВЫВОДЫ110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 112

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ДЗ диффузионное затухание
- КБ контрактильные белки
- КС клеточная стенка
- ПД плазмодесмы
- РЗ релаксационное затухание
- ШС шейное сужение
- ЭМ электронная микроскопия
- ЭС эндоплазматическая сеть
- ЯМР ядерный магнитный резонанс

#### введение

Постановка проблемы и её актуальность. Процессы транспорта воды в растениях выполняют важную роль в обеспечении роста и продуктивности 1983). (Kramer, Однако, несмотря на фундаментальную и прикладную актуальность исследований механизмов транспорта воды, до настоящего времени нет устойчивых представлений о комплексе движущих сил переноса водных растворов, ИХ регуляции, взаимосвязей при сезонных переключениях. Гидродинамическая регуляторная система растений работает В широком диапазоне влажности и температур внешней среды, что реализуется через систему параллельно функционирующих, переключающихся путей и движущих сил переноса, механизм обратных связей (Анисимов и др., 2014). В числе главных вопросов, какие факторы и какие конструктивные элементы гидросистемы растения участвуют в организации и функционировании феномена транспорта воды? К числу главных конструктивных элементов гидросистемы клеточного уровня относятся мембраны, плазмодесмы, клеточные стенки. Очевидно, что в генерации движущей силы переноса воды выступает фактор давления в разных проявлениях (тургорное, осмотическое, капиллярное, его корневое, транспирационное). В растениях значения давления могут достигать 5 МПа (в замыкающих клетках устьиц), для галофитов до 15 МПа, до -12 МПа давление натяжения водных нитей в стволах деревьев (Holbrook, Zwienieck, 2008). Есть и впечатляющие оценки в 100 МПа (Cosgrove, 1993). Изменение давления в клеточных компартментах лежит в основе регуляции множества физиологических процессов: устьичных движений (Ache et al., 2010), роста (Abe, Horikoshi, 1995), настий (Вайнар, 1987). В зависимости от вида растения, динамический диапазон водного потенциала клеток может изменяться на порядок величины от -0.5 МПа в норме до -4 - (-5) МПа при сильном обезвоживании (Galmés et al., 2011). Одной из активно обсуждаемых, является роль тургорного давления в обеспечении динамики роста клеток растяжением (Derksen, 1996; Messerli et al., 2000; Plyushch et al., 1995; Zonia, Munnik, 2007; Zonia, Munnik, 2009). Часть авторов придерживается модели, в которой рост клеток поддерживается, среди прочих причин, периодическими изменениями тургорного давления (Zonia, Munnik, 2011; Hill et al., 2012). Противники этой модели ссылаются на экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что колебания скорости роста клеток сохраняется и при постоянстве тургорного давления (Winship et al., 2010; Winship et al., 2011; Kroeger et al., 2011; Kroeger, Geitmann, 2012). Большинство исследований по изучению влияния давления на биологические объекты клеточного и субклеточного уровня, касается в основном давлений от 100 МПа и выше (Rivalain, et al., 2010). Изучение влияния давления физиологического диапазона, по крайней мере до 5 МПа, на растения, представляет интерес с точки зрения выяснения механизмов движущих сил и регуляции массового переноса воды, в том числе, при сезонных переключениях климата (Borghetti et al., 1993), быстрой передачи импульсами давления сигнальной информации по растению (Холодова и др., 2006), влияния на метаболизм через модификацию структурной организации эндомембранной системы клеток (Абдрахимов и др., 2013). Результаты изучения влияния давления физиологического диапазона на механизмы водного переноса на клеточном и субклеточном уровнях, весьма ограничены. Отчасти это связано с методическими трудностями регистрации характеристических параметров, непосредственно во время приложения давления. В то же время, с наличием данных о влиянии фактора давления на растения, решение ряда вопросов И, частности, вопроса связано В 0 явлении автоколебательного режима корневого давления. Широкий диапазон изменения величины давления, разнообразие его ролей, вызывают постановку вопроса: может ли давление в гидросистеме растения выполнять функции регулятора транспорта воды? Перспективным приемом получения ответа на вопрос, представляется анализ реакции гидродинамической системы растения на действие выступающего В качестве адекватного возмущения, внешнего давления, выводящего исследуемую систему из положения равновесия.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы – установить, влияет ли давление физиологического диапазона на эндомембранную систему клеток и межклеточный перенос воды, через определяющие конструктивные элементы гидросистемы растения (мембраны, плазмодесмы, клеточные стенки). Для достижения указанной цели ставились следующие **задачи**:

**1.** Разработать технику подачи на объект исследования давления разной величины и скорости изменения непосредственно на момент ЯМР измерений и фиксации для электронной микроскопии.

2. Оценить влияние давления на физиологические параметры клеток растений (скорость роста, параметры дыхания и тепловыделения).

**3.** Охарактеризовать методами световой и электронной микроскопии (ЭМ) структурные изменения в эндомембранной системе клеток под давлением.

**4.** Исследовать изменения трансклеточного и симпластного переноса воды в клетках наземных (корни *Zea mays L., Triticum aestivum*) и водных (*Chlorella vulgaris, Dunaliella maritima*) растений под действием давления до 4 МПа.

### Научная новизна работы.

Предложена методическая разработана соответствующая схема И аппаратура к экспериментальному обоснованию влияния фактора давления физиологического диапазона на структурную организацию эндомембранной системы клеток и регуляцию транспорта воды в растениях. Впервые показано, что под воздействием внешнего давления от 2 до 4 МПа в клетках растений кукурузы (Z. mays L.) наблюдаются существенные изменения структурной организации эндомембранной системы. Для наземных растений, имеющих воздухоносные межклеточные объемы, на примере корней кукурузы (Z. mays L.) и пшеницы (T. что давление приводит к обратимому aestivum), впервые установлено, увеличению интенсивности межклеточного переноса воды как трансклеточным, так и симпластным путями. Для водных растений, на примере клеток хлореллы

(C. vulgaris) и дуналиеллы (D. maritima), установлен факт резистентности процессов водного переноса к давлению.

Научно-практическая значимость. Результаты работы расширяют список методов исследования процессов массопереноса в гетерогенных системах. Разработана установка для воздействия давлением до 5 МПа на биологические объекты непосредственно во время ЯМР эксперимента, с регулируемой скоростью изменения давления, возможностью разрушения клеток, а также их фиксации для электронной микроскопии непосредственно под давлением. Полученные результаты углубляют понимание механизмов регуляции транспорта воды в растениях, могут быть в определенной степени распространены на животные объекты и применены в решении медицинских задач (выяснение механизмов развития инфарктов, инсультов, разработка протоколов баротерапии, выяснение механизмов влияния давления ускорения и адаптации к гравитации после невесомости). Экспериментальные данные, использованные методические модели могут быть приемы, предложенные применены В учреждениях биологического, биотехнологического, медицинского, сельскохозяйственного профиля, а также при чтении лекций по биофизике, физиологии растений в ВУЗах.

### Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты, свидетельствующие о существенных изменениях структурной организации эндомембранной системы клеток растений под давлением до 4 МПа (на примере корней кукурузы);

2. Результаты, свидетельствующие об обратимом увеличении под давлением интенсивности трансклеточного и симпластного переноса воды в тканях растений, имеющих воздухоносные межклеточные объемы (корни кукурузы и пшеницы в сопоставлении с водными растениями хлореллы и дуналиеллы).

Связь работы с научными программами. Работа проводилась с 2009 по 2014 г. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по

теме «Процессы переноса веществ и превращения метаболитов в функциональноадаптивной активности растительных клеток» (гос. регистрационный номер: № 01200901960). Исследования автора как исполнителя поддержаны грантом РФФИ № 08-04-01258. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора, либо полученных при его непосредственном участии совместно с сотрудниками КИББ КазНЦ РАН Абдрахимовым Ф.А., Алябьевым А.Ю., Андреевой И.Н., Огородниковой Т.И.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на 13-ой международной школе молодых учёных «Actual problems of magnetic resonance (Казань, 2009); Российской школе молодых учёных and its application» «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010); итоговой научной конференции Казанского научного центра Российской академии наук за 2009, 2010 год (Казань, 2009, 2010); 3-ем международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, 2011); 6-ой международной научной школе «Наука и инновации» (Йошкар-Ола, 2011); IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); всероссийской (с международным участием) научной конференции «Актуальные проблемы экологии и физиологи живых организмов» (Саранск, 2013); XI всероссийском молодежном научно-практическом конгрессе с международным участием (Иркутск, 2013); 18-ой международной школе-конференции молодых учёных (Пущино, 2014); «Биология наука XXI века» международной научной конференции и школе молодых учёных «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014).

### ГЛАВА 1. ФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДАВЛЕНИЯ И ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ И ВЛИЯНИИ ДАВЛЕНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЬЕКТЫ

### 1.1. Физические характеристики давления

Давление относится к числу фундаментальных физических величин, которые неизбежно оказывают влияние на все живые и неживые объекты в природе. Давление характеризует сумму перпендикулярных к поверхности сил, с которыми одно тело действует на поверхность другого (Rivalain *et al.*, 2010). Давление является термодинамическим параметром, входящим в уравнение состояния термодинамической системы, наряду с температурой и объёмом и определяется как сила *F*, действующая на площадь поверхности *S*, т.е.

$$P = \frac{F}{S}.$$

В системе СИ единицей измерения давления является паскаль (Па). В таблице 1.1.1 приведены различные единицы измерения давления.

Таблица 1.1.1. Различные единицы измерения давления и соответствие между ними (Rivalain *et al.*, 2010)

	атмосфера	бар	МПа	
атмосфера	1	0.987	0.968	9.901
бар	1.013	1	0.981	10
кгс/см <sup>2</sup>	1.033	1.021	1	10.228
МПа	0.101	0.1	0.098	1

Различают два основных типа давлений: статическое давление, существующее при длительных режимах сжатия, и динамическое, действующие

кратковременно, например, при взрыве, механическом ударе и т.д. В свою очередь, статическое давление подразделяется на 2 вида (Rivalain *et al.*, 2010):

- изостатическое давление распределяется равномерно по всему объёму вещества и его значения одинаковы во всех направлениях. Такое давление создаётся в жидкостях (гидростатическое давление) или в газах.
- неизостатическое давление, имеет место, когда присутствует градиент давления в веществе, вызванный негомогенной сжимаемостью среды (например, в случае твёрдых веществ с анизотропной структурой).

Диапазоны давлений подразделяют на низкие, умеренные, высокие и сверхвысокие. Диапазон высоких давлений, встречающихся в природе, весьма широк. В океанских глубинах гидростатическое давление достигает 100 МПа (Pradillon, Gaill, 2007). В лабораторных условиях достигнуто давление в несколько ГПа (Ono et al., 2012). В физико-химических исследованиях конденсированных систем используют динамическое давление до 500 ГПа (Циклис, 1976). Низкие и умеренные диапазоны давлений обычно находятся в диапазоне от десятых и сотых долей МПа до единиц и десятков МПа (Steudle, 1993). В природе, такой диапазон давлений обычно присущ биологическим объектам. Давления могут отличаться не только порядком величины, но также характером действующих сил, вызывающих возникновение этого давления и среды в которой создаётся давление. Например, осмотическое давление вызвано явлением осмоса, т. е. диффузией какого-либо вещества через полупроницаемую перегородку при обязательном отсутствии противодиффузии. Если два раствора разной концентрации разделить перегородкой, задерживающей молекулы вещества, но пропускающей молекулы растворителя, растворенного то растворитель будет переходить в более концентрированный раствор, разбавляя его и создавая там избыток давления, называемого обычно осмотическим давлением (Лоренц, 2001). В работе (Слейчер, 1970) даётся следующее

определение осмотического давления: осмотическое давление – это давление, которое нужно приложить к раствору, чтобы воспрепятствовать одностороннему току растворителя через мембрану из наружной среды в осмотическую ячейку (клетку). С.Н. Мелещенко характеризует осмотическое давление раствора как величину депрессии внутрижидкостного теплового давления молекул воды в растворе при атмосферном давлении по сравнению с тем же параметром в чистой воде при тех же условиях (Мелещенко, 2001). Величина осмотического давления для клеток многих растений в среднем составляет 0.5 - 1 МПа. Также, наряду со статическим и импульсным (динамическим) давлением, выделяют центробежное, гравитационное, капиллярное.

# 1.2. Влияние давления на вязкость, времена магнитной релаксации и коэффициент диффузии воды и водных растворов

К числу многих аномалий воды относится зависимость её вязкости от давления при температурах ниже 25 °C. С ростом давления вязкость воды уменьшается, проходя через минимум, а затем начинает устойчиво увеличиваться при более высоких давлениях (рис. 1.2.1) (Bridgman, 1958; Kawamoto *et al.*, 2004). При увеличении давления объём воды уменьшается, поэтому, линейно повышающееся давление приводит к увеличению вязкости. В работе (Bett, Cappi, 1965), зависимость динамической вязкости воды от давления объясняется деформациями водородных связей, которые частично отвечают за вязкость, и это баланса между является прямым следствием водородными СВЯЗЯМИ И дисперсионными силами Ван-дер-Ваальса (Tanaka, 2003). При высоких давлениях, баланс между водородными связями и дисперсионными силами Вандер-Ваальса склоняется в сторону дисперсионных сил и оставшиеся водородные связи, становятся крепче, из-за близости атомов кислорода (Kawamoto et al., 2004).



Рис. 1.2.1. Зависимость динамической вязкости воды от давления при разных температурах (Kawamoto *et al.*, 2004).

Изменение температуры при постоянном давлении оказывает влияние на молекулярное движение не только изменением кинетической энергии молекул, но и изменением среднего объёма, доступного для их движения (Jonas, 1975). Если и температуру и давление одновременно использовать как переменные величины, то появляется возможность разграничения эффектов, связанных с изменением плотности и кинетической энергии молекул жидкостей. Часто, влияние только температуры на молекулярное движение в жидкостях имеет менее выраженный эффект, чем совместное воздействие температуры и давления.

Исследованию зависимости ядерной магнитной релаксации различных жидкостей, в том числе воды, от давления, были посвящены работы G.B.Benedek, E.M.Purcell, J. Jonas, T.C. Farrar и др. (Farrar *et al.*, 1972; Harris, Boden, 1972; Harris, Boden, 1973; Jonas, 1972; Benedek, Purcell, 1954). В работе (Hertz, Radle, 1969) по исследованию зависимости времени спин-решёточной релаксации  $T_1$  воды от внешнего давления (до 300 МПа) при разных температурах, был обнаружен эффект, заключавшийся в том, что график зависимости  $T_1$  от давления имел максимум при температуре 0 °C, тогда как при температуре 75 °C поведение $T_1$ 

походило на поведение «нормальной» жидкости. Данный экспериментальный результат хорошо согласуется с приведённой выше аномальной зависимостью вязкости воды от давления (Kawamoto *et al.*, 2004), в которой внешнее давление порядка 150 МПа и выше, приложенное к воде, снижает вязкость воды при температурах ниже 25  $^{\circ}$ C.

В работе (DeFries, Jonas, 1977) время  $T_1$  спин-решеточной релаксации и динамическая вязкость исследовались как функции давления в интервале температур от -15 до 10 °C. Начальное сжатие при всех температурах, также показало более высокую двигательную свободу молекул воды, так, что зависимость от давления показала минимум в вязкости и максимум в  $T_1$  (рис. 1.2.2).



Рис. 1.2.2. Зависимость времени протонной спин-решёточной релаксации  $T_1$  от давления Р, для воды при разных температурах (DeFries, Jonas, 1977).

Авторы также связывают наблюдаемый эффект влияния давления на вязкость и времена спин-решёточной релаксации с последствиями существенного искажения сети водородных связей в результате сжатия, которое, скорее всего,

ослабляет эти водородные связи. Дальнейшее сжатие приводит к ограничению свободы движения в результате увеличения плотности упаковки молекул.

Аномальное поведение спин-решеточной релаксации и динамической вязкости при сжатии, более выражено при более низких температурах, так как именно при более низких температурах сеть водородных связей более развита. Согласно более ранним результатам этих же авторов, охватывающим диапазон температур от 10 до 90 °C, сжатие при изотермических условиях искажает случайное соединение водородными связями, что приводит к снижению связи между вращательным и поступательным движениями молекул воды. Давление и температура имеют параллельное влияние на многие динамические свойства систем при температуре ниже 40 °C и давлении ниже 200 МПа, тогда как при более высоких значениях их влияние совсем противоположное.

Среди разновидностей методов ЯМР метод спин-эхо предоставляет уникальные возможности для измерения коэффициента самодиффузии в жидкостях. Изучению зависимости коэффициента самодиффузии воды и водных растворов от внешних факторов, таких как температура и давление, посвящено множество работ. Большая часть этих работ проводилась с применением достаточно высоких давлений (до 1000 МПа). Например, Benedek и, Purcell, используя методы ЯМР, исследовали поведение коэффициента самодиффузии воды при температуре 28  $^{\circ}$ С и давлениях до 1000 МПа (Benedek, Purcell, 1954). Главным заключением этой работы, относительно поведения коэффициента самодиффузии воды под высоким давлением, было доказательство справедливости для воды соотношения Стокса-Эйнштейна. Используя данные о вязкости Бриджмена (Bridgman, 1958), они показали, что зависимость обратного значения вязкости от давления была очень близкой к зависимости коэффициента диффузии от давления. В работе (Krynicki et al., 1978) с помощью метода спин-эха был измерен коэффициент само-диффузии чистой воды в диапазоне температур от 275.2 К до 498.2 К под давлением выше 1.75 Кбар (рис. 1.2.3).



Рис. 1.2.3. Зависимость коэффициента самодиффузии воды от давления при разных температурах для воды (Krynicki *et al.*, 1978).

Наблюдается слабая зависимость коэффициента диффузии от давления для указанного диапазона давлений. Выбор высоких значений давления во всех упомянутых выше работах, связан с тем, что именно при высоких давлениях проявляются аномальные свойства воды, связанные с такими её характеристиками и свойствами как вязкость, плотность, температура кипения, кристаллизации, плавления и др. (Hertz, Radle, 1969; Arkhipov *et al.*, 1978).

# **1.3.** Влияние давления на метаболическое равновесие и скорость биохимических реакций

Эффекты влияния давления на физиологические и биохимические системы в основном являются результатом сжатия системы и следуют принципу Ле-

Шателье (Глинка, 1985), который гласит, что в состоянии равновесия система пытается свести к минимуму все внешние факторы, пытающиеся вывести её из равновесия (Глинка, 1985). Увеличение давления, как правило, приводит к уменьшению объёма системы и, соответственно, результат действия давления на биологические и биохимические процессы будет зависеть от изменения объёма системы в ходе этих процессов. Процессы и реакции, которые происходят с увеличением объёма, ингибируются давлением, тогда как процессы, приводящие к уменьшению объёма, не ингибируются и даже ускоряются под действием давления (Pradillon, Gail, 2007). Например, электростатические и гидрофобные взаимодействия, которые поддерживают четвертичную структуру олигомерных белков, ведут к увеличению объема. Поэтому, относительно умеренное увеличение давления может вызвать диссоциацию олигомерных белков, ослабляя взаимодействия между субъединицами (Silva et al., 1996). Нуклеиновые кислоты, преимущественно менее чувствительны к изменениям гидростатического давления и скорее всего это связано с меньшими изменениями объёма, происходящими вследствие их конформационных переходов (Molina-Garcia, 2002). Давление может влиять на равновесие и константы скоростей реакций, например, ферментативных, так же в зависимости от изменений объёма, происходящих в системе (Balny et al., 2002). Увеличение давления также благоприятствует слабых (Abe, Horikosh, 1995). ионизации кислот Бимолекулярные реакции имеют свойство ускоряться с повышением давления, мономолекулярные, наоборот, замедляются. Так, при повышении давления до 1000 МПа скорость диенового синтеза может возрастать в тысячи раз, а реакции распада обычно затормаживаются (Циклис, 1976). Действие давления способно изменять скорости химических процессов путём изменения физических свойств среды. Например, увеличение вязкости под давлением (Kawamoto et al., 2004) может привести к переходу реакций из кинетической области протекания в диффузионную. Денатурация белков начинается при давлениях в несколько сотен МПа (Гоникберг, 1969).

Эффект бислой, мембранный липидный влияния давления на предположительно чувствительный к давлению, также не остался без внимания исследователей. Так, воздействие высоким внешним давлением на организмы, адаптированные к жизни при нормальном атмосферном давлении, показало уменьшение текучести липидного бислоя клеточных мембран (Behan et al., 1992). Некоторые авторы отводят стеринам, одну из ключевых ролей в формировании адаптационных реакций, происходящих в биомембранах, в частности в плазмалемме растений, и последующих изменений фазового состояния липидного бислоя при воздействии высоким гидростатическим давлением (Roche et al., 2010). Приведённые выше, эффекты влияния давления на биохимические реакции, происходят при разных значениях гидростатического давления. В основном эти значения находятся в диапазоне от десятков до сотен МПа.

### 1.4. Давление как движущая сила переноса веществ

Основными элементами, которые составляют предмет изучения массопереноса в транспортных системах, в частности в растениях, являются движущие силы переноса, пути переноса, барьерно-регуляторные структуры и сигнальные системы. Если пути переноса и основные барьеры на пути движения воды и других веществ в растении более или менее изучены, то движущие силы переноса и сигнальные системы, участвующие в массопереносе, изучены мало. В частности, известно по каким путям вода поднимается к верхушкам высоких деревьев (высотой до 100 метров и более), но не известны все силы и сигналы, вызывающие этот перенос и чётко объясняющие работу растительной системы (Косарев, 2010; Косарев, 2004; Holbrook, Zwieniecki, 2008). Таким образом, вопрос о движущих силах является очень актуальным и требует тщательного рассмотрения.

По распространенным представлениям, система транспорта воды у растений включает внутриклеточный, ближний и дальний транспорт (Сибгатуллин, 2010). Ближний транспорт — передвижение веществ между клетками внутри органа по неспециализированным тканям, например по апопласту, симпласту или трансклеточному пути (рис. 1.4.1). Данные пути водного переноса реализуются следующим образом (Steudle, 2000):

- 1) апопластный по клеточным стенкам и межклеточному пространству;
- <u>симпластный путь</u>, включающий в себя движение воды внутри цитоплазматического континуума через плазмодесмы; при котором также не происходит пересечения мембран;
- 3) <u>вакуолярный (трансклеточный) путь</u>, который включает в себя поток воды через мембраны.

Между этими путями существует быстрый обмен водой, и относительный вклад их в общий перенос воды может меняться в зависимости от условий (Сибгатуллин, 2010).



Рис. 1.4.1. Радиальные пути водного транспорта через корень (Steudle, 2000).

Модель транспорта воды и растворенных веществ в растении предполагает, что вклад того или иного пути в общий поток воды зависит от различных факторов: типа ткани, стадии ее развития, внешних условий. Существование в растении нескольких путей водного переноса играет очень важную роль, так как позволяет поддерживать оптимальный водный режим при неблагоприятных условиях, переключая потоки воды по разным путям (Сибгатуллин, 2010).

Дальний транспорт представляет собой движение веществ между органами растений по специальным проводящим каналам, т.е. по ксилеме и флоэме. С помощью сосудов ксилемы и флоэмы, которые пронизывает всё растение, и образуют единую водопроводящую систему, происходит непрерывная циркуляция воды и растворённых в ней веществ (Полевой, 1989).

Считается, что процесс транспирации является основным двигателем водного тока в растениях, в результате которого возникает градиент водного потенциала вдоль всего растения от корня до верхней его части (Якушкина, Бахтенко, 2005). Созланное 3a счёт транспирации отрицательное гидростатическое давление в сосудах ксилемы, заставляет воду и растворённые в ней вещества подниматься вверх. Распределение водного потенциала в почве и в органах растения представлен приблизительно так: водный потенциал почвы (-0.05 МПа), корня (-0.2 МПа), стебля (-0.5 МПа), листьев (-1.5 МПа), воздуха при относительной влажности 50% (-100 МПа) (Якушкина, Бахтенко, 2005). Однако нельзя рассматривать транспирацию как единственную силу, обусловливающую восходящий ток воды по растению (Жуковская, 2009). B отсутствие транспирации, например, весной, в качестве движущей силы велика роль корневого давления. Корневое давление представляет так называемый нижний концевой двигатель водного тока, а его значения в некоторых растениях могут достигать 1 МПа. До сих пор остаётся открытым вопрос, каким образом вода поднимается к верхушкам деревьев высотой в сто метров и выше (секвойи в Калифорнии, эвкалипты в Австралии и т.д.). С помощью только одних сил транспирации подъём воды возможен максимум на 10.32 метров (Косарев, 2010),

поскольку водяной столб именно такой высоты уравновешивается атмосферным давлением. Широко распространена гипотеза капиллярного подъёма воды, согласно которой, вода способна подниматься по тонким смачивающимся сосудам благодаря своему высокому поверхностному натяжению, однако только за счёт этих сил по сосудам ксилемы вода может подняться на высоту порядка 3-х метров (Косарев, 2004), а капиллярам меньшего диаметра сложно обеспечить необходимый расход воды.

## 1.5. Корневое давление. Представления о механизмах создания корневого давления

По распространённым представлениям, движение воды и водных растворов в растении осуществляется под давлением, вызванном градиентом водного потенциала, с участием сил когезии (Тугее, 1997). При этом живым клеткам, в частности клеткам корня, отводится пассивная водопроводящая роль. Однако имеются данные о том, что корень не просто проводит через себя воду, а проталкивает её в надземные части растения с некоторой силой (Blackman, 1921), которая и называется корневым давлением (Якушкина, 1980). Корневое давление имеет широкий диапазон вариаций, от нескольких единиц и десятков КПа в травянистых растениях до 0.5 - 0.6 МПа в деревьях и зависит от условий жизнедеятельности корня (Сапожникова, 2000). При низкой температуре или недостатке кислорода корневое давление снижается, при гибели корня равно нулю. Максимум корневого давления отмечается днём, а минимум — ночью (Якушкина, Бахтенко, 2005). Корневое давление имеет сложную природу, а механизм его формирования и пути эндогенной регуляции до сих являются предметом дискуссий (Жуковская, 2009).

Существует две основные концепции механизма корневого давления: осмотическая и неосмотическая (метаболическая). Осмотическая концепция

корневого давления основана на хорошо известном явлении осмоса, при котором вода движется через клетки корня вдоль градиента осмотического давления между ксилемным соком и поглощающимся из почвы раствором. При этом клетки выполняют функцию полупроницаемой мембраны или перегородки (Максимов, 1958; Kramer, Boyer, 1995).

Разные авторы пытались несколько по-своему объяснить процесс передвижения воды по корню. Согласно А. М. Алексееву переход воды из клетки в клетку осуществляется вследствие разности химических потенциалов снаружи и внутри клетки (Анисимов, 1987). В свою очередь, химический потенциал воды, помимо осмотических явлений, зависит от явлений электрических, химических, поверхностных. А.С. Трошин отводит ключевую роль в процессе поступления воды в клетки явлениям адсорбции и химическому связыванию веществ в протоплазме (Самуилов, 1972). Оговоренные выше химические, механические, сорбционные механизмы, участвующие в процессе поглощения воды клетками зависят от метаболизма, и поэтому, большая интенсивность водопоглощения требует больших энергетических затрат. Недостаточность только осмотических сил в процессе водного переноса, подкреплявшаяся новыми экспериментальными данными, требовала пересмотра взглядов на природу корневого давления, а точнее на участие в ней неосмотических сил.

Индийский исследователь Д.Ч. Бос, считал, что вода проталкивается в направлении от корня к листьям растения, благодаря скоординированным сокращениям паренхимных клеток коры (Бос, 1964). Таких ВЗГЛЯДОВ придерживался В.Н. Жолкевич (Жолкевич, 2001). Так как активное поступление воды И веществ зависит OT энергии, выделяемой при дыхании, то присутствие/отсутствие кислорода, ингибиторов и активаторов дыхательного обмена влияет на корневое давление (Kramer, 1983; Якушкина, Бахтенко, 2005; Boyer, 1985). Вещества, повышающие или понижающие уровень АТФ в клетке, соответственно повышают (Можаева, Пилыцикова, 1969) и понижают (Жолкевич, 2001) уровень корневого давления. Различные воздействия на корень показывают,

что уровень активного корневого давления коррелирует со скоростью экссудации, в отличие от осмотического давления экссудата.

Таким образом, сформировалась новая концепция, согласно которой корневое давление состоит из осмотической и метаболической составляющей (Жолкевич, 1979; Mees, Weatherley, 1957; Zholkevich, 1981). При этом осмотической составляющей отводится роль водоудерживающей силы в сосудах, а основу активного корневого давления создаёт именно энергозависимая (метаболическая) составляющая.

Показано, что экссудация в корнях взрослых растений имеет ритмичность, с коротким периодом в 15 – 30 мин (Зялалов, 1984). Короткопериодные колебания в интенсивности экссудации также были обнаружены в корнях проростков кукурузы (Жолкевич, 1999). При этом колебания скорости экссудации могли сопровождаться изменениями площади поперечного сечения корня, что свидетельствует о колебаниях объёма клеток корня (Чугунова, 1989). В свою очередь, было показано, что сокращение клеток ингибируется блокаторами сократительного аппарата, например колхицином (Зялалов, 1981). Если предположить, что в сократительный аппарат и в создание нагнетающей способности корневого давления вовлечены сократительные белки, то должны существовать механизмы регуляции этих белков и нельзя исключить при этом участие кальция, добавление которого вызывает увеличение частоты и амплитуды колебаний интенсивности водного переноса в корнях растений (Сапожникова, 2000). Сократительный белок С АТФазной активностью, сходный С актиномиозином мышц, был обнаружен и выделен из клеток корней тыквы и подсолнечника, а его содержание и АТФазная активность коррелируют со скоростью экссудации (Абуталыбов и др., 1980; Можаева, Булычева, 1970). Предполагается, что участие сократительного аппарата в создании колебаний потенциала давления (тургора) паренхимных клеток, может происходить либо через изменение объёма клеток, либо через регуляцию проводимости пор и каналов в плазмодесмах и мембранах (Чугунова, 1989).

По мнению В.В. Сапожниковой, возникновение микроколебаний гидростатического давления паренхимных происходит вследствие клеток ритмической внутриклеточного сократительного деятельности аппарата. Микроколебания создают локальные градиенты водного потенциала на пути водного тока, и тем самым регулируют скорость этого тока (Сапожникова, 2000). Под влиянием ингибиторов сократительных структур или окислительного фосфорилирования автоколебания затухают, и транспорт воды тормозится (Королев, Жолкевич, 1990).

Некоторые авторы выделяют следующие основные свойства осмотической и метаболической составляющих корневого давления (табл. 1.5.1).

Таблица 1.5.1. Основные характерные черты метаболического и осмотического компонент корневого давления (Сапожникова, 2000)

Nº	Метаболическая составляющая	Осмотическая составляющая			
1	Энергозависима	Не зависит от энергоснабжения			
2	Зависит от сократительного	Не зависит от сократительного			
	аппарата клеток	аппарата клеток			
3	Имеет автоколебательный характер	Не имеет автоколебаний			
4	Водный ток идёт по живым	Водный ток идёт по ксилемным			
	клеткам	клеткам корня			
5	Сильно зависит от изменения	В меньшей степени зависит от			
	температуры	перепада температур			
6	Обеспечивает постоянный поток и	Обеспечивает первичный подъём			
	пополнение водой	воды в корне			

Стоит отметить, что не все исследователи поддерживают идею о неосмотической, метаболитически активной составляющей корневого давления.

Основное возражение заключается в отсутствии в растении, возможности должного энергетического обеспечения процесса активного транспорта воды с помощью сократительного механизма. Собственно технические возможности реализации сократительного механизма массопереноса в биологических объектах не вызывают никаких вопросов – они прекрасно реализованы природой в животных организмах. Но простое соотнесение удельной энергии приходящейся на единицу объема животных и растительных объектов сразу расставляет все на свои места. Уместно отметить, что даже в плане энергетического обеспечения основных процессов метаболизма, например работы мембранных насосов, существует мнение некоторых исследователей В невозможности их функционирования именно энергии, имеющейся из-за недостатка В распоряжении клетки (Линг, 2008).

### 1.6. Плазмодесмы и регуляция симпластного транспорта

В 1879 году, Eduard Tangle обнаружил цитоплазматические соединения между клетками в семядолях Strychnosnuxvomica, которые он интерпретировал как контакты протоплазмы. В 1901 году Страсбургер назвал эти структуры плазмодесмами (Carr, 1976). Плазмодесмы представляют собой небольшие каналы, выстланные плазматической мембраной, которые связывают цитоплазмы соседних клеток растений друг с другом - так называемые «живые мосты» между клетками, обеспечивающие симпластный транспорт воды и растворённых в ней веществ (рис. 1.4.1). Плазмодесмы имеют достаточно сложную структуру. Диаметр канала плазмодесм в среднем составляет 40-60 нм, на концах которого имеются шейные сужения. В центре канала находится десмотубула (трубка), состоящая из мембран эндоплазматического ретикулума. Сфинктерный механизм, имеющийся внутри плазмодесм, позволяет изменять диаметр канала (Курсанов, 1976). Плазмодесмы способны изменять свою структуру от полностью открытой

до закрытой (Гамалей, 1997), что наблюдается под влиянием различных условий. До сих пор существует неопределенность относительно сопротивления плазмодесм к воде, так как действительная площадь поперечного сечения, доступная для транспорта воды внутри поры, неизвестна (Сибгатуллин, 2010).

В работах (White et al., 1994; Blackman, Overall, 1998) показано, что актин и миозин могут локализоваться в канале плазмодесм. Некоторые авторы предполагают, что распределение актина и миозина может обеспечивать изменение диаметра канала по всей их длине и соответственно, управлять проницаемостью плазмодесм (Zambryski, Crawford, 2000). Согласно другой точке зрения, эти цитоскелетные элементы (актин и миозин) скорее всего сами вовлечены в транспорт через плазмодесмы и не участвуют в регуляции их проницаемости (Blackman, Overall, 2001). Эта точка зрения основывается на том, что ингибиторы актина и миозина не влияют на интенсивность движения небольших молекул, диффундирующих по каналам плазмодесм (Tucker, 1987). Однако полная деполимеризация актинового питоскелета С помошью цитохалазина приводит к увеличению размера шейных сужений плазмодесм в Nephrolepisexaltata и соответственно их проводимости (White *et al.*, 1994).

Наличие актина и миозина вдоль канала плазмодесм, расположенных, возможно, спирали В виде «спиц», соединяющих десмотубулу ПО С цитоплазматической мембраной, может обеспечить некий контрактильный механизм, способный изменять апертуру шейных сужений плазмодесм (Reichelt et al., 1999). Предполагается, что регуляция проводимости плазмодесм может происходить как по всей их длине, так и только в области шейных сужений. Например, центрин (кальций-связывающий контрактильный белок) локализуется в области шейного сужения плазмодесм и также может влиять на изменение их апертуры (Blackman et al., 1999). Увеличение концентрации цитоплазматического кальция приводит к уменьшению фосфориляции центрина и, предположительно, к закрытию плазмодесм (Martindale, Salisbury, 1990; Erwee, Goodwin, 1983).

Плазмодесмы способны изменять свою проницаемость в ответ на изменения тургорного давления. В работе (Oparka, Prior, 1992) на клетках Nicotiana clevelandii показано, что разница в тургорном давлении между соседними клетками более чем в 200 КПа, приводит к закрытию плазмодесм. При меньшей разнице давления плазмодесмы сохраняют открытое положение. Аналогичный результат получен на водорослях Chara corallina (Ding, Tazawa, 1989; Reid, Overall, 1992). Однако, некоторые опыты на корневых волосках Arabidopsis показали, что увеличение тургорного давления не вызывает изменений в электрической связи клеток, вероятно свидетельствуя о том, что плазмодесмы закрываются не полностью (Lew, 1996). Осмотический стресс так же приводит к изменению проводимости плазмодесм, например, увеличение концентрации приводит расширению шейного сужения маннитола К плазмодесм И соответственно к увеличению проницаемости канала (Schulz, 1995). Плазмолиз в клетках листьев Egeria densa также приводит к увеличению размера шейного сужения плазмодесм (Erwee, Goodwin, 1984). Предполагается, что изменение проницаемости плазмодесм в ответ на изменения тургорного давления клетки, является своеобразным защитным механизмом при воздействии стресса или механических повреждений (Oparka, Prior, 1992). Внезапная разница в давлении между примыкающими клетками, возникающая, например, вследствие ранения, обуславливает изоляцию растительных клеток от их соседей, тогда как общее падение тургора ткани, характерного для водного стресса (гиперосмотический стресс), приводит к увеличению шейного сужения плазмодесм.

На размер шейного сужения плазмодесм могут влиять И другие физиологические воздействия. В исследованиях корней под воздействием анаэробного стресса, пониженный уровень АТФ вызывает увеличение площади поперечного сечения плазмодесм (Cleland et al., 1994). Авторы предполагают, что АТФ необходима для удержания плазмодесм в сокращенном состоянии. Хотя гипоксия деполяризует мембранный потенциал в клетках корней пшеницы, она не оказывает значительного эффекта на сопротивление мембран или на

электрическую связанность клеток, является мерой сопротивления что плазмодесм (Zhang, Tyerman, 1997). Эти результаты показывают, что транспорт воды и растворов может проходить как через цитоплазму, так и через эндоплазматический ретикулум. Однако путь, связанный с эндоплазматическим ретикулумом, гораздо чувствительнее к гипоксии. К снижению симпластного транспорта из флоэмы, в корнях Arabidopsis, может приводить увеличение в цитоплазме концентрации ионов II группы (Erwee, Goodwin, 1983), в то время как ингибиторов воздействие различных метаболизма приводит росту К проницаемости плазмодесм (Wright, Oparka, 1997).

Таким образом, можно сделать вывод, ЧТО плазмодесмы очень чувствительны к ряду физиологических воздействий, таких как осмотический стресс, неосмотическое изменение тургорного давления, гипоксия, воздействие ингибиторов метаболизма, что подчеркивает их значительную важность в регуляции межклеточного обмена (Pickard, 2003), а также возможность вовлечения в формирование автоколебательного характера водного переноса в растениях.

#### 1.7. Физиологическое влияние давления на биологические организмы

Считается, что именно повышение атмосферного давления, приводит к изменению транспорта воды и растворённых в ней веществ, фотосинтеза и роста растений (Гамалей, 2004). Функциональная роль давления, прежде всего, рассматривается с позиции движущей силы массового переноса водных растворов (Knoblauch, Peters, 2010). В естественных условиях диапазон водного потенциала клеток растений в зависимости от вида колеблется от -0.5 МПа до -4 - (-5) МПа (Galmés *et al.*, 2011). Снижение давления ниже физиологических значений приводит к угнетению метаболизма и даже гибели растений. До сих пор не существует однозначного мнения относительно сил, участвующих в дальнем переносе воды и водных растворов в растениях (Knoblauch, Peters, 2010; Turgeon, 2010). Гидростатическое давление оказывает влияние на функции клеток не только через механическое сжатие (механический стимул), но и через растворение в клетках под давлением различных газов, присутствующих в атмосфере. Растворимость газа в жидкости прямо пропорциональна давлению этого газа над поверхностью раствора. Данное утверждение носит название закона Генри и может быть выражено в виде формулы:  $C = kP_r$ , где C – растворимость газа в растворителе, k - коэффициент пропорциональности,  $P_r$  – парциальное давление газа над раствором (Мелвин-Хьюз, 1962). Различные газы имеют разную растворимость. В таблице 1.7.1 приведены значения растворимости различных газов.

Таблица 1.7.1. Растворимость некоторых газов в воде при парциальном давлении 0.1 МПа и различной температуре, м<sup>3</sup>газа/ м<sup>3</sup>чистой воды (Мищенко, Равдель, 1974)

Газ	Температура, °С						
	0	10	20	30	40	50	60
Азот	0,0236	0,0190	0,0160	0,0140	0,0125	0,0113	0,0102
Водород	0,0215	0,0198	0,0184	0,0170	0,0164	0,0161	0,0160
Двуокись углерода	1,713	1,194	0,878	0,66	0,53	0,44	0,36
Кислород	0,049	0,038	0,031	0,026	0,023	0,021	0,019

Закон Шарля гласит, что при постоянном давлении изменение объёма газа сопровождается пропорциональным изменением температуры. Если константой является объём газа, то в этом случае прямо пропорционально температуре газа становится давление (Sperelakis, 1995).

Водолазам приходится дышать сжатым воздухом глубоко под водой, в результате чего большое количество азота растворяется в их крови, тканях и других суставах. Если водолаз возвращается к поверхности слишком быстро, то

азот выходит из крови и тканей слишком быстро, формируя пузыри, закупоривающие мелкие сосуды (Petrucci *et al.*, 2007). Согласно литературным данным, причины альтераций в клетках, вызванных растворением под давлением газов, подразделяется на три основные группы (Sperelakis, 1995):

- 1) токсичность кислорода;
- 2) наркоз, вызываемый инертными газами;
- 3) вызванный высоким давлением, нервный синдром.

Внутри проблемы влияния давления на живые организмы, наиболее изучены эффекты влияния высоких давлений, по-видимому, вследствие их широкого применения в биотехнологии для стерилизации вакцин и консервации пищевых продуктов (Rothschild, Mancinelli, 2001). Показано, что высокое давление оказывает влияние на функции биологических клеточных мембран, путём инактивации мембранных белков и влияния на фазовые переходы в липидном бислое (Hartmann et al., 2006). Причём более чувствительными к высокому давлению оказываются мембраны внутриклеточных органелл. В работе (Shimada et al., 1993) показано, что давление в 100 МПа начинает вызывать изменения в мембранах ядер дрожжевых клеток Saccharomyces cerevisiae, а при давлении 400 МПа, разрушенными оказываются мембраны всех внутриклеточных органелл. Клеточная стенка начинает разрушаться при давлении 500 МПа. В многочисленных работах, выполненных при давлениях 40-100 МПа и выше, в областях, где функциональные нарушения становятся очевидными, были выявлены изменения в липидных слоях мембран, диссоциация олигомерных белковых комплексов и потеря ими ферментативной активности (Gross, Jaenicke, 1994; Molina-Garcia, 2002), а также, в экспрессии генома (Fernandes et al., 2004). Гипербарические травмы, с сопутствующими нарушениями в кровеносной и нервной системе, являются причиной гибели животных (Зальцман и др., 1979). Имеются данные, что гипербарическую гибель организмов можно предотвратить предобработкой их стрессовыми гормонами (Tanino *et al.*, 1992).

Группой учёных в составе М.Е. Gonzalez, D. M. Barrett и др. были проведены исследования, в которых, с помощью измерения времён спинспиновой релаксации и среднего коэффициента диффузии воды методом ЯМР, а также электронной микроскопии, исследовались нарушения целостности цитоплазматической мембраны И тонопласта клеток лука, подвергнутых воздействию температур в диапазоне 40 - 90  $^{\circ}$ C в течение 30 минут, и внешнего давления в диапазоне 20 - 200 МПа в течение 5 минут. Было показано, что нарушение целостности мембран клеток, подвергнутых воздействию высоких температур, наступает при температуре 60 °С и выше. Дестабилизация мембран клеток, обработанных давлением, наступала при 200 МПа и выше (Gonzalez et al., 2010). Данная группа учёных использовала и другие методы для оценки целостности клеточных мембран под воздействием высоких температур и давлений (Gonzalez et al., 2010), в частности, измерение биохимического продукта пировиноградной кислоты, образованной В результате изменения проницаемости клеточных мембран, которая в свою очередь была вызвана ферментативной активностью и выходом электролитов в раствор.

Большинство исследований влияния давления на биологические объекты, касаются в основном высоких давлений, применяемых в промышленности для обработки, консервирования и стерилизации биопродуктов и т.п. В работе (Albright, 1975) показано, что внешнее гидростатическое давление может ингибировать синтез протеинов у земных и морских бактерий. Рост внешнего гидростатического давления на каждые 10 МПа в диапазоне от 0.1 до 50 МПа, ингибирует синтез протеинов на 16%. Высокое гидростатическое давление от сотен до тысяч атмосфер, вызывает инактивацию и гибель разнообразных микроорганизмов, бактерий и вирусов (Lawrence, 1975; Hoover *et al.*, 1989; Margosch *et al.*, 2004; Moir *et al.*, 2002). В работе (Tanino *et al.*, 1992) показано, что внешнее гидростатическое давление является стрессом для наземных растений, не приспособленных к условиям жизни при высоких давлениях, как, например морские растения, живущие на глубинах до 10 - 12 тысяч метров. В этой работе

давлению разной амплитуды подвергались клетки растений (контрольные образцы) и клетки, предварительно обработанные гормоном общего стресса абсцизовой кислотой. Было показано, что при давлении 25 МПа выживаемость контрольных образцов была ниже, чем образцов, предварительно обработанных гормоном общего стресса. Авторы работы сделали вывод, что абсцизовая кислота увеличивает устойчивость растений к внешнему гидростатическому давлению, но остаётся неясным, может ли само гидростатическое давление являться подобием гормона общего стресса и вызывать адаптивные реакции растений к внешним стрессовым воздействиям.

Таким образом, давление как фактор внешней среды влияет на жизнедеятельность биологических объектов. В зависимости от условий, повышенное гидростатическое давление может оказывать разнонаправленное воздействие на организмы.

### 1.8. Давление как фактор переноса сигнальной информации

Ряд исследователей выдвигает гипотезу о присутствии гидравлической сигнальной системы в растениях. Согласно этой гипотезе, сигналом или первичным мессенджером на различные раздражители (например, солевой стресс, укус насекомого и т.д.), является гидравлическая волна, которая способна очень быстро распространяться по водной фазе сосудов ксилемы растения (Malone, 1992; Dziubinska, 2003). Эта гипотеза может объяснить тот факт, что некоторые растения быстро отвечают на внешние стимулы, что невозможно с помощью переноса сигнальных химических веществ. Во-первых, скорость распространения импульсов давления в водной фазе (акустической волны) порядка 1000-1500 м/с. Это может объяснять быстрые ответные реакции клетки на внешние раздражители (Malone, 1992; Malone *et al.*, 1994; Malone, Stankovich, 1991; Malone, Alarcon, 1995). Во-вторых, непрерывность гидродинамической системы клеток

обеспечивает необходимые пути для распространения импульсов давления. Втретьих, известно, что клетки содержат механочувствительные сенсоры на различные механические раздражители, например, на изменение натяжения плазмалеммы, гидростатическое давление, сжатие (Apodaca, 2002). В работе (Wan et al., 2004) показано, что импульсы давления определённой амплитуды, создаваемые внутри клетки с помощью специальной техники, могут изменять гидравлическую проводимость клеток, предположительно, путём действия на проницаемости мембранных водных каналов – аквапоринов. В частности, импульсы давления величиной от 0.1 МПа до 0.2 МПа, вне зависимости от знака (т.е. импульсы положительного и отрицательного давления), приводили к уменьшению гидравлической проводимости клеток (увеличению времени полуобмена) (рис. 1.8.1). Возможный механизм действия механического фактора (давления) на гидравлическую проводимость клетки авторы связывают с: 1) поступлением кинетической энергии импульса в сужение водопроводящего канала аквапоринов, которая может вызвать конформационные изменения канального белка (модель поступающей энергии); 2) создание разряжения в сужении канала аквапорина по принципу Бернулли для макроскопических пор (модель когезии-натяжения). Первая модель представляется более вероятной, так как вычисленные скорости водного потока в пределах каналов аквапоринов слишком малы, чтобы создать значительное разряжение (Wan et al., 2004). Импульсное давление используется и в прикладных задачах (Bartlett, 2010; Butz et al., 2003; Deliza et al., 2005; Нефедьева, Хрянин, 1999; Pradillon, Gaill, 2007). Например, в работе (Bari et al., 2008) импульсы давления использовались для инактиваци бактерий Salmonella Enteritidis. В работах (Нефедьева, 2010; Шиленков, 2006; Мазей, 2002) с помощью импульсов давления амплитудой до 30 МПа воздействовали на семена гречихи и других растений, обнаружив, что при определённых условиях, воздействие импульсным давлением вызывает повышение урожайности и устойчивость к солевому стрессу.



Рис. 1.8.1. Влияние положительных и отрицательных импульсов давления, создаваемых в отдельной клетке корня кукурузы, на время полуобмена  $T_{1/2}$  клеткой молекулами воды (Wan *et al.*, 2004).

### 1.9. Итоги литературного обзора

Из приведенного обзора литературных данных следует, что давление, наряду с температурой, является важным, неотъемлемым фактором внешней среды, и исследования роли и влияния фактора давления на биологические объекты, являются предметом внимания многих исследователей и представляют актуальность, как в фундаментальном, так и в прикладном отношении. Приведённые данные о влиянии давления на диффузию, времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации воды и водных растворов, а также данные об изменениях растворимости газов под давлением и температуры газовой фазы при действии давления в изохорических условиях, акцентируют внимание на факторах, которые следует учитывать при действии внешнего давления на растительные объекты. Одним из таких факторов в растении может быть наличие газовой фазы в виде воздуха межклеточных полостей.

Применительно к биологическим объектам, давление изучается как фактор, изменяющий скорость биохимических реакций и смещающий метаболическое равновесие, как движущая сила массопереноса и как переносчик сигнальной информации, как средство стимуляции или инактивации клеток животных и растений и т.д. Большая часть работ относится к области высоких давлений от 100 МПа и выше. Область физиологических давлений порядка 5 МПа, представлена относительно скромно, тем более, применительно к растениям. На сегодняшний день остается ряд вопросов, требующих решения. Например, не существует до конца устойчивой точки зрения о роли тургорного давления в росте клеток растяжением, отсутствует единая точка зрения относительно механизмов движущих сил подъема воды на десятки метров в деревьях. Отсутствуют представления о возможных регуляторных функциях давления. Особо следует подчеркнуть неустойчивость представлений о феномене колебательного или автоволнового режима корневого давления. Колебательный режим корневого давления проявляется в энергозависимых микроколебаниях потенциала давления паренхимных клеток (Жолкевич, 1979). Микроколебания потенциала давления приводят, в свою очередь, к пульсациям объема клеток (набухание/сжатие). Установлена пульсаций зависимость по амплитуде И факту появления/исчезновения от активаторов и ингибиторов метаболизма (АТФ, яды, и др.), стрессовых факторов (декапитация). Существующие в литературе объяснения механизма возникновения и роли пульсаций, сводятся к гипотезе работы контрактильных белков (Жолкевич, 2001). Важно отметить, что феномен пульсаций касается и клеток стебля и листьев, и его роль может не ограничиваться только рамками корневого давления, но и быть необходимым компонентом процесса роста растяжением. В подавляющем большинстве работ, посвященных доказательству участия контрактильных белков (КБ) в феномене пульсаций, скупо обсуждается вопрос о конкретном механизме обеспечения

контрактильными белками процесса пульсаций объема клеток. В чем локализуется нелинейный элемент обратной связи для возникновения пульсаций? Какова энергетическая обеспеченность работы контрактильных белков на поддержание пульсаций? Известным, надежным силовым механизмом, регулирующим объем клетки, является тургорное давление, которое может достигать значительных величин. Если, допустить, что давление влияет на межклеточную проводимость ткани (проводимость плазмодесм, проницаемость мембран), тогда вырисовывается цепь обратной связи и механизм пульсаций может получить благоразумное объяснение. Предположительно, механизм пульсаций объема клеток и связанный с ним колебательный режим корневого давления, учитывая литературные данные, может быть представлен в виде последовательной схемы переноса воды по симпластной системе. Перенос воды именно по симпластной системе может быть благоразумно связан с процессом полярного переноса воды от периферии корня к сосудам ксилемы, по градиенту химического потенциала (Зялалов, 1981). Именно для симпластной системы растения развиты представления о функционировании контрактильных (сократительных) белков, с которыми коррелируют данные о феномене клеточных пульсаций (Сапожникова, 2000). В литературе известен механизм изменения проводимости плазмодесм, через управляемое активацией контрактильных белков, изменение апертуры шейных сужений (ШС) плазмодесм. Функционирование контрактильных белков, локализованных в области ШС (Blackman et al., 1999), связано с концентрацией цитоплазматического кальция (Martindale, Salisbury, 1990), которая может изменяться в зависимости от величины тургорного давления клетки (Wu et al., 2012). Эти данные позволяют представить гипотетическую схему развития пульсаций объема клеток (рис. 1.9.1). Согласно этой схеме, вход воды в некоторую произвольную клетку коры корня обеспечивается, главным образом, известным осмотическим механизмом и растяжением сопровождается эластичной клеточной стенки. Увеличение тургорного давления клетки провоцирует изменение проводимости плазмодесм через изменение уровня И. соответственно, через кальция. активацию
сократительных белков. Изменение проводимости плазмодесм приводит к изменению интенсивности межклеточного переноса воды, вероятно путём сброса воды в соседние клетки по градиенту химического потенциала в радиальном направлении корня, благодаря сжатию предварительно растянутой клеточной стенки. К имеющимся в этой схеме литературным данным, не хватает прямых доказательств по влиянию давления на проводимость плазмодесм и плазмалеммы. Иными словами, необходимо выяснить, влияет ли давление на межклеточную водную проводимость.



Рис. 1.9.1. Гипотетическая схема развития пульсаций объема растительных клеток.

Для получения ответа на поставленные вопросы, наиболее перспективным представляется анализ реакции гидродинамической системы растения на действие

внешнего давления, выступающего в качестве возмущения, адекватного эндогенным силам и выводящего исследуемую систему из положения равновесия. При этом, практически очевидно, что эндомембранная система клеток растения, может быть первой мишенью для давления, и поэтому, задача расширяется до необходимости исследования реакции эндомембранной системы на давление, с оценкой толерантности клеток к фактору давления.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы образцы, различающиеся наличием/отсутствием ключевых элементов гидродинамической системы и объемом газовой фазы. В качестве объектов с развитой сетью плазмодесм (ПД) и сравнительно высоким объемом газовой фазы (воздухоносным объемом межклетников) служили 4-7-дневные растения кукурузы (Z. mays L., сорта Анюта и Кубань), а также пшеницы (*T. aestivum*, сорта Казанская 560). Объектом, с относительно низким объемом газовой фазы, заведомо не имеющим плазмодесм (ПД), но имеющим клеточную стенку, были клетки водной суспензии водоросли C. vulgaris. Объектом, не имеющим клеточной стенки и ПД, были клетки водной суспензии водоросли D. maritima. (рис. 2.1.1, a, б), выращенные в среде Тамия (Tamiya et al., 1953). Перед ЯМР экспериментом суспензии центрифугировали в тонкостенном тефлоновом контейнере, осадок в контейнере помещали в ампулу высокого давления.



Рис. 2.1.1. Фотографии микроводорослей *Chlorella vulgaris* (*a*) (средний размер клеток  $\approx 3.5$  мкм  $\times 2.5$  мкм) и *Dunaliella maritima* (б) (средний размер клеток  $\approx 9$  мкм  $\times 7$  мкм) (Loseva *et al.*, 2007).

Для анализа влияния давления на ростовые процессы, интактные растения кукурузы в среде выращивания вместе с контейнером помещали в камеру высокого давления и подвергали воздействию давления в 2 МПа или 4 МПа в течение 5 часов. Контрольные образцы помещали в аналогичную камеру и оставляли при атмосферном давлении. Сразу после воздействия давлением и в последующем через каждые сутки производили измерение длины побега и корня растений.

#### 2.2. Техника создания давления

Техника создания давления широко распространена и разнообразна в плане её реализации (Steudle, 1993; Анисимов и др., 2012). Типы создаваемых давлений (гидростатическое, гидродинамическое, капиллярное и т.д.), а также их диапазон, в основном зависят от поставленных задач. Большая доля исследований с использованием техники создания давления принадлежит области биофизики и биохимии, а также пищевой промышленности (Paul et al., 2004; Ohashi et al., 2007). Статическое давление создается сжатым до 15 МПа газом (воздухом) (рис. 2.2.1). Воздух из баллона высокого давления через понижающий редуктор и электроклапан подается в пневмомагистраль. При срабатывании электроклапана давление воздуха из пневмомагистрали передается в измерительную ЯМР ампулу высокого давления. Для сброса давления используется второй электроклапан. При требовании мягкой атаки давления на образец и сброса давления, соответственно, в подающей и выходной части пневмомагистрали устанавливаются дроссельные вставки. Набор вставок, выполненных из трубок разного диаметра, обеспечивает различные скорости подъема и сброса давления на образце. Включение быть автоматическим, электроклапанов может как ручным, так И OT синхроимпульсов ЯМР-релаксометра-диффузометра (рис. 2.2.1).

Определенного внимания заслуживает конструкция ампулы высокого давления. Для ЯМР исследований ампулы высокого давления изготавливаются, как правило, из молибденового стекла. Для высоких давлений от 10 МПа проблема устойчивости ампул к давлению обходится применением метода противодавлениях. В последнем случае приемо-передающий контур ЯМР датчика помещается в камеру из материала заведомо выдерживающего высокое давление. Использование метода противодавления усложняет конструкцию датчика ЯМР и целесообразно только для экспериментов с высокими давлениями. Что касается ампул из молибденового стекла, то, как показал опыт, применения, даже при сравнительно не высоких давлениях, порядка 2 – 4 МПа зачастую происходит разрыв ампулы во время эксперимента. Для применений при давлениях до 5 МПа оказалась достаточной ампула композиционного типа из фторопласта с корсетом из стекловолокнистых нитей, укрепленном эпоксидным компаундом. Для компенсации давления в аксиальном направлении ампулы использовали нити стекловолокна, уложенные вдоль образующей и огибающие дно ампулы. Сверху наматывается стекловолокнистая обмотка, сдерживающая радиальное давление. Сигнал от протонов затвердевшего компаунда релаксирует в микросекундном диапазоне и не мешает проведению экспериментов. Ампула подсоединяются к пневмосистеме через накидной резьбовой фланец. При необходимости для отделения объема ампулы от пневмосистемы и смягчения динамического удара воздуха при подаче давления, на торец ампулы может устанавливаться эластичная резиновая мембрана. Подводящий канал пневмосистемы представляет собой металлическую трубку внешним диаметром 3 мм, свернутую в спираль, что позволяет без значительных механических напряжений помещать ампулу в датчик ЯМР-релаксометра-диффузометра. При изохорическом подъеме давления со скоростью до 1 МПа/с, зарегистрированное повышение температуры образца составляло около 2 °C. Практически во всех экспериментах давление изменялось со скоростью не более 0.02 - 0.05 МПа/с, что приводило к подъему температуры лишь на 0.5 - 0.7 °C. Термическое равновесие в образце, после изменения

давления, устанавливалось за время около 2 мин. Для гарантированного установления термического равновесия, на каждом значении давления образец выдерживали до начала ЯМР измерений не менее 5 минут (Анисимов и др., 2014).



Рис. 2.2.1. Схема генератора статического давления, сопряженного с ЯМР диффузометром.

## 2.3. Методы определения тепловыделения и дыхания\*

Для оценки уровня тепловыделения растений кукурузы в контроле и после действия внешнего гидростатического давления использовали микрокалориметр ампульного типа LKB 2277-201. Измерения проводили по методике, приведённой в работе Алябьева А. Ю. (Алябьев, 1996). Дыхание корней кукурузы определяли с применением аппарата Варбурга по методике, описанной в работе (Семихатова, Чулановская, 1965).

<sup>&</sup>lt;sup>т</sup> Опыты выполнены совместно с сотрудниками лаб. Алябьевым А.Ю., Андреевой И.Н., Огородниковой Т.И.

## 2.4. Электронная и световая микроскопия\*\*

Для электронной микроскопии (ЭМ) использовали сегменты корня 7дневных проростков кукурузы. Апикальные фрагменты корня кукурузы длиной 7-8 мм фиксировали 12 ч в 2.5%-ном растворе глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2) и постфиксировали 2 ч в 1 %-ном OsO<sub>4</sub> на том же буфере с добавлением сахарозы (34 мг/мл). Образцы дегидратировали в растворах (30-70%) возрастающей концентрации спирта И ацетона (70-100%)последующим замещением ацетона окисью пропилена (45 мин). Сегменты корня пропитывали эпоксидной смолой Эпон-812 (Германия) и полимеризовали при 37, 45 и 57 °С по 24 ч. Полутонкие и ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-Ш (Швеция), контрастировали раствором уранилацетата и цитратом свинца (Абдрахимов и др., 2013). Препараты просматривали в оптическом микроскопе NU-2 (Германия) и в электронном микроскопе JEM-1200 EX (Япония). Фиксация образцов проводилась как непосредственно в камере без сброса давления, так и после сброса давления до уровня атмосферного. Камера давления подсоединялась к газовой системе через спирально свернутую длинную трубку-пневмопровод, что давало возможность без механических напряжений переворачивать камеру с образцом, находящуюся под давлением. При этом фиксатор глутаровый альдегид исследуемый образец. В качестве определения заливал целостности мембраны воздействия иитоплазматической клеток после давлением использовали краситель Эванс синий (Baker, Mock, 1994).

## 2.5. Основы ЯМР диффузометрии. Методика ЯМР измерений

Ядерный магнитный резонанс является одним из информативных, не разрушающих методов изучения трансляционной диффузии молекул жидкостей, а в биологических объектах – это, прежде всего, вода.

<sup>&</sup>lt;sup>\*\*</sup> Опыты выполнены совместно с с н.с. лаб. продукц. проц. растений КИББ КазНЦ РАН Абдрахимовым Ф.А.

Основы теории диффузионного затухания спинового эха были заложены в классической работе Торри 1953 года (Torry, 1953). Применение метода градиентного ЯМР для исследования трансляционной динамики молекул основано на регистрации потери фазовой когерентности спинов, за счет их трансляционных перемещений в градиенте магнитного поля (Steiskal, Tanner, 1965). Если неоднородность внешнего магнитного поля задана линейным по объёму образца и постоянным во времени градиентом

$$\mathbf{g}_{\mathrm{ox}} = \partial \mathbf{H}_{\mathrm{o}} / \partial \mathbf{x} \tag{2.1}$$

и если молекула образца, находившаяся в момент времени t = 0 в поле  $H_0(0)$ , за время t проходит путь, проекция которого на ось X равна x (t), тогда через указанное время она окажется в поле  $H_0(t) = H_0(0) + g_{ox}x(t)$ . В этом случае частота прецессии магнитных моментов, относящихся к данному ядру, изменится на величину  $\Delta \omega_0 = \gamma g_{ox} x(t)$ . Тогда относительное изменение фазы ядерных спинов молекулы к моменту времени t = 2т представляется в виде алгебраической суммы

$$\Phi(2\tau) = \gamma g_{\text{ox}} \left[ \int_0^\tau x(t) dt - \int_\tau^{2\tau} x(t) dt \right].$$
(2.2)

В общем случае амплитуду сигнала эхо  $A(2\tau,g)$ , измеренную в присутствии постоянного градиента поля  $g_{ox}$ , можно выразить через функцию распределения ядерных спинов  $P(\Phi)$  по относительным фазам  $\Phi$ .

$$A(2\tau, g) = A(2\tau, 0) \int_{-\infty}^{\infty} P(\Phi) \cos\Phi d\Phi \qquad (2.3)$$

где A (2 $\tau$ , 0) – амплитуда сигнала эхо, измеренная в отсутствие градиента g (H<sub>0</sub> – однородно). Функция распределения P(Ф) должна быть однозначно связана с функцией распределения P(x) ядерных спинов по смещениям x. В случае гауссового распределения P(x) диффузных перемещений x

$$P(x) = (2\pi < x^2 >)^{-1/2} \exp(-x^2/2 < x^2 >)$$
(2.4)

где <x<sup>2</sup>> – средний квадрат смещения ядерных спинов, связанный с коэффициентом их самодиффузии D<sub>s</sub> соотношением Эйнштейна

$$< x^2 > = 2D_s t$$
 (2.5)

Отсюда:

$$P(\Phi) = (2\pi < \Phi^2 >)^{-1/2} \exp(-\Phi^2/2 < \Phi^2 >).$$
(2.6)

Здесь <Ф<sup>2</sup>>− средний квадрат фазы спинового ансамбля. После подстановки (2.6) в (2.3) и интегрирования получим

A 
$$(2\tau, g) = A (2\tau, 0) \exp (-\langle \Phi^2 \rangle / 2).$$
 (2.7)

Значение < $\Phi^2$ > к моменту времени 2т

$$<\Phi 2> = \gamma^2 g_{0x}^2 < [\int_0^\tau x(t) dt - \int_\tau^{2\tau} x(t) dt]^2 >$$
 (2.8)

вычисляется из соотношения Эйнштейна. Окончательное выражение для амплитуды сигнала эхо при постоянной величине градиента магнитного поля g<sub>0</sub> в последовательности Хана имеет вид

A 
$$(2\tau, g) = A (2\tau, 0) \exp (-(2/3)\gamma^2 g_0^2 \tau^3 D_s).$$
 (2.9)

Множитель A (2т,0) характеризует изменение амплитуды сигнала за счёт спинспиновой релаксации и равен

$$A(2\tau, 0) = A(0) \exp(-2\tau/T_2)$$
(2.10)

где A (0) — амплитуда сигнала ЯМР, измеренная сразу после 90°-го импульса. При фиксированных значениях  $\gamma$  и D<sub>s</sub>, изменение амплитуды сигнала будет тем больше, чем больше будет значение  $g_0^2 \tau^3$  и, следовательно, чем больше эта величина, тем меньшие значения коэффициента самодиффузии можно измерить. Однако величина  $\tau$  ограничена скоростью ядерной релаксации и должна быть < T<sub>2</sub>, иначе амплитуда сигнала может оказаться слишком малой для измерения. При слишком больших значениях g<sub>0</sub> нарушаются условия резонанса для всего образца. Вместе с тем, очевидно, что соблюдение этих условий важно только во время возбуждения образца радиочастотными импульсами и во время регистрации сигнала спинового эхо. В остальном диапазоне времен величину градиента магнитного поля можно делать достаточно большой.

Метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля предложили Стейскал и Таннер в 1965 году (Steiskal, Tanner, 1965). В этом методе в последовательности 90° - τ - 180° - τ - эхо градиент магнитного поля g включают лишь в течение небольшого промежутка времени между 90° и 180°-ми радиочастотными импульсами и между 180°-м импульсом и сигналом эхо. Относительное изменение фаз прецессирующих ядер в этом случае должно учитывать зависимость градиента g от времени:

$$\Phi(2\tau) = \gamma [\int_0^\tau g(t) x(t) dt - \int_\tau^{2\tau} g(t) x(t) dt].$$
 (2.11)

В этой последовательности g(t) состоит из постоянного градиента  $g_0$  и двух прямоугольных импульсов градиента g длительностью  $\delta$ .

Амплитуда сигнала спинового эхо приобретает вид

$$A (2\tau, g) = A (2\tau, 0) \exp\{\gamma^2 D_s \{-(2/3)g_0^2\tau^3 - \delta[t_1^2 + t_2^2 + \delta(t_1 + t_2) + 2/3\delta^2 - 2\tau^2]gg_0 + \delta^2 (\Delta - 1/3\delta)g^2\}\}$$
(2.12)

где ∆ – интервал времени между импульсами градиента, t<sub>1</sub> – интервал времени между 90°-м импульсом и первым импульсом градиента, а t<sub>2</sub> – между 180°-м импульсом и вторым импульсом градиента.

В данной методике чётко фиксируется время t<sub>d</sub>= Δ – 1/3 δ, в течение которого происходит диффузия. Действительно, после выключения 90°-го импульса и до включения импульса градиента магнитного поля почти не происходит потери фазовой когерентности спинами и вектор намагниченности практически не меняется. В течение времени действия импульса градиента вектор суммарной намагниченности расфазируется значительно больше, а после – вновь незначительно. После подачи второго импульса градиента, создающего равное, но противоположное по знаку действие на спины, измеряемая амплитуда эхо будет тем меньше, чем больше необратимо расфазируется вектор намагниченности за счёт процесса диффузии молекул в образце. В отсутствие диффузии амплитуда эхо вообще не будет меняться, а в присутствии диффузии её

влияние на амплитуду эхо будет происходить лишь в промежуток времени между импульсами градиента, которое задаётся изначально.

Если величина g<sub>0</sub> много меньше g, то выражение для амплитуды стимулированного эха принимает вид:

A 
$$(2\tau, \tau_1, g) = A (2\tau, 0) \exp(-\gamma^2 g^2 \delta^2 t_d D_s),$$

где

A 
$$(2\tau, \tau_1, 0) = (A(0)/2) \exp(-2\tau/T_2 - \tau_1/T_1).$$
 (2.13)

Коэффициент самодиффузии, в эксперименте с последовательностью стимулированного эхо, вычисляют из тангенса угла наклона огибающей отношения амплитуд при включенном и выключенном градиенте  $A(2\tau,\tau_1,g)/A(2\tau,\tau_1,0)$  при варьировании одного из трёх параметров: g, t<sub>d</sub> или δ. Как правило, регистрируется диффузионное затухание A (g<sup>2</sup>) при фиксированных параметрах t<sub>d</sub> и δ. В этом случае остаются фиксированными временные интервалы между радиочастотными импульсами. Тогда на протяжении всего эксперимента будет постоянным вклад релаксационного затухания эха A (2 $\tau,\tau_1$ ,0), что может оказаться очень важным, когда простое соотношение (2.13) не выполняется.

Важным требованием к импульсам градиента магнитного поля, определяющее формирование сигнала спинового эхо является их идентичность. Из (2.12) следует, что значение  $\Phi = 0$ , которое удовлетворяет условию максимума сигнала спинового эхо в двухимпульсной методике, будет выполнено при t = 2 $\tau$ , если

$$\int_0^{\tau} g_1(t) \, dt = \int_{\tau}^{2\tau} g_2(t) \, dt.$$
 (2.14)

В противном случае равенство  $\Phi = 0$  выполнится в отличный от  $2\tau$  момент времени  $2\tau + \Delta t$ , когда

$$\int_0^{\tau} (g_1(t) + g_0) dt = \int_{\tau}^{2\tau} (g_2(t) + g_0) dt.$$
 (2.15)

Отсюда выражение для смещения эхо во времени:

$$\Delta t = \left[ \int_0^\tau g_1(t) dt - \int_\tau^{2\tau + \Delta t} g_2(t) dt \right] / g_0.$$
 (2.16)

Очевидно, что при невыполнении (2.14) и  $g_0 = 0$  из (2.16) невозможно наблюдать сигнал спинового эха вообще. Это означает, что постоянный градиент магнитного поля стабилизирует положение сигнала эха вблизи  $2\tau$ , так как равенство (2.12) в реальном эксперименте идеально выполняться не может.

Применительно к гетерогенным системам особенно к биологическим системам, анализ диффузии является сложной задачей. Для того чтобы обойти трудности полного количественного описания диффузионного поведения, в ряде случаев используется формализм эффективных коэффициентов диффузии, позволяющий абстрагироваться от полного анализа деталей диффузионного поведения намагниченности и сосредоточиться только на деталях, существенных для конкретно решаемой задачи. С учетом конечной точности регистрации сигналов намагниченности, для количественного описания диффузионного затухания в этом подходе, как правило, используется сумма экспоненциальных функций.

## 2.6. Методы оценки проницаемости мембран

Биологические мембраны являются барьерно-регуляторными структурами на пути движения воды и водных растворов, и оценка их проницаемости является важной экспериментальной задачей. В простейшем случае поток молекул воды через единичную поверхность мембраны, вызванный разностью концентраций (C<sub>1</sub> – C<sub>2</sub>), выражается следующим уравнением

$$J = -\frac{D(C_1 - C_2)}{\lambda} \tag{2.17}$$

где λ - толщина мембраны, *D* – коэффициент диффузии, характеризующий подвижность молекул воды в мембране.

Проницаемость мембраны *р* можно определить как

$$p = \frac{D_m}{\lambda}$$
, (Stein, 1986). (2.18)

Тогда уравнение (2.17) принимает вид

$$J = -p(C_1 - C_2). (2.19)$$

Также проницаемость можно определить как объем жидкости, прошедший через мембрану единичной площади за единицу времени, тогда

$$p = \frac{v}{\tau \cdot s} = \frac{1}{\tau} \left(\frac{s}{v}\right)^{-1} \tag{2.20}$$

где V можно представить как объём поры, S - площадь поверхности поры и  $\tau$  среднее время пребывания молекулы в поре (Сибгатуллин, 2010).

Для определения времени жизни молекулы в поре можно использовать методику, изложенную в работе (Conlon, 1972), которая заключается в том, что времена релаксации вакуолярной жидкости достаточно велики и близки к времени релаксации чистой воды. Внедрением парамагнитных частиц во внеклеточное пространство (например, парамагнитный комплекс GdDTPA) можно значительно уменьшить времена релаксации межклеточной воды. Тогда полученное  $T'_2$ экспериментально время релаксации вакуолярной жидкости будет определяться скоростью обмена с межклеточной жидкостью через мембраны и связано со временем релаксации чистой вакуолярной жидкости T<sub>2</sub> соотношением:

$$\frac{1}{T_{2}} = \frac{1}{T_{2}} + \frac{1}{\tau}$$
(2.21)

где т – среднее время нахождения (время жизни) молекулы воды в вакуоли (Сибгатуллин, 2010).

Это соотношение выполняется при медленном обмене (Winkler, Michel, 1985) когда времена жизни в фазе больше времен релаксации. Зная радиус и форму клеток образца можно найти соотношение S/V. К примеру, если в качестве формы клеток выбрать сферическую, то в этом случае выполняется равенство:

$$\frac{S}{V} = \frac{3}{R} \tag{2.22}$$

где *R* – радиус сферы.

Таким образом, зная среднее время нахождения молекул воды в вакуоли и соотношение S/V по формуле (2.20) можно вычислить проницаемость мембраны. С помощью этой методики были получены значения проницаемости в различных объектах растительного (Stout *et al.*, 1978; Snaar, Van As, 1992) и животного происхождения (Conlon, 1972).

Для вычисления проницаемости плазмалеммы клеток корней кукурузы, в данной работе был использован релаксационный метод ЯМР, основанный на точном решении обратной задачи обмена (Балла, 1985). Как известно, обмен между двумя компартментами молекул, различающимися временами релаксации, приводит к укорочению измеряемых времен релаксации каждой фазы (Балла, 1985). Величина укорочения, среди прочих причин, зависит от скорости обмена. Растительные ткани, как правило, характеризуются двухкомпонентной протонной магнитной релаксацией (Stout, et al., 1978). Причём двухкомпонентный характер наблюдается в спадах как продольной, так и поперечной намагниченности. В наиболее благоприятной ситуации компоненты релаксации могут быть отнесены соответственно к внеклеточной и внутриклеточной воде. Однако, во многих случаях, фазы вне- и внутриклеточной воды гетерогенны по временам релаксации и перепутаны по локализации в ткани. Например, внеклеточные области могут содержать объемы воды с временами релаксации близкими к таковой для вакуоли. К счастью, доступность внеклеточного пространства для внедрения парамагнетика, упрощает задачу с разделением по релаксации. Внедрение во внеклеточное пространство парамагнитных ионов высокой релаксационной эффективности, не проникающих через плазмалемму в клетки, позволяет резко времена релаксации внеклеточной укоротить воды, В то время как внутриклеточная вода укорачивается от своего начального стартового уровня в

значительно меньшей степени и только процессом обмена. При быстром обмене молекулами внутри фаз внеклеточной и внутриклеточной воды и при медленном или промежуточном водном обмене между фазами, релаксационные затухания намагниченности, в варианте с парамагнитным допингом, представляют собой двухкомпонентные кривые, где быстро затухающая компонента относится к внеклеточной воде, а медленно затухающая - к внутриклеточной воде.

При наличии обмена между фазами измеряемые времена релаксации и доли компонент являются кажущимися, искаженными обменом. В работе Циммермана-Бриттена приводится теоретическое описание влияния обмена на параметры релаксации (Zimmerman, Brittin, 1957), которые особенно наглядно применимы к двухфазной системе. При наличии двух, обменивающихся между собой состояний (а) и (b), наблюдаемые в эксперименте кажущиеся релаксационные параметры, характеризующие эти состояния (помеченные штрихом), связаны с истинными релаксационными параметрами выражениями (2.23) – (2.26):

$$\frac{1}{T_{a}} = \frac{1}{2} \left\{ \left( \frac{1}{T_{a}} + \frac{1}{T_{b}} + \frac{1}{\tau_{a}} + \frac{1}{\tau_{b}} \right) - \sqrt{\left( \frac{1}{T_{b}} - \frac{1}{T_{a}} + \frac{1}{\tau_{b}} - \frac{1}{\tau_{a}} \right)^{2} + \frac{4}{\tau_{a}\tau_{b}}} \right\}$$
(2.23)

$$\frac{1}{T_{b}} = \frac{1}{2} \left\{ \left( \frac{1}{T_{a}} + \frac{1}{T_{b}} + \frac{1}{\tau_{a}} + \frac{1}{\tau_{b}} \right) + \sqrt{\left( \frac{1}{T_{b}} - \frac{1}{T_{a}} + \frac{1}{\tau_{b}} - \frac{1}{\tau_{a}} \right)^{2} + \frac{4}{\tau_{a}\tau_{b}}} \right\}$$
(2.24)

$$P'_{b} = \frac{1}{2} \frac{(P_{b} - P_{a}) \left(\frac{1}{T_{a}} - \frac{1}{T_{b}}\right) + \frac{1}{\tau_{a}} + \frac{1}{\tau_{b}}}{\sqrt{\left(\frac{1}{T_{b}} - \frac{1}{T_{a}} + \frac{1}{\tau_{b}} - \frac{1}{\tau_{a}}\right)^{2} + \frac{4}{\tau_{a}\tau_{b}}}}$$
(2.25)

$$P'_{a} = 1 - P'_{b}. (2.26)$$

Эти выражения могут быть использованы для решения обратной задачи, а именно определения истинных (не возмущённых обменом) параметров,  $T_a$ ,  $T_b$ ,  $P_a$ ,  $P_b$  через экспериментально наблюдаемые, а также нахождения параметров,  $\tau_a$ ,  $\tau_b$  характеризующих обменные процессы. Поскольку число неизвестных в уравнениях (2.23) - (2.26) превосходит число уравнений, задача

зачастую решается в соответствующих приближениях:  $T_a \gg T_b$ ,  $P_a \ge P_b$ ,  $\frac{T_b}{\tau_b} < 0.3$ .

В работе (Балла, 1985), было обращено внимание на тот факт, что уравнения (2.23) - (2.26) справедливы как для спин-решёточной, так и для спин-спиновой релаксации (Woessner, 1961) и тогда, используя условие детального равновесия  $\frac{P_a}{\tau_a} = \frac{P_b}{\tau_b}$ , можно получить восемь независимых уравнений для восьми искомых параметров (Балла, 1985):

$$\frac{1}{T_{1a}} + \frac{1}{T_{1b}} + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} = B_3$$
(2.27)

$$\left(\frac{1}{T_{1b}} - \frac{1}{T_{1a}} + \frac{1}{\tau_b} - \frac{1}{\tau_a}\right)^2 + \frac{4}{\tau_a \tau_b} = B_1^2$$
(2.28)

$$(P_b - P_a)\left(\frac{1}{T_a} - \frac{1}{T_b}\right) + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} = B_5$$
(2.29)

$$\frac{P_a}{\tau_a} = \frac{P_b}{\tau_b} \tag{2.30}$$

$$\frac{1}{T_{2a}} + \frac{1}{T_{2b}} + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} = B_4$$
(2.31)

$$\left(\frac{1}{T_{2b}} - \frac{1}{T_{2a}} + \frac{1}{\tau_b} - \frac{1}{\tau_a}\right)^2 + \frac{4}{\tau_a \tau_b} = B_2^2$$
(2.32)

$$(P_b - P_a)\left(\frac{1}{T_{2a}} - \frac{1}{T_{2b}}\right) + \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} = B_6$$
(2.33)

$$P_a + P_b = 1,$$
 (2.34)

где  $B_1 = \frac{1}{T'_{1b}} - \frac{1}{T'_{1a}}, \quad B_2 = \frac{1}{T'_{2b}} - \frac{1}{T'_{2a}}, \quad B_3 = \frac{1}{T'_{1a}} + \frac{1}{T'_{1b}}, \quad B_4 = \frac{1}{T'_{2a}} - \frac{1}{T'_{2b}},$  $B_5 = (P'_{1a} - P'_{1b})B_1, B_6 = (P'_{2a} - P'_{2b})B_2.$ 

Из уравнений (2.27) – (2.29) с учётом (2.30) и (2.34) неизвестные  $\frac{1}{T_{2a}}$ ,  $\frac{1}{T_{2b}}$ ,  $\frac{1}{\tau_a}$ ,  $\frac{1}{\tau_b}$  могут быть выражены через  $P_a$ :

$$\frac{1}{\tau_a} = B_1 D_1 (1 - P_a) \pm B_1 C_1 (1 - 2P_a) \sqrt{\frac{1 - P_a}{P_a}}$$
(2.35)

$$\frac{1}{\tau_b} = B_1 D_1 P_a \pm B_1 C_1 (1 - 2P_a) \sqrt{\frac{P_a}{1 - P_a}}, \qquad (2.36)$$

где  $C_1 = \sqrt{P'_{1a}P'_{1b}}, D_1 = 1 - 2P'_{1b}.$ 

В итоге, обратная задача решается точно в общем виде (Балла, 1985). Выражения (2.35) – (2.36) могут быть использованы для расчётов во всех случаях, когда магнитная релаксация системы, как по  $T_1$ , так и по  $T_2$ , имеет двухкомпонентный характер, за исключением случая когда одновременно  $T_{1a} = T_{2a}$  и  $T_{1b} = T_{2b}$ , но данная ситуация в биологических объектах, как правило, не имеет места быть. Наконец в том случае, когда оба или один из спадов продольной и поперечной намагниченностей имеют одноэкспоненциальнй характер, для определения времён обмена может быть, опять-таки, использован метод «парамагнитного допинга».

Вычисление суммарной водной проницаемости p клеток корней кукурузы производили с помощью диффузионной методики ЯМР. В работе (Powles *et al.*, 1992) приведён, достаточно простой анализ длинновременного режима диффузии, основанный на применении параметров проницаемости p пористой системы и среднего размера пор d, и получено точное аналитическое уравнение для системы "тонких" полупроницаемых барьеров, которое в пределе больших времен диффузии дает уравнение аналогичное предложенному ранее в работе (Crick, 1970):

$$\frac{1}{D_{\infty}} = \frac{1}{D_0} + \frac{1}{p \cdot d}$$
(2.37)

где  $D_{\infty}$ ,  $D_0$  - коэффициенты самодиффузии молекул жидкости в пределах бесконечно больших и бесконечно малых времён диффузии соответственно.

Данная методика анализа диффузионного поведения, является более предпочтительной для оценки водной проницаемости клеток, поскольку позволяет параллельно определять и использовать в вычислениях соотношение площади поверхности клеток к объему клеток. Используя метод, предложенный в работе (Valiullin, Skirda, 2001), был определён характеристический размер ограничений. В диффузионном методе определения проницаемости клеточная ткань не испытывает внешних воздействий, например, добавление парамагнитных частиц (Conlon, 1972), и сохраняет свои свойства неизменными. При этом ограничения на форму клеток не являются существенными.

## 2.7. Характеристики ЯМР-диффузометра

В данной работе для контроля межклеточного транспорта воды в растениях была использована техника спинового эха с импульсным градиентом магнитного поля – ЯМР-диффузометр (Анисимов, Раткович, 1992). ЯМР-диффузометр работал на резонансной частоте на протонах 19.1 МГц, с применением процедуры накопления сигнала и фазового циклирования. В экспериментах использовали два типа магнитных систем: электромагнит с напряженностью рабочего поля в 4.5 кГс при максимально достижимом поле 21.14 кГс в зазоре 30мм и постоянный магнит с полем 4.5 кГс в зазоре 26 мм. Датчик ЯМР с приемопередающим контуром последовательного резонанса (Кларк, 1973) на ампулы диаметром до 12 мм. Приемник с динамическим диапазоном до 60 дб, с предусилителем чувствительностью лучше 1 мкв при отношении сигнал/шум >= 2. Программаторсинтезатор р/ч импульсов цифрового типа с прямой генерацией р/ч импульсов с фазой задаваемой с компьютера Детектор квадратурный с выходом на амплитудно-цифровой преобразователь. Регистрация амплитуды сигналов эха многостробовая. Программатор импульсных последовательностей произвольный, позволяющий реализовать широкий ряд импульсных последовательностей для

измерения времен релаксации и коэффициентов диффузии. Усилитель мощности р/ч импульсов широкополосный. Импульсный градиент магнитного поля величиной до 5 Тл/м в радиальном и аксиальном направлениях формируется генератором стабильных импульсов тока с относительной нестабильностью менее 10<sup>-6</sup>.Градиентные катушки квадрупольного типа (Уэбстер, 1974) для создания градиента dH<sub>z</sub>/dzв радиальном направлении ампулы с образцом и модифицированные катушки Андерсона (Anderson, 1961) для создания градиента dH<sub>z</sub> /dy в аксиальном направлении ампулы. Система термостатирования исследуемого образца в диапазоне от +5 до + 50 °C для диффузометра на электромагните жидкостная, для диффузометра на постоянном магните газовая от -50 до +50 <sup>0</sup>C с обратно/встречным, для сведения к минимуму продольных температурных градиентов, обдувом образца. Набор импульсных последовательностей включает классическую 2-х импульсную одношаговую и бегущую последовательность Хана (Hahn, 1950), последовательность измерения T<sub>1</sub> инверсия – восстановление (180<sup>0</sup> - 90<sup>0</sup>) (Леше, 1963), трехимпульсную последовательность стимулированного эха (90°- 90°- 90°), последовательность Кара-Парселла-Мейбума-Джилла (Meiboom, Gill, 1958), последовательность измерения Т<sub>1</sub> за одно прохождение.

В диффузионных измерениях использовали трёхимпульсную последовательность стимулированного эха (Steiskal, Tanner, 1965) при амплитуде импульсов градиентного поля до 5 Тл/м, и длительности до 2 мс (рис. 2.7.1).

Регистрировали относительную амплитуду сигнала спин-эха – фактор R в зависимости от длительности – δ и амплитуды – g импульсов градиента при изменении интервала Δ между ними как параметра. Для количественной оценки диффузионного переноса воды использовали формализм эффективных коэффициентов диффузии, измеренных при максимально возможных значениях времен наблюдения за диффузией (Anisimov, 2004).



Рис. 2.7.1. Трехимпульсная последовательность стимулированного эхо с импульсным градиентом (Steiskal, Tanner, 1965).

Средний эффективный коэффициент диффузии определяли по декременту затухания ДЗ при g → 0, т.е. по наклону начального участка ДЗ экстраполируемого экспонентой (Valiullin, Skirda, 2001):

$$\mathbf{R} = \exp(-\gamma^2 \, \delta^2 \, \mathbf{g}^2 \, \mathbf{t}_{\rm d} \, \mathbf{D}_{\rm eff})$$

где  $\gamma$  – гиромагнитное отношение для протонов,  $\delta$  – длительность импульсов градиента, g – амплитуда импульсов градиента, t<sub>d</sub>= $\Delta$ - $\delta$ /3 время диффузии, D<sub>eff</sub> – средний эффективный коэффициент диффузии. Увеличение угла наклона ДЗ качественно свидетельствует о росте уровня межклеточного переноса воды (Анисимов и др., 2014).

Для выделения из общего межклеточного транспорта воды компоненты переноса по симпласту использовали метод парамагнитного допинга (Анисимов и др., 1983). Эффект достигался внедрением во внеклеточное пространство парамагнитного комплекса GdDTPA (соль диэтилентриаминпентауксусной кислоты, 0.025 М), проникающего во внеклеточное пространство, но не проникающего в клетки. Для ускорения внедрения использовали вакуумную инфильтрацию. В предварительных экспериментах установлено, что собственно вакуумная инфильтрация не влияет на динамику спада ДЗ (Анисимов и др., 2014).

## 2.8. Статистическая обработка

Серийный образец для ЯМР исследований приготавливали из 35-40 сегментов корней всасывающей зоны, длиной порядка 15 мм, что позволяло достичь должного усреднения биологической вариации параметров корней. Для сведения к минимуму разброса данных из-за шумов аппаратуры во всех измерениях использовали не менее чем десятикратное накопление сигналов намагниченности с 4-х шаговым фазовым циклированием р/ч импульсов и опорного р/ч напряжения на фазовый детектор. Количественное вычисление D<sub>eff</sub> проводили по начальному спаду намагниченности, в условиях, когда уровень отношения сигнал/шум был более 100 (Анисимов и др., 2014). Все опыты проводили не менее чем в 3-х биологических повторностях, при температуре 23 °С. Для статистической обработки данных использовали программу Origin 8.5. На рисунках данные приведены в виде среднеарифметических значений и их стандартных отклонений.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

## 3.1 Влияние давления на рост растений кукурузы и структурную организацию клеток корней кукурузы

### 3.1.1. Влияние давления на рост растений кукурузы

Воздействие на растения кукурузы внешним давлением в 2 МПа в течение 5 часов не вызывало достоверных изменений в скорости роста, в то время как действие давления в 4 МПа в течение такого же времени экспозиции приводило к как наземной подземной частей торможению роста так И растений. Непосредственно через 5 ч после нахождения в барокамере средняя длина корня и побега в пределах ошибки измерений не отличалась от таковых для контрольных растений (рис. 3.1.1, а). На четвертые сутки после 5-ти часового выдерживания под давлением 4 МПа длина надземной и подземной частей растений составляла соответственно 76% и 68% от контроля, т.е. была существенно ниже контрольных значений (рис. 3.1.1, а. б).



Рис. 3.1.1. Эффект 5-часового воздействия внешнего гидростатического давления на рост проростков кукурузы, *a*) – сразу после воздействия, *б*) – через 4 суток после воздействия.

При воздействии давлением скорость роста корней кукурузы снижалась с 2.6 см/сут до 0.4 см/сут и полностью восстанавливалась до контрольных значений

на следующие сутки после 5-ти часового воздействия (рис. 3.1.2). В совокупности, полученные данные, свидетельствуют о чувствительности процесса роста растяжением к гипербарии.



Рис. 3.1.2. Влияние внешнего давления на скорость роста корней проростков кукурузы. Скорость роста после воздействия снижалась с 2.6 см/сут до 0.4 см/сут и полностью восстанавливалась до контрольных значений на следующие сут после прекращения воздействия.

Ингибирование роста растений в условиях гипербарии, очевидно, должно сопровождаться также и изменениями других физиологических параметров растения, как основных показателей жизнеспособности. В связи с этим, были проведены эксперименты по регистрации параметров дыхания и тепловыделения растений под воздействием внешнего гидростатического давления. Измерения параметров дыхания под давлением 4 МПа показали, что уровень дыхания имеет тенденцию к снижению с сохранением временной динамики, по крайней мере, в течение 3 часов и зависит от времени воздействия на образец повышенного давления. Так, 15 минутное воздействие снижает уровень дыхания примерно на

10% (рис. 3.1.3, *a*), в то время как воздействие в течение 60 минут ведёт к снижению приблизительно на 40% (рис. 3.1.3, *б*). Способность к тепловыделению под давлением падала в среднем на 30% по сравнению с контролем (рис. 3.1.4).



Рис. 3.1.3. Уровень дыхания клеток корней кукурузы в контроле и после воздействия давлением 4 МПа в течение 15 мин (*a*) и в течение 60 минут (*б*).



Рис. 3.1.4. Отношение уровня тепловыделения клеток корней кукурузы, после воздействия давлением 4 МПа в течение 60 мин, к контрольному уровню тепловыделения.

Таким образом, повышение гидростатического давления ведет К торможению роста растений (рис. 3.1.1, а, б; рис. 3.1.2). По некоторым данным, ингибирование роста может происходить в ответ на повышение осмотического давления (Bartels, Sunkar, 2005; Munns, 2011), при этом рост побега, в отличие от корней, оказывается более чувствительным к осмотическому стрессу (Bartels, Sunkar, 2005). В наших опытах наблюдается пропорциональное снижение скорости роста, как корня, так и побега (рис. 3.1.1, а, б), причем при значениях давлениях на порядок ниже величины давления, при которых наблюдается прекращение деления клеток у эукариот (Iwahashi et al., 2005). Поэтому, причиной торможения роста корней, по всей вероятности, является ингибирование роста растяжением.

## 3.1.2. Влияние давления на структурную организацию эндомембранной системы клеток корней кукурузы

Ограниченное количество данных по влиянию давления физиологического диапазона на внутриклеточные структуры (отсутствие панорамы данных влияния давления на растительные клетки), привело к необходимости первоочередного исследования влияния давления на эндомембранную систему клеток, как первую мишень на пути давления. С помощью методов световой и электронной микроскопии исследовались сегменты проростков корней кукурузы в норме и под давлением в 2 и 4 МПа. Выбор величины давления обусловлен диапазоном физиологических давлений характерных для растительных клеток и перспективой наблюдения контрастных эффектов с ростом давления до 4 МПа. На рис. 3.1.5 приведены данные световой микроскопии поперечного сечения корня кукурузы из зоны всасывания в контроле, после действия давления (2 МПа в течение 30 мин), после действия давления (4 МПа в течение 30 мин) и после сброса давления до атмосферного.



Рис. 3.1.5. Фотографии поперечного сечения всасывающей зоны сегментов корня кукурузы, полученные методом световой микроскопии: *a* – контроль, *б* – под давлением 2 МПа, *в* – под давлением 4 МПа, *г* – после сброса давления с 4 МПа до атмосферного.

Поскольку вода, в отличие от газов, при использованных величинах давления не сжимается, происходящие изменения в размере корня, а точнее его уменьшение в диаметре, можно связать со сжатием объема межклеточных воздухоносных полостей (рис. 3.1.5, *б*, *в*). После сброса давления размер корня

остается уменьшенным, из-за остаточной деформации первоначальной упаковки клеток (3.1.5, *г*).

По данным электронной микроскопии, клетки контрольных растений в конце зоны растяжения (5 мм от кончика корня) имели крупную центральную вакуоль, ядро дисковидной формы и тонкий пристенный слой цитоплазмы (рис. 3.1.6, а, б) (Абдрахимов и др., 2013). Их плазмалемма была умеренно волнистой и плотно прилегала к клеточной стенке (рис. 3.1.6, б, в). Гиалоплазма имела среднюю электронную плотность и содержала завитки полисом (рис. 3.1.6, в, г) (Абдрахимов и др., 2013). Округлые ортодоксальные митохондрии, короткие цистерны ЭС и диктиосомы были диффузно и равномерно распределены по объему цитозоля (рис. 3.1.6, б-г). Число челночных везикул у цистерн диктиосом немногочисленно. Тонопласт клеток коры часто осмиофилен и адкрустирован электронно-плотным веществом. Аналогичное вещество в виде хлопьев и гранул выявлялось и в полости центральной вакуоли (рис. 3.1.6, б, г) (Абдрахимов и др., 2013).

В условиях внешнего давлении 2 МПа (30 мин) наблюдали округление ядер (рис. 3.1.7, а), кластеризацию элементов ЭС с образованием участков эргастоплазмы (рис. 3.1.7, б, д). Набухание полости сети было незначительным. Одновременно выявлялось просветление матрикса митохондрий (рис. 3.1.7, в) и распад полисом на моносомы (рис. 3.1.7, г, д) (Абдрахимов и др., 2013). Увеличение электронной плотности цитозоля сопровождалось ростом В цитоплазме числа мелких провакуолей (рис. 3.1.7, а). Редукция электронной плотности мембраны тонопласта сопровождалась уменьшением в вакуолях количества осмиофильных включений (рис. 3.1.7, а, в, д) (Абдрахимов и др., 2013). При давлении 4 МПа характер структурных изменений в цитозоле, диктиосомах, митохондриях (рис. 3.1.8, а-в) в целом был аналогичен альтерациям, выявленным при давлении 2 МПа (рис. 3.1.7, а-д) (Абдрахимов и др., 2013). Удвоение величины давления индуцировало возникновение альтераций в тонопласте (рис. 3.1.8, в,

стрелки). На электроннограммах они выявлялись как области перфораций, что могло указывать на нарушение целостности мембраны центральной вакуоли (рис. 3.1.8, в) (Абдрахимов и др., 2013).



Рис. 3.1.6. Ультраструктура клеток коры из зоны растяжения корней контрольных растений, зафиксированных при атмосферном давлении. Ядро дисковидной формы (а) расположено в тонком пристенном слое цитоплазмы (б). Гиалоплазма средней электронной плотности, содержит многочисленные полисомы (в, г). Элементы ЭС – цистерны и диктиосомы аппарата Гольджи – распределены равномерно по объему цитозоля (в, г). (В - вакуоль, КС – клеточная стенка, М – митохондрия, КГ – комплекс Гольджи, ЭС – эндоплазматическая сеть, Я - ядро).



Рис. 3.1.7. Ультраструктура клеток коры из зоны растяжения корней кукурузы, зафиксированных при внешнем давлении 2 МПа (30 мин). Округление ядер (а) сопровождалось агрегацией цистерн ЭС (б), просветлением матрикса митохондрий (в), распадом полисом и скоплением транспортных везикул (г, д).



Рис. 3.1.8. Влияние внешнего давления 4 МПа (30 мин) на ультраструктуру клеток коры из зоны растяжения корней кукурузы, зафиксированных при давлении 4 МПа. Агрегация ЭС, диктиосом, транспортных везикул (а, в) и просветление матрикса митохондрий (б) сопровождается нарушениями целостности тонопласта (г).

Резкое снижение гидростатического давления до атмосферного приводило к увеличению повреждений тонопласта (рис. 3.1.9, а, б, стрелки). При этом характер других изменений (агрегация сети и диктиосом с везикулами, просветление митохондрий), выявленных при фиксации образцов в условиях повышенного давления, существенно не изменялся (рис. 3.1.9, в, г) (Абдрахимов и др., 2013).



Рис. 3.1.9. Ультраструктура клеток коры из зоны растяжения корней кукурузы при быстром сбросе внешнего давления до атмосферной величины. Образцы зафиксированы при атмосферном давлении: а, в - сброс давления с 2 МПа до атмосферного; б, г – сброс давления с 4 МПа до атмосферного.

При анализе ультраструктуры клеток опытных растений, ИЗ зоны были выявлены существенные растяжения корня, изменения клеточной организации (рис. 3.1.6 – рис. 3.1.9). В клетках происходило уменьшение содержания полисом в цитозоле, кластеризации элементов эндоплазматической сети и диктиосом аппарата Гольджи (рис. 3.1.7, б, г; рис. 3.1.8, а - в). В периферической части диктиосом отмечалось накопление транспортных везикул, содержащих электронноплотное вещество (рис. 3.1.7, г). По совокупности выявленных структурных альтераций и морфологических изменений хондриома (рис. 3.1.7, в; рис. 3.1.8, б), можно сделать предположение о торможении метаболических процессов, включая биосинтез белков и трафик в мембранной системе, что достаточно хорошо коррелирует с ингибированием роста растений кукурузы (рис. 3.2.1, а, б; рис. 3.2.2). Сохранение обнаруженных альтераций (рис. 3.1.7; рис. 3.1.8) при декомпрессии (рис. 3.1.9), говорит о прямом влиянии внешнего давления на ультраструктуру растительной клетки. Декомпрессия увеличивала частоту нарушений мембраны тонопласта, но не влияла на общий характер изменений (Абдрахимов и др., 2013).

Наибольший интерес вызывает эффект влияния давления на эндомембранную систему клеток живых организмов, так как эндомембранная будучи замкнутой системой, сеть. должна максимальную иметь чувствительностью к изменению внешнего давления (Гамалей, 2004). В наших опытах эта чувствительность выражается, прежде всего, в кластеризации цистерн эндоплазматической сети. Под действием давления, цистерны сети формировали агрегаты, часто с более или менее хаотично расположенными цистернами (рис. 3.1.7, б, д; рис. 3.1.8, а, в) (Абдрахимов и др., 2013).

Обычно, цистерны эндоплазматического ретикулума колокализованы с элементами актинового цитоскелета и в форме гексагональной сети равномерно распределены в клеточном объеме (Snapp *et al.*, 2003; Sparkes, 2011). При исследовании ультратонких срезов, такая сеть выявляется в виде диффузно

расположенных в объеме клетки уплощенных цистерн (рис. 3.1.6, в, г) (Абдрахимов и др., 2013).

Показано, что у растений актомиозиновая система играет основную роль в организации и динамике элементов эндомембранной системы и трафике ее производных – транспортных везикул (Sparkes, 2011). Факт кластеризации сети (рис. 3.1.7, б; рис. 3.1.8, а), диктиосом аппарата Гольджи (рис. 3.1.7, г; рис. 3.1.8, в) и транспортных везикул (рис. 3.1.8, в) может указывать на чувствительность актино-миозинового комплекса к изменениям давления (Абдрахимов, и др., 2013). Подобная чувствительность показана в работе (Kawarai, 2006), но при давлениях на порядок выше тех, что были использованы нами. Обычно, кластеризация элементов ЭС, с образованием участков эргастоплазмы, характерна ДЛЯ секретирующих клеток растений и животных (Snapp et al., 2003). В таких клетках формирование кластеров ЭС находится под контролем самой клетки, а кластеры представляют собой плотно упакованные, уплощенные цистерны. Выявленная в ЭC. наших опытах агрегация элементов носила скорее хаотичный И неуправляемый характер.

Известно, что эндоплазматическая сеть как органелла, отвечает за ряд важных физиологических процессов, включая синтез, фолдинг И посттрансляционную модификацию большинства мембранных и секреторных белков (Samali et al., 2010). Реакция стресса эндоплазматической сети, в общем случае, формируется, когда физиологические или внешние условия оказывают влияние на процессы белкового фолдинга, что приводит к накоплению в полости ЭС незрелых или неправильно собранных белков (Fulda et al., 2010). Такая реакция характеризуется активацией трех стресс рецепторов в ЭС: PKR-подобной ER киназы ЭС (PERK), активирующего транскрипционного фактора 6 (ATF6) и инозитол зависимого фермента 1 (Ire1) которые в свою очередь, вовлечены в реакцию клетки на unfolded protein (UPR) (Абдрахимов и др., 2013). Совместно три ветви ответа блокируют трансляцию, увеличивают экспрессию шаперонов и усиливают ЭС-зависимые пути деградации полипептидов. Если мощность

реакции UPR недостаточна для детоксикации секретируемых продуктов, запускается ЭС индуцируемая гибель клеток (Абдрахимов и др., 2013). В настоящее время, молекулярная сигнатура для развития реакции UPR в клетках растений до конца не расшифрована. Существуют данные, что активация bZIP17 аналога ATF6 может происходить при солевом стрессе (Liua, Howell, 2010).

В 2012 г в работе (Varadarajan et al., 2012) описан процесс быстрой и обратимой реорганизации ЭС, предшествующий формированию стрессовых реакций в клетках и представляющий собой специфическое ремоделирование системы мембран сети (ER membrane remodeling (EMR)). Этот процесс характеризуется кластеризацией ЭС в большие и компактные агрегаты, которые по своей морфологии напоминают агрегаты цистерн ЭС, выявленные нами в условиях избыточного давления (гипербарии) (рис. 3.1.7, б; рис. 3.1.8, а). По мнению авторов, этот ответ сети эволюционно консервативен, сопровождается прекращением трансляции и секреции, но, в отличии от хорошо известной реакции стресса ЭС (UPR), полностью обратим (Varadarajan et al., 2012). Наблюдаемые нами морфологические изменения клеток корня, прекращение его роста и обратимость функциональных характеристик при декомпрессии более соответствуют реакции сети описанной в работе (Varadarajan et al., 2012), чем «классической» реакции стресса ЭС (Fulda et al., 2010; Абдрахимов и др., 2013). Одной из причин появления перфораций в тонопласте может быть замедление трафика мембранного материала в растущую вакуоль, в результате которого прекращается клеток растяжением. Целостность тонопласта, рост И, следовательно, способность клетки генерировать трансмембранный потенциал ионов водорода, необходимый для вторичного транспорта осмотиков, являются критичными для ростовых процессов в зоне растяжения (Абдрахимов и др., 2013).

Таким образом, воздействие внешним гидростатическим давлением до 2-4 МПа, приводит к значительным структурным изменениям в эндомембранной системе клеток, проявляющимся в виде альтераций органелл, участвующих в мембранном трафике, нарушении целостности тонопласта (при 4 МПа). Наряду с

перечисленными изменениями в ультраструктуре, под воздействием давления происходит снижение физиологических параметров клеток растений, таких как дыхание и тепловыделение, что говорит о замедлении клеточного метаболизма и, по всей вероятности, является причиной ингибирования роста клеток.

## 3.2. Влияние внешнего давления на водный перенос в растениях. Фактор газового компонента

В исследовании транспорта воды под внешним давлением, необходимо учитывать наличие в исследуемых объектах газового компонента. В наземных растениях компонента представлена газовая воздухом межклетников И эндогенными газами. Исследования связи газового компонента с межклеточным в растительных объектах представляют, в переносом воды принципе, самостоятельную задачу, однако связи газовой компоненты растительных тканей с межклеточным водным переносом практически не анализируются и на это есть свои причины. Во-первых, растения обитают при сравнительно постоянной величине давления. Во-вторых, газовая компонента по своей объёмной доле мала и, по сути дела, представлена в наземных растениях в большей мере в виде воздуха, заполняющего межклетники, и сравнительно небольшой эндогенной компонентой в виде кислорода и углекислого газа. В-третьих, связь газовой компоненты с водным переносом довольно сложно изучать экспериментально, а её влияние при постоянстве давления внешней среды, по умолчанию, считается малым, не требующим учета. Другое дело, когда давление внешней среды изменяется в довольно значительных пределах. В этом случае, очевидными эффектами становятся добавочное растворение в воде газов, согласно закону Генри, и изменение температуры газовой фазы согласно принципу Ле-Шателье (Глинка, 1985) или закону Шарля (Фримантл, 1998). В связи с этим, представляется необходимым проанализировать возможные изменения

параметров водного переноса, при воздействии давления на ткани наземных растений, обладающие относительно значимой газовой компонентой (корни кукурузы), и на водные объекты, которые априори не имеют воздухоносных межклетников (суспензия клеток хлореллы и дуналиеллы).

# 3.2.1. Сравнительный анализ особенностей влияния внешнего давления до 4 МПа на магнитную релаксацию воды клеток корня кукурузы и суспензии клеток хлореллы

Как оказалось, воздействие внешним давлением на клетки корней кукурузы, приводит к укорочению времён спин-спиновой релаксации воды с восстановлением к начальному уровню после снятия давления (рис. 3.2.1). Более того, релаксационные затухания (РЗ) в образце, находящемся под постоянным давлением, проявляют динамику к ускорению релаксации с течением времени выдерживания под давлением (рис. 3.2.2).



Рис. 3.2.1. Зависимость времени спин-спиновой релаксации *T*<sub>2</sub> вакуолярного компонента воды от величины приложенного давления и после сброса давления до атмосферного.


Рис. 3.2.2. Релаксационные спады сигналов спинового эха от воды клеток корня кукурузы, измеренные в контроле, под давлением 2.5 МПа и при выдержке в течение 15, 45 и 120 минут под давлением.

Сброс давления во всех случаях приводит к быстрому восстановлению времен релаксации до уровня порядка 90% от начального (контрольного) (рис. 3.2.1). В отличие от корня кукурузы, в клетках хлореллы давление не приводит к заметному укорочению времен спин-спиновой релаксации воды (рис. 3.2.3). Подозрения на чувствительность к давлению сигнала от внеклеточной воды не оправдались, поскольку и после ускорения релаксации внеклеточной суспензионной среды парамагнитным допингом, чувствительность к давлению не проявилась (рис. 3.2.3).

На рис. 3.2.4 приведены релаксационные затухания для воды суспензии клеток хлореллы в норме и в условиях искусственно увеличенной аминазином проницаемости плазмалеммы, с последующим наложением внешнего давления.



Рис. 3.2.3. Зависимость времени спин-спиновой релаксации (T<sub>2</sub>) от величины внешнего давления для протонов вакуолярной воды: суспензия клеток хлореллы в контроле и после внедрения во внеклеточное пространство парамагнитного комплекса GdDTPA 0.025 M.

Релаксационные затухания при искусственном увеличении проницаемости клеток хлореллы аминазином, как и ожидалось, демонстрируют заметное увеличение крутизны РЗ, связанное с ростом скорости обмена водой между внеклеточным и внутриклеточным компартментами. При этом, в условиях поддержания постоянного давления, РЗ показывают тенденцию к ускорению релаксации (рис. 3.2.4).

Учитывая наличие заметной газовой составляющей в наземном объекте, прежде всего, в виде воздуха межклетников, и существенно меньший объем таковой в суспензии водных растительных клеток, наиболее вероятные причины различий в релаксационном поведении, по-видимому, следует искать в эффекте дополнительного растворения под давлением, согласно закону Генри, в водной среде тканей растений воздуха межклетников. Кислород воздуха, будучи парамагнитным, является сильным источником релаксации для воды. Факт дополнительного растворения объясняет и быстрое восстановление РЗ к норме после сброса давления.



Рис. 3.2.4. Релаксационные затухания для воды суспензии клеток хлореллы в норме и в условиях искусственно увеличенной аминазином проницаемости плазмалеммы с последующим наложением внешнего давления.

Для дополнительной проверки роли кислорода в укорочении времён спинспиновой релаксации, были проведены эксперименты, в которых давление на образец передавалось с помощью фторированного масла, не содержащего протонов, и потому, не дающего вклад в сигнал намагниченности. Эксперимент на образце, прошедшем вакуумную инфильтрацию во фторированном масле, продемонстрировал резкое снижение эффекта укорочения времен релаксации под давлением, что подтверждает связь эффекта с парамагнитным влиянием кислорода (рис.3.2.5).



Рис. 3.2.5. Зависимость времени спин-спиновой релаксации  $(T_2)$  от величины внешнего давления для протонов вакуолярной воды сегментов корней кукурузы из зоны всасывания, в контроле и после вакуумной инфильтрации во фторированном масле.

образом, растворение кислорода Таким BO внеклеточной воде под через трансмембранный обмен воды, может быть причиной давлением, наблюдаемого укорочения времён релаксаций вакуолярной воды. Сравнительно высокая скорость укорочения времени релаксации с момента подачи давления, порядка 100 мс/с, свидетельствует, что кислород, наряду с растворением во внеклеточной воде, проникает в клетку и растворяется в воде цитоплазмы и вакуоли. Вторая причина ускорения релаксации под давлением, связана с ростом проницаемости плазмалеммы, происходящем, скорее всего. также из-за кислорода в тканях. Не исключено, повышения уровня ЧТО, зачастую,

регистрируемая вариация времен релаксации воды в биологических объектах, связана с колебаниями атмосферного давления, изменения которого, как правило, не учитываются. Явление добавочного растворения кислорода под давлением (далее кислородный допинг), наводит на мысль о мало обсуждаемой, но возможно заметной роли эндогенного кислорода в укорочении времен релаксации воды. Увеличение в клетках под давлением концентрации растворенного кислорода, можно полагать, повышает суммарный уровень активных форм кислорода (АФК) в клетке (Гуськов и др., 2009). В свою очередь, это может вызвать увеличение уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ), что, как известно, сопровождается ростом водопроницаемости мембран. Рост концентрации кислорода может также провоцировать фрагментарное разрушение тонопласта под действием давления.

## 3.2.2. Особенности диффузионных затуханий намагниченности воды в клетках корней кукурузы (Zea mays L.) при действии давления

Согласно закону Ле-Шателье (Глинка, 1985) или более частному закону Шарля (Фримантл, 1998), увеличение давления при изохорических условиях вызывает рост температуры газовой фазы, и, наоборот, сброс давления вызывает снижение температуры. Эксперименты с корнем кукурузы под давлением выявили любопытный факт, связанный с релаксацией диффузионных затуханий к контрольному положению, после первоначального ускорения спада (рис. 3.2.6). Рост диффузионного переноса под давлением увеличивается, но если оставить образец при фиксированном значении давления, то с течением времени наблюдается возвращение диффузионных затуханий к положению характерному для контроля (рис. 3.2.6). Первое объяснение, которое напрашивается, это подъем температуры образца при сжатии экзо- и эндогенного газа (воздуха) в микропорах, с соответствующим ростом диффузионного переноса. Если принять этот вариант объяснения, тогда после подъема давления и при последующем выдерживании образца при фиксированном давлении, температура образца должна падать из-за установления термического равновесия с внешней средой. Соответственно, должна снижаться интенсивность диффузионного переноса и уменьшаться крутизна диффузионного спада намагниченности. Однако прямые измерения изменения температуры образца с помощью термопары, не дают значений, отвечающих соответствующим температурным изменениям диффузионного затухания. Более того, существует простая проверка на температурный эффект.



Рис. 3.2.6. Релаксация диффузионных затуханий (ДЗ) намагниченности образца с течением времени после подачи давления. R – относительная амплитуда сигнала спин-эхо (фактор R),  $g^2$  - амплитуда градиента магнитного поля,  $t_d = 700$  мс,  $\delta = 0.5$ . – контроль (при атмосферном давлении), \* - ДЗ непосредственно после включения давления в 3 МПа.  $\circ$  - через 10 мин,  $\Delta$  - через 30 мин, --- – ожидаемое ДЗ при предположении температурного эффекта релаксации ДЗ.

Суть в том, чтобы при фиксированном давлении дождаться достижения образцом равновесной начальной температуры, характерной для контрольного

измерения без давления и затем сбросить давление до атмосферного. Согласно закону Шарля (Фримантл, 1998), сброс давления должен вызвать охлаждение образца и соответственно уменьшение скорости диффузионного переноса. При этом уменьшение крутизны спада диффузионной зависимости должно быть приблизительно симметрично первоначальному ускорению при подъеме давления, учитывая монотонный закон изменения диффузии от температуры. Однако, в реальности для образцов корня этот эффект не наблюдается. На рис. 3.2.6 приведены результаты такого опыта. Ожидаемое поведение ДЗ обозначено пунктиром. Диффузионное затухание после сброса давления остается ниже уровня контроля, т.е. соответствует более высокому значению диффузионного переноса. Наличие и количество газовых полостей, надо полагать, будет зависеть от процедуры вакуумной инфильтрации образца. Используя разные способы инфильтрации, можно надеяться, что в некоторых пределах регулировать объем газовой фазы межклетников, и как результат можно ожидать изменение релаксационного поведения ДЗ под давлением.

На рис. 3.2.7 приведены графики зависимости изменения массы образца от способа инфильтрации в воде и в воздухе. В первом случае, образец корня погружен в воду и подвергнут вакуумной инфильтрации. Во втором случае, образец находился в воздушной среде, затем был подвергнут действию вакуума, после чего был затоплен водой. Относительные величины показывают, что в варианте инфильтрации в воздушной среде образец набрал больше воды в межклетники, чем при инфильтрации непосредственно в воде. Причина, повидимому, в том, что при инфильтрации в воде первые порции воды заходят в межклетники верхнего слоя клеток ткани и затрудняют выход воздуха из более глубоких слоев ткани.

Для того чтобы увеличить долю сигнала от внутриклеточной воды, была проведена инфильтрация образца во фтористом масле, не содержащем в своем составе атомов водорода и следовательно не дающем вклада в сигналы спин-эхо. На рис. 3.2.8 приведены ДЗ для образца, инфильтрированного во фтористом

79

масле. Однако эксперименты с образцами при различных способах инфильтрации, не привели к изменению в релаксационном поведении ДЗ (рис. 3.2.9). При всех вариантах инфильтрации, под давлением наблюдалось ускорение диффузионного затухания, но не замедление. После выдержки образца в течение 30 мин под давлением для гарантированного достижения термического равновесия с внешней сброса диффузионное средой И последующего давления затухание восстанавливалось к уровню контроля. Иными словами, поведение ДЗ при использованных, доступных способах вариации объема газовой компоненты, оставалось однотипным. Ни в одном случае не наблюдался выход ДЗ, после сброса давления, в положение выше уровня ДЗ в контроле.



Рис. 3.2.7. Зависимость относительной величины *R* от времени инфильтрации. Величина *R* равна отношению изменения массы образца, инфильтрированного в воде к изменению массы образца инфильтрированного в воздухе, выраженному в процентах.



Рис. 3.2.8. Диффузионные затухания намагниченности образца корней кукурузы прошедших вакуумную инфильтрацию во фтористом масле.  $t_d = 700$  мс,  $\delta = 0.4$  мс.  $\Box$  – контроль, \* – давление 3 МПа.



Рис. 3.2.9. Диффузионные затухания намагниченности образца для сегментов корня кукурузы, инфильтрированных в воде.  $b = -\gamma^2 \, \delta^2 \, g^2 \, t_d$ ,  $\delta = 0.5$  мс,  $t_d = 700$  мс,  $g^2$  – аргумент (амплитуда градиента магнитного поля).

На рис. 3.2.10 приведены диффузионные затухания при разных временах диффузии для образца хлореллы в норме и с парамагнитным допингом, в широком диапазоне вариаций амплитуды градиентных импульсов магнитного поля.



Рис. 3.2.10. Диффузионные затухания намагниченности молекул воды в клетках хлореллы, полученные при разных временах диффузии  $t_d$  в широком диапазоне вариаций амплитуды градиентных импульсов магнитного поля g. **1** -  $t_d$  = 5 мс ( $\delta$  = 900 мкс,  $g_{max}$  = 9.65 T/м); **2** -  $t_d$  = 100 мс ( $\delta$  = 201 мкс,  $g_{max}$  = 9.65 T/м); **3** -  $t_d$  = 200 мс( $\delta$  = 250 мкс,  $g_{max}$  = 9.65 T/м) (Cho *et al.*, 2003).

Поскольку анализ диффузионного поведения изначально методически обусловлен начальным участком ДЗ с максимальным уровнем отношения сигнал/шум, все дальнейшие зависимости выполнены только для диапазона малых значений градиента магнитного поля. В отличие от корня, для хлореллы средний эффективный коэффициент диффузии ( $D_{eff}$ ) под давлением практически

не изменяется, не выходит за рамки ошибки регистрации данных (рис. 3.2.11). Воздействие на клетки хлореллы жидким азотом привело к резкому увеличению  $D_{eff}$  за счет снятия режима ограниченной диффузии, из-за разрушения плазмалеммы (рис. 3.2.11). В клетках с разрушенной плазмалеммой, динамика ДЗ определяется остаточной барьерной функцией только клеточной стенки.



Рис. 3.2.11. Зависимость среднего эффективного коэффициента диффузии  $D_{eff}$  воды от давления P для клеток хлореллы в контроле и после воздействия жидким азотом.

Последующее воздействие давлением не добавило заметных изменений в средний эффективный коэффициент диффузии воды  $D_{eff}$  для клеток с разрушенной плазмалеммой. Этот эксперимент демонстрирует отсутствие «барьерной» реакции клеточной стенки клеток хлореллы на давление. Предполагая, что плазмалемма клеток хлореллы будет более чувствительна к давлению, после искусственного увеличения её проницаемости, клетки были обработаны раствором аминазина (10-M) 20 В течение МИН. Аминазин (хлорпромазин), нейролептик, антипсихотическое средство, вещество, увеличивающее проницаемость мембран для воды, благодаря влиянию на вязкость мембран (уменьшает вязкость).

Действие аминазина, как и ожидалось, привело к заметному увеличению  $D_{eff}$  по сравнению с контролем, за счет роста проницаемости мембран (рис. 3.2.12), но и на фоне аминазина наложение давления не привело к достоверному изменению  $D_{eff}$  (рис. 3.2.12).



Рис. 3.2.12. Зависимость среднего эффективного коэффициента диффузии  $D_{eff}$  воды от давления *P* для клеток хлореллы в контроле и после воздействия раствором аминазина  $10^{-4}$  M, 20 мин.

Для клеток *D. maritima*, которые изначально не имеют клеточной стенки, наблюдается качественно подобное клеткам хлореллы поведение диффузионного затухания под давлением (рис. 3.2.13).

В совокупности полученные данные, на контрастных по газовой фазе объектах, отличающихся к тому же наличием/отсутствием межклеточных каналов в виде плазмодесм, показывают, что чувствительность релаксационных и диффузионных затуханий намагниченности зависит от наличия газового компонента в исследуемых образцах.

Эффект влияния давления на поведение ДЗ, через механизм нагревания газа в микрополостях объектов, по-видимому, незначителен, вследствие малого количества газа. Однако, на релаксационное затухание намагниченности, наличие газовой компоненты оказывает заметное влияние, вероятно вследствие увеличения в воде под давлением концентрации растворенных газов воздуха (Мелвин-Хьюз, 1962).



Рис. 3.2.13. Диффузионные затухания намагниченности для суспензии клеток *D. maritima* в контроле и при пошаговом увеличении давления до 3 МПа с шагом в 1 МПа с последующим сбросом давления до атмосферного. Время наблюдения за диффузией  $t_d$  составляло 80 мс при длительности градиентных импульсов  $\delta$  в 1мс.

В целом, сравнительные диффузионные и релаксационные эксперименты на наземных и водных объектах демонстрируют ярко различающиеся результаты. В числе очевидных причин, надо полагать, различие объектов по объёмной доле газовой компоненты и отсутствию/наличию плазмодесм. Очевидно, что свойство

нечувствительности к внешнему давлению плазмалеммы хлореллы, нельзя распространять на плазмалемму клеток корня. Клетка хлореллы является самодостаточным, водным, растительным организмом и может обладать эволюционно выработанной, специфической устойчивостью к давлению (Анисимов и др., 2014).

#### 3.3. Влияние давления на трансмембранный путь переноса воды в корне растения

Как было отмечено выше, влияние давления приводит к локальным деструкциям тонопласта (рис. 3.3.1, б (стрелки)). При этом по данным диффузионного ЯМР и окраске Эвансом синим, барьерная функция плазмалеммы сохраняется и ни в одном случае не наблюдается разрушение плазмалеммы давлением, по крайней мере, до 4 МПа. По определению D<sub>eff.</sub> является интегральным показателем переноса воды по возможным путям водного Возникает вопрос, по какому комбинации – переноса. ПУТИ ИЛИ ИХ трансклеточному или симпластному происходит рост межклеточного переноса? Интенсивность трансклеточного переноса определяется, прежде всего, уровнем проницаемости плазмалеммы. Тогда возникает следующий вопрос: что можно ожидать относительно проницаемости плазмалеммы под давлением?

Как известно, для регистрации переноса воды трансмембранным путем через плазмалемму, эффективным является релаксационный подход с использованием для оценки проницаемости мембран, процедуры решения обратной задачи обмена (Балла, 1985).

На рис. 3.3.2 приведены типичные релаксационные затухания сигналов спинового эха от воды корня с парамагнитным допингом во внеклеточном пространстве, в контроле (при атмосферном давлении) и при подъеме давления до 3 МПа.



Рис. 3.3.1. Электронные микрофотографии смежных клеток всасывающей зоны сегментов проростков кукурузы, зафиксированные в контроле (*a*) и под давлением 4 МПа (б), стрелки указывают на альтерации в тонопласте.



Рис. 3.3.2. Релаксационные затухания поперечной протонной намагниченности от воды корня кукурузы в норме (контроль) и под давлением в 3 МПа, в отсутствии и присутствии парамагнитного допинга GdDTPA 0.025M во внеклеточном пространстве.

С ростом давления крутизна релаксационных затуханий увеличивается, т.е. релаксации укорачиваются, времена также очевиден двухкомпонентный релаксационный спад поперечной намагниченности, где быстро спадающая компонента (начальный участок релаксационного спада) относится к внеклеточной воде, медленно спадающая - к внутриклеточной воде. Аналогично укорачиваются времена спин-решеточной релаксации Т<sub>1</sub> при пошаговом увеличении давления до 3 МПа: для внутриклеточной воды - T<sub>1a</sub> и для внеклеточной воды - T<sub>1b</sub>. (таб. 3.3.1).

Таблица 3.3.1. Экспериментальные значения времён спин-решёточной релаксации воды в корнях кукурузы в контроле и при пошаговом увеличении давления

	Контроль	1 МПа	2 МПа	3 МПа
<i>T</i> <sub>1а</sub> , мс	$950 \pm 47.5$	$560 \pm 28$	$400 \pm 20$	$360 \pm 18$
<i>T</i> <sub>1b</sub> , мс	$95 \pm 4.8$	80 ± 4	$67 \pm 3.4$	65 ± 3

При сбросе давления времена релаксации тенденцию имеют К восстановлению почти до уровня контроля (рис. 3.2.1). Учитывая, что наземные растения обладают значительным газонасыщенным пространством в виде объяснением эффекта воздухоносных межклетников, укорочения времён релаксации под давлением и восстановления к контролю после снятия давления может быть влияние парамагнетизма кислорода воздуха. Как известно, согласно закону Генри (Мелвин-Хьюз, 1962), растворимость газов под давлением увеличивается. Растворение парамагнитного кислорода воздуха межклетников во внеклеточной воде под давлением («кислородный допинг»), может вызвать укорочение времен релаксации воды (рис. 3.3.2).

Сброс давления сопровождается сравнительно быстрым возвращением релаксационных затуханий к уровню близкому к контролю. Возможность ускорения релаксации со временем под давлением (рис. 3.2.2), учитывая кислородный допинг, может быть следствием нескольких причин: 1) конечная, сравнимая с временной шкалой проведения ЯМР экспериментов, скорость проникновения кислорода в клетки и клеточные органеллы; 2) увеличение скорости трансмембранного обмена за счет роста проницаемости мембран по механизму перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Гуськов и др., 2009); 3) влияние давления на проводимость аквапоринов по механизму, описанному в работе (Wan *et al.*, 2004).

В варианте с парамагнитным допингом резко выражено затухание от внеклеточной воды (рис. 3.3.2). Заметное различие в поведении релаксационных спадов от внеклеточной воды, где, казалось бы, эффект кислородного допинга должен проявиться в максимальной степени, наводит на мысль, что на ускорение релаксации воды под давлением, вызванное эффектом кислородного допинга, дополнительно накладывается эффект увеличения скорости трансмембранного обмена водой, между внеклеточным и внутриклеточым компартментами, за счет увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны. Для количественного определения изменений проницаемости по данным релаксационного эксперимента, необходимо решение обратной задачи обмена.

В ходе решения обратной задачи обмена (Балла, 1985), для клеток корня была получена зависимость водной проницаемости *р* мембранной системы клеток от давления (рис. 3.3.3). Кислород проникает через липидный матрикс мембраны, причем его растворимость в нем выше, чем в воде. Показано, что проницаемость мембраны эритроцита для кислорода резко возрастает при ее контакте со стенками микрокапилляра альвеолы и артериального сосуда, тогда как в остальных случаях проницаемость мембраны эритроцита мала (Фок и др., 1999). Таким образом, решение вопроса о высокой проницаемости мембран для кислорода должен рассматриваться для каждого конкретного случая отдельно. мембранной Полученные для системы клеток корня значения водной под давлением, проницаемости отчасти могут быть завышены, из-за использования в расчетах значений времен релаксации, укороченных влиянием кислородного допинга.



Рис. 3.3.3. Зависимость водной проницаемости *р* мембранной системы клеток корня кукурузы из зоны всасывания от величины внешнего давления *P*.

B таблице 3.3.2. приведены значения релаксационных параметров, вычисленных в ходе решения обратной задачи обмена. Наиболее вероятной причиной роста проницаемости плазмалеммы под давлением, является повышение в клетке уровня кислорода и, соответственно, его активных форм (Гуськов дp., 2009). Известно, что перекисное окисление И липидов сопровождается ростом проницаемости мембран. Вопросам влияния кислорода на обширная проницаемость мембран посвящена литература, В OCHOBHOM. касающаяся эритроцитов животных объектов (Фок и др., 1999). Увеличение проницаемости, вследствие роста ПОЛ, представляется убедительным, но тенденция к быстрому восстановлению параметров переноса после сброса давления не исключает механизм влияния давления на проводимость аквапоринов. Еще одной причиной роста проницаемости, может быть деструкция под давлением тонопласта (рис. 3.3.1, б). Однако, вклад тонопласта в суммарную проницаемость «сэндвича» плазмалемма + тонопласт, надо полагать, мал. Диффузионные затухания для образцов в норме под давлением и для образцов

под давлением, но разрушенных жидким азотом, показывают кардинальные изменения в барьерной функции плазмалеммы. Таким образом, подавляющий вклад в изменение проницаемости под давлением сендвича плазмалемма + тонопласт дает именно плазмалемма.

Таблица 3.3.2. Расчёт проницаемости *р* через релаксационные данные ЯМР для клеток корней кукурузы с парамагнитным допингом GdDTPA 0.025M в контроле и под давлением 3 МПа (Р – населённость фазы)

Параметры обмена	Контроль	3 МПа
<i>Т</i> ′ <sub>1<i>а</i></sub> , мс / Р, %	950 ± 48/ 77	360 ± 18/ 83
<i>Т</i> ′ <sub>1<i>b</i></sub> , мс / Р, %	639 ± 32/ 72	293.4 ± 15/ 70.7
<i>Т</i> ′ <sub>2а</sub> , мс / Р, %	95 ± 4.8/ 23	65 ± 3.3/ 17
<i>Т'</i> <sub>2b</sub> , мс / Р, %	$11.2 \pm 0.6/28$	7.7 ± 0.4/ 29.3
<i>Т<sub>1а</sub></i> , мс	$1415 \pm 71$	567 ± 28.3
<i>Т<sub>1b</sub></i> , мс	844 ± 42	$476.2 \pm 23.8$
<i>T</i> <sub>2a</sub> , мс	$105 \pm 5.2$	83 ± 4.15
<i>Т<sub>2b</sub></i> , мс	$11 \pm 0.6$	$7.9 \pm 0.4$
$\tau_a$ , MC	$2597 \pm 130$	$743.4 \pm 37.2$
<i>т</i> <sub><i>b</i></sub> , мс	$1041 \pm 52$	$330.3 \pm 16.5$
р, м/с	$(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(11.2 \pm 0.6) \times 10^{-6}$

## 3.4. Реакция на внешнее давление симпластной системы переноса воды в растениях

Воздействие внешним давлением на сегменты корней кукурузы приводит к увеличению среднего эффективного коэффициента диффузии и эффективной клеточной проницаемости *p* (рис. 3.4.1). Как известно, соотнесение компонент ДЗ к той или иной фракции молекул, особенно в биологических объектах, далеко не тривиальная задача, решаемая практически в каждом исследовании, исходя из конкретной задачи. Диффузионные затухания намагниченности имеют неэкспоненциальный характер, что характерно для клеток корня и в целом для растительных и животных тканей и являются суммой не менее чем двух компонент. В первом приближении, в диффузионном затухании для корня в норме можно выделить быструю и медленную компоненты (рис. 3.2.6, рис. 3.2.8). В принципе достаточен сам факт обнаружения изменений диффузионного затухания при приложении внешнего воздействия.

Как следует из рис. 3.4.2 диффузионный перенос воды в продольном направлении корня под давлением также испытывает рост, как и для диффузионного переноса в радиальном направлении. Поведение ДЗ под давлением осталось аналогичным предыдущим вариантам.



Рис. 3.4.1. Зависимость среднего эффективного коэффициента диффузии воды  $D_{eff}$  и эффективной клеточной проницаемости p от величины внешнего давления, для клеток корней кукурузы из зоны всасывания.



Рис. 3.4.2. Диффузионные затухания намагниченности для сегментов корня кукурузы при продольном направлении градиента магнитного поля.

Наконец, были проведены эксперименты с разной ориентацией сегментов по отношению к силе тяжести. Предпосылками к постановке такого эксперимента, стали результаты работы по исследованию полярного переноса воды при действии безградиентного давления (Зялалов, Анисимов, 1984).

На рис. 3.4.3 приведены диффузионные затухания для сегментов корня, ориентированных базальным концом, соответственно, вниз и вверх. Налицо заметные различия в деталях, но динамика ДЗ под давлением остается одинаковой для различных вариантов ориентации. Возникает вопрос, не связаны ли, наблюдаемые эффекты давления, с «манжетной» реакцией клеток стелы корня (Мелещенко, 2002)? Исследуемые образцы корня являются сегментами, т.е. имеют открытые концы ксилемной и флоэмной систем и при этом корни априори обладают полярными свойствами в передаче воды вверх к листовой зоне. В итоге, в общем случае, можно ожидать разную реакцию на давление участков корня вдоль аксиального направления. Диффузионные затухания для корней пшеницы, также свидетельствуют об увеличении интенсивности межклеточного водного переноса (рис. 3.4.4).



Рис. 3.4.3. Диффузионные затухания намагниченности для сегментов корня кукурузы в контроле и под давлением 2.5 МПа, *a* - базальный конец корня ориентирован вниз, *б* - базальный конец корня ориентирован вверх.



Рис. 3.4.4. Диффузионные затухания намагниченности для сегментов корней пшеницы в контроле и под давлением 2.5 МПа. Диффузию регистрировали в поперечном измерении корня.  $t_d = 400$  мс,  $\delta = 0.4$  мс.  $\Box -$ контроль,  $\circ -$  давление 2.5 МПа.

В работе (Зялалов, 1981), показан полярный перенос воды под влиянием безградиентного давления. Поскольку корень кукурузы допускает механическую разборку на кору (кортекс) и стель, были проведены опыты с давлением на «рукавчиках» из коры корня. Разумеется, что корень при такой разборке испытывает сильный стресс от повреждения, тем не менее, оказалось, что и на «рукавчиках» из клеток кортекса, зависимости ДЗ от давления аналогичны таковым для целого корня (рис. 3.4.5).



Рис. 3.4.5. Диффузионные затухания намагниченности для «рукавчиков» (сегментов корней кукурузы с удаленным центральным цилиндром) в контроле и под давлением 3 МПа. Диффузию регистрировали в поперечном измерении корня.  $t_d = 900$  мс,  $\delta = 0.35$  мс.  $\Box$  – контроль, \* – давление 3 МПа.

Таким образом, на примере корней кукурузы и пшеницы, экспериментально демонстрируется, что приложение внешнего давления приводит к заметному увеличению интенсивности межклеточного переноса воды в, причем процесс имеет обратимый характер. Как отмечалось выше,  $D_{eff}$  является интегральным

показателем диффузии воды по различным параллельным путям переноса и прежде всего по сипластному и трансклеточному. Особенности переноса воды по трансклеточному пути могут эффективно изучаться релаксационным методом ЯМР (параграф 3.3).

В диффузионном ЯМР эксперименте, применение той же технологии парамагнитного допинга позволяет исключить вклад сигнала от внеклеточной воды в суммарную намагниченность, за счёт ускорения ее релаксации на парамагнетике, позволяя, тем самым выделить симпластную составляющую переноса. На рис. 3.4.6 приведены диффузионные затухания для образца корня в норме (контроль) и с предварительно внедренным во внеклеточное пространство парамагнитным комплексом GdDTPA, не проникающим в клетки, из-за своих относительно больших размеров, но проникающим во внеклеточное пространство.



Рис. 3.4.6. Диффузионные затухания намагниченности для сегментов корней кукурузы из зоны всасывания, в контроле и после внедрения во внеклеточное пространство парамагнитного комплекса GdDTPA (0.025 M), ( $b = \gamma^2 \delta^2 g^2 t_d$ ).

Контакт парамагнетика с молекулами внеклеточной воды приводит к резкому, на порядок при данной концентрации GdDTPA, укорочению времен релаксации внеклеточной воды, так что в диффузионном затухании при выбранном времени наблюдения за диффузией (700 мс) вклад внеклеточной воды в регистрируемую намагниченность (сигнал стимулированного эха) должен быть пренебрежимо мал. Как следует из рис. 3.4.6, из начального диффузионного спада исчезла быстроспадающая компонента, а медленно спадающая, в значительной степени стала ближе к одноэкспоненциальной. Следовательно, быстроспадающая компонента, связана с внеклеточной водой, которая отчасти давала вклад и в медленно спадающую компоненту.

На рис. 3.4.7 приведена зависимость среднего эффективного коэффициента диффузии воды и водной проницаемости симпластной системы клеток корня кукурузы из зоны всасывания от величины внешнего давления *P*.



Рис. 3.4.7. Зависимость эффективного коэффициента диффузии воды  $D_{eff}$  и проницаемости p симпластной системы клеток корней кукурузы из зоны всасывания от величины внешнего давления P.

Воздействие давлением также приводит к увеличению  $D_{\text{eff}}$  воды, что говорит об увеличении водной проводимости по симпластной системе корня (рис. 3.4.7). Выше было показано, что не имеющие плазмодесм клетки хлореллы и дуналиеллы, проявляют резистентность к действию давления. Таким образом, можно заключить, что давление способно модулировать межклеточный перенос воды по симпласту корня через плазмодесмы.

# 3.5. Вероятная схема модуляции давлением проводимости плазмодесм, применительно к механизмам изменения тургорного давления

В работе (Анисимов, Егоров, 2002) механизм модуляции проводимости ПД, связывается с изменениями апертуры шейных сужений (ШС) плазмодесм. Движущей силой переноса является перепад осмотического давления  $\Delta \pi$  на концах ПД. Плазмодесма моделируется набором последовательно соединенных капиллярных щелей с заданным законом изменения их раскрытия. Поток воды *I*, определяется из известного Онзагеровского приближения:  $I = KS\Delta\pi/l$ , где l – длина ПД, К, S транспортные коэффициенты ПД в целом. Для стерического потенциала взаимодействия осмотика и воды со стенками ПД численные расчеты привели к экстремальной зависимости потока воды  $I_v(r_{min})$  через ПД в зависимости от раскрытия шейного сужения (рис. 3.5.1). Качественная картина развития потока такова: при  $r_{min} = 0$ , т.е. когда шейное сужение полностью пережато вокруг десмотубулы (*r<sub>min</sub>* - радиус десмотубулы) поток воды через шейное сужение равен нулю. С раскрытием ШС уменьшается гидродинамическое сопротивление ПД и поток воды растет с достижением максимума при раскрытии ШС до размера диаметра молекулы осмотика  $r_{min} = 2r_{mol}$ . До этого момента ПД была непроницаема для осмотика, и коэффициент отражения S был равен единице. При дальнейшем раскрытии ШС открывается путь потоку осмотика, который монотонно растет с раскрытием при соответствующем уменьшении коэффициента

отражения. Как следствие, после максимума в момент  $r_{min}=2r_{mol}$  поток воды с ростом  $r_{min}$  уменьшается, так как коэффициент отражения с раскрытием ШС уменьшается быстрее, чем растет проводимость всей ПД. При максимальном раскрытии шейного сужения ПД ( $r_{min} = r_{max}$ ) величина потока достигает значения  $I_v^0$ .



Рис. 3.5.1. Зависимость потока воды  $I_v$  через плазмодесму в зависимости от раскрытия шейного сужения от положения полного охвата десмотубулы,  $r_{min} = 0$  до полного открытия –  $r_{max}$ . Пунктирная линия соответствует ситуации изменения знака адсорбционного потенциала стенок плазмодесм (Анисимов, Егоров, 2002).

В работе (Oparka, Prior, 1992) показано триггерное необратимое закрытие ПД при искусственно созданной между соседними клетками, разности тургорного давления выше 200 КПа, что связывается с аварийной изоляцией клеток, с целью предотвращения потери воды через симпластную систему при повреждении органа.

В настоящей работе при объемном сжатии давлением корня наблюдается рост межклеточного переноса воды, причем обратимый. Надо полагать, что в норме проводимость ПД соответствует их полузакрытому состоянию. Иными

словами, в норме рабочая точка проводимости лежит на нисходящей ветви зависимости, приведённой на рис. 3.5.1, поскольку шаговое повышение давления дает монотонный рост эффективного коэффициента диффузии, коррелирующего с проводимостью симпластного пути переноса во всем использованном диапазоне давлений (рис. 3.4.7).

Таким образом, с учетом совокупности данных, плазмодесмы можно рассматривать как клапан в режиме обеспечения пропорционального к росту давления, обратимого режима проводимости и аварийного необратимого при значительных перепадах давления (Oparka, Prior, 1992). При этом, модуляция проводимости, вероятно, происходит через изменение апертуры ШС. Возникает вопрос: изменение апертуры шейного сужения вызывается непосредственно давлением, или этот процесс опосредован? В принципе, прямое влияние давления на проводимость плазмодесм не исключается. Например, в (Wan et al., 2004) применительно к объяснению факта влияния давления на проводимость аквапоринов, один из вариантов интерпретации данных основывается на прямом кинетическом влиянии давления на канал аквапорина. В работах (Zonia, Munnik, 2007; Zonia, Munnik, 2011), поддерживающих представления о циклическом изменении тургорного давления в процессе роста растяжением, проведено компьютерное моделирование условий возникновения и динамики развития процесса циклического изменения тургорного давления. Результаты моделирования привели к требованию участия в процессе специального сенсора, чувствительного к давлению. В попытке определится в этом вопросе, были проведены эксперименты по исследованию влияния давления на межклеточный водоперенос в образцах, подвергнутых осмотическому обезвоживанию (рис. 3.5.2). Предполагалось, что обезвоживание приведет к снижению тургорного давления и тогда увеличение внешнего давления, на фоне сниженного тургорного, может изменить динамику ускорения диффузионных затуханий, если давление влияет на плазмодесмы прямо без посредников. Изменения в характере диффузионного затухания при действии осмотика не выходят за пределы ошибки

в регистрации диффузионного затухания. На рис. 3.5.3 приведены диффузионные затухания для образца под давлением 3 МПа, предварительно подвергнутого осмотическому обезвоживанию.



Рис. 3.5.2. Диффузионные затухания намагниченности для образца корня кукурузы после часовой инкубации в растворах осмотика в указанной концентрации.

Диффузионные зависимости под давлением проявляют поведение аналогичное таковому в контрольных образцах. При повышении давления до 3 МПа, эффективный коэффициент диффузии увеличивается от  $(4.5 \pm 0.4) \times 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с до  $(6 \pm 0.7) \times 10^{-10}$  м<sup>2</sup>/с (рис. 3.5.3).

Очевидно, трудно ожидать контрастных результатов, поскольку технически невозможно быстро осуществить процесс регистрации диффузионных затуханий при достаточно высокой скорости установления нового равновесного состояния в процессе переноса воды после действия осмотика. Но, учитывая вышеупомянутые результаты моделирования и настоящий результат эксперимента с осмотиком, повидимому, следует признать правомочность гипотезы об опосредованном влиянии давления на проводимость плазмодесм.



Рис. 3.5.3. Диффузионные затухания намагниченности образца корня кукурузы под давлением 3 МПа, на фоне действия ПЭГ (осмотическое давление - 0.4 МПа, 1 час).

На этом пути, изменение апертуры плазмодесм может быть объяснено работой контрактильных белков, которыми наделяются области шейных сужений (Roberts, Oparka, 2003). К настоящему времени наличие контрактильных белков в растительных клетках и их функционирование экспериментально показано в ряде работ (Overall, Blackman, 1996; Blackman, Overal, 1999). Дальнейшая цепь событий может быть связана С известной связью функционирования сократительных структур с уровнем кальция (Martindale, Salisbury, 1990). В работе (Holdaway-Clarke et al., 2000) авторы указывают на связь проводимости плазмодесм с уровнем кальция. В свою очередь, имеющиеся данные о чувствительности концентрации кальция к величине давления (Wu et al., 2012) могут быть объяснением модуляции проводимости плазмодесм.

Предложенная литературного обзора, схема реализации В итогах колебательного режима тургорного давления, с получением оригинальных экспериментальных данных о модуляции фактором давления водного переноса, получает аргументированные подкрепления. Полученные экспериментальные данные о модуляции переноса воды по симпластной системе внешним давлением, позволяют представить механизм колебаний тургорного давления в тканях, содержащих развитую сеть плазмодесм. Активная фаза роста тургорного давления, связана с общепринятым осмотическим механизмом увеличения оводнённости клетки. Клетка набухает, при этом возникают значительные расталкивающие усилия, растягивающие клеточную стенку. Фаза уменьшения объема – пассивная фаза обусловлена сбросом тургорного давления и обеспечивается эластическими, стягивающими свойствами растянутой клеточной стенки. Переход от активной к пассивной фазе обеспечивается изменением проводимости плазмодесм. Иными словами, при некотором значении тургорного давления происходит увеличение проводимости плазмодесм, давление в клетке уменьшается. После уменьшения тургорного давления клетки, проводимость плазмодесм восстанавливается до нормы, затем вновь происходит рост осмотического входа воды в клетку и т.д. В свою очередь, факт роста проницаемости плазмалеммы, при подъеме давления, увеличивает крутизну подъема тургорного давления.

Острый, экстремальный характер развития потока воды (рис. 3.5.1) является пороговым, нелинейным элементом цепи обратной связи поддержания пульсаций, когда требуется сброс воды из клетки. Представленная на рис. 3.5.1 острая зависимость потока воды от размера раскрытия шейного сужения, своей ниспадающей правой частью обязана росту переноса осмотика в соседнюю клетку, противоположном Если В направлении току воды. осмотик распространяется от клетки к клетке в форме бегущей волны, то можно ожидать последовательный, со сдвигом по фазе, рост тургорного давления в соседних клетках, с соответствующей реализацией ранее описанного, острого сброса воды

в следующую соседнюю клетку. В попытке аналитического представления пульсирующего режима срабатывания клапанного механизма ПД, рассмотрим эволюцию давления в области шейного сужения. Очевидно, сложно описать работу контрактильных систем непосредственно, но благоразумно предположить, что контрактильные белки (КБ) обеспечивают одну фазу срабатывания – ШC, увеличения проводимости тогда как вторая фаза уменьшение проводимости ШС происходит за счет упругого сокращения КС, растянутой на первой фазе. В этом случае, работа по изменению апертуры ШС в первой фазе, может быть отождествлена с работой упругого закрытия ШС во время второй фазы. Иными словами, давление, обусловленное работой сократительного аппарата, можно попытаться выразить через параметры КС. На рис. 3.5.4 приведена упрощенная схема ШС, где зона ШС представлена в виде щели с высоким отношением длины L к средней ширине щели R.



Рис. 3.5.4. Упрощённая схема шейного сужения плазмодесмы.

Течение воды происходит вдоль продольной оси ШС с непроницаемыми стенками по координате Z. Текущее изменение раскрытия апертуры ШС – r. В зоне канала ШС локализованы контрактильные белки. Для связи параметров КС и давления, вызванного КБ, может быть использовано финальное дифференциальное выражение, приведенное в работе (Сапожникова, 2000), применительно к идее о работе сократительных систем внутри клетки:

$$\frac{Eh}{R^2}\frac{\partial^2 x}{\partial z^2} + \frac{\eta h}{R^2}\frac{\partial^3 x}{\partial^2 z \partial t} + \frac{\partial^2 P_a}{\partial z^2} = -\frac{16\mu}{R^3} \left(\frac{\partial x}{\partial t} + v\frac{\partial x}{\partial z}\right)$$
(3.1)

где *z* - толщина стенки, E - модуль упругости, η - коэффициент вязкости для окружных деформаций, х – малые отклонения ширины щели от ее значения R, P<sub>a</sub> - окружное напряжение, обязанное работе сократительного аппарата, μ - вязкость текущей жидкости (воды). С учетом вышеприведенных соображений, в качестве функции модуляции потока изменением апертуры ШС, используем соотношение для бегущей волны:

$$x = x_0 \sin\left(\omega t - \frac{z}{L} + \varphi_0\right) \tag{3.2}$$

Поставив производные от (3.2) в (3.1) и отождествив производные  $\frac{\partial R}{\partial z} = \frac{\partial x}{\partial z}$ ,

$$\frac{\partial R}{\partial t} = \frac{\partial x}{\partial t}$$
 получаем:

$$\frac{\partial^2 P_a}{\partial z^2} = \frac{16\mu}{R^3} x_0 \omega \cos \alpha + \frac{Eh}{R^2 L^2} x_0 \sin \alpha + \frac{\eta h}{R^2} \frac{x_0 \omega}{L^2} \cos \alpha \qquad (3.3)$$

где  $\omega t - \frac{z}{L} + \varphi_0 = \alpha.$ 

Двойное интегрирование (3.3) дает:

$$P_0(z,t) = \frac{16\mu}{R^3} x_0 \omega L^2 \cos \alpha - \frac{Ehx_0}{R^2} \sin \alpha - \frac{\eta h}{R^2} x \ \omega \cos \alpha \tag{3.4}$$

Выражение (3.4) может быть отправным пунктом к описанию работы сократительных систем через параметры клеточной стенки.

На рис. 3.5.5 изображена схема модуляции потока воды изменением раскрытия шейного сужения плазмодесмы.



Рис. 3.5.5. Модуляция потока воды  $I_v$  изменением раскрытия шейного сужения плазмодесмы от  $r_{\min}$  до  $r_{\max}$ .

Очевидно, эти результаты только первое приближение к решению задачи, в зависимости от принятой одно- или двухканальной модели ПД. Дело в том, что детализация модели расчета связана с вопросом о локализации контрактильных белков в шейных сужениях. Вопрос также остаётся открытым, в связи с продолжающимся сосуществованием одно- и двухканальной модели плазмодесм, соответственно модель Робардса (Robards, 1976) и модель Лопес-Заэса (Lopez-Saez et al., 1966), с небольшим перевесом в пользу последней (Гамалей, 2004). Тем не менее, предложенная выше схема расчета, представляет интерес как идея количественного описания функционирования КБ через упругие свойства конкретизацией клеточной стенки, параметров, которые необходимо С установить.

Вышеприведенная схема пульсаций тургорного давления, позволяет снять противоречия между сторонниками осмотической и неосмотической гипотезы корневого давления. В новом представлении, движущие силы автоколебательного режима корневого давления обусловлены феноменом тургорного давления, обеспечиваемым осмотическими механизмами, а контрактильные белки нашли свое место в клапанном механизме плазмодесм. Привлекательным качеством схемы является ее относительная автономность, так как основные условия обеспечения пульсаций сосредоточены в рамках клетки, и без особых модификаций, схема применима к любым клеткам растения, связанным плазмодесмами.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фактор давления оказывает влияние практически на все процессы метаболизма клеток как растительного, так и животного происхождения. В данной работе, на примере клеток корней кукурузы, показано, что давление вызывает нелетальные деструкции тонопласта, приводит к альтерациям в эндомембранной системе клеток, которые сопровождаются изменением (уменьшением) параметров дыхания, тепловыделения и роста. Оказалось, что внешнее давление, обратимо влияет на интенсивность межклеточного переноса воды как трансмембранным путем, с пересечением цитоплазматической мембраны, так и по симпласту через плазмодесмы, вероятно, путём модуляции их проводимости. В литературе механизм модуляции проводимости ПД, связывается с изменениями апертуры шейных сужений (ШС) ПД (Анисимов, Егоров, 2002). Есть данные о триггерном необратимом закрытии ПД при искусственно созданном между клетками перепаде давления выше 200 КПа, что скорее связано с «аварийной» изоляцией клеток, с целью предотвращения потери воды через симпластную систему при повреждении органа (Oparka, Prior, 1992). Опираясь на литературные данные, цепь событий с включением звена давления может быть следующей: изменение апертуры плазмодесм обязано работе контрактильных белков (КБ), локализованных в области ШС (Roberts, Oparka, 2003). В свою очередь, известна связь функционирования сократительных структур с уровнем кальция (Martindale, Salisbury, 1990). В работе (Holdaway-Clarke et al., 2000), показана связь проводимости ПД с уровнем кальция. Наконец, имеющиеся данные о чувствительности концентрации кальция к величине давления (Wu et. al., 2012), замыкают цепь механизмов модуляции проводимости плазмодесм уровнем давления. Полученные в данной работе экспериментальные факты, в совокупности с литературными данными, напрашиваются на применение в объяснении механизма пульсаций тургорного давления В тканях корня, содержащих развитую сеть плазмодесм. Активная фаза роста тургорного
давления (набухания) клетки связана с осмотическим механизмом увеличения оводненности. Фаза уменьшения объема – пассивная фаза - обусловлена уменьшением тургорного давления и обеспечивается эластическими свойствами растянутой клеточной стенки. Переход от активной к пассивной фазе создаётся изменением проводимости плазмодесм. После уменьшения тургорного давления проводимость плазмодесм восстанавливается до нормы, затем вновь происходит фаза роста осмотического входа воды в клетку и т.д. Предлагаемый механизм пульсаций может быть рабочей гипотезой к феномену колебательного режима корневого давления.

## выводы

1. Разработан стенд для воздействия давлением в диапазоне до 5 МПа на биологические объекты непосредственно во время ЯМР эксперимента, с регулируемой скоростью изменения давления, с возможностью разрушения клеток, а также их фиксации для электронной микроскопии непосредственно под давлением.

2. Впервые, на примере корней кукурузы, установлено, что под давлением до 4 МПа в цитоплазме клеток происходит образование кластерных агрегатов из составляющих элементов эндомембранной системы, наблюдаются локальные деструкции тонопласта. Для плазмалеммы характерно сохранение ее целостности и барьерных функций.

**3.** Выявлено замедление роста растений кукурузы под влиянием давления (4 МПа × 5 часов) с полным восстановлением скорости роста через сутки после снятия давления. Ингибирование роста связано с альтерациями органелл эндомембранной системы клеток и торможением метаболических процессов.

**4.** Показано укорочение времен спин-спиновой и спин-решёточной релаксации воды в клетках корней под давлением, что связано с парамагнетизмом кислорода воздуха межклетников, дополнительно растворяющегося под давлением в водной среде растительного объекта (эффект кислородного допинга).

5. Впервые на корнях кукурузы и пшеницы установлен обратимый рост под статическим давлением межклеточного переноса воды по трансклеточному и симпластному пути.

6. Обнаружено, что давление до 4 МПа не изменяет параметры трансмембранного переноса воды в суспензиях клеток *Chlorella vulgaris* и *Dunaliella maritima*, в отличие от корней кукурузы (*Zea mays L.*) и пшеницы

(*Triticum aestivum*). В числе причин, различие объектов по объёмной доле газовой компоненты.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Абдрахимов, Ф. А. Влияние гидростатического давления на структурную организацию клеток корней кукурузы / Ф. А. Абдрахимов, М. А. Суслов, А. В. Анисимов // Цитология. — 2013. — Т. 55, 6. — С. 414-420.

Абуталыбов, В. Ф. Выделение актиномиозиноподобного белка из корней подсолнечника / В. Ф. Абуталыбов, В. И. Шушанашвили, В. Н. Жолкевич // Докл АН СССР. — 1980. — Т. 252, 4. — С. 1023-1024.

3. Алябьев, А. Ю. Энергетический баланс растительной клетки при действии высоких температур и засоления: диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук: 03.00.12 / Алябьев Александр Юрьевич. — Казань, 1996. — 132 с.

4. Анисимов, А. В. Биофизические аспекты межклеточного транспорта воды в растении: автореф. дис. д-ра физ-мат наук / Анисимов Александр Васильевич. — Москва, 1987. — 48 с.

5. Анисимов, А. В. Импульсный ЯМР метод для оценки межклеточного транспорта воды по симпласту / А.В. Анисимов, А. С. Еварестов, И. Ф. Самуилова, Н.А. Гусев // Доклады Академии наук СССР. — 1983. — Т. 271. — С. 1246-1249.

Анисимов, А. В. Оснастка к исследованиям массопереноса под влиянием статического и динамического давления непосредственно в датчике градиентного ЯМР / А.В. Анисимов, М.А. Суслов, В.А. Зуйков // Датчики и системы. — 2012. — Т. 7. — С. 64-67.

 Анисимов, А. В. Плазмодесмы как модулятор осмотических потоков воды в растениях / А. В. Анисимов, А. Г. Егоров // Физиология растений. — 2002. — Т. 49, 5. — С. 758-766. 8. Анисимов, А. В. Транспорт воды в растениях. Исследование импульсным методом ЯМР / А. В. Анисимов, С. Раткович. — М.:Наука, 1992. — 144 с.

 Анисимов, А.В. Транспорт воды по симпласту корня зависит от давления / А.В. Анисимов, М.А. Суслов, А.Ю. Алябьев // Физиология растений. — 2014. — Т. 61,4. — С. 546-554.

10. Балла, Ю. И. Исследование состояния воды и процесса её кристаллизации в тканях растений методом ЯМР / Ю. И. Балла.— Тбилиси, 1985. — 127 с.

 Бос, Д. Ч. Автографы растений и их содержание / Д. Ч. Бос. — М.: Наука, 1964. — 340 с.

 Вайнар, Р. Движения у растений / Р. Вайнар.— Москва : Знание, 1987. — 176 с.

13. Гамалей, Ю. В. Надклеточная организация растений / Ю. В. Гамалей // Физиология растений. — 1997. — Т. 44, № 6. — С. 819-846.

14. Гамалей, Ю. П. Транспортная система сосудистых растений / Ю. П.
Гамалей. — Санкт-Петербург : Издательство С.-Петербургского университета, 2004. — 424 с.

15. Глинка, Н. Л. Общая химия / Н. Л. Глинка. — 24-е изд. -Л:. Химия, 1985. — 702 с.

Гоникберг, М. Г. Химическое равновесие и скорость реакций при высоких давлениях / М. Г. Гоникберг. — Москва: Издательство Академии Наук СССР, 1969. — 274 с.

Гуськов, Е.П. Генетика окислительного стресса: монография / Е.П. Гуськов,
 Т.П. Шкурат, Т.В. Вардуни, Е.В. Машкина, И.О. Покудина, Е.И. Шиманская, Г.Е.
 Гуськов, Н.И. Беличенко, А.А. Александрова. — Ростов-на-Дону: Издательство
 СКНЦ ВЩ ЮФУ, 2009. — 156 с.

 Жолкевич, В. Н. О природе корневого давления / В. Н. Жолкевич // Физиология растений. — 1979. — Т. 26, № 5. — С. 978-993.

19. Жолкевич, В. Н. Транспорт воды в растении и его эндогенная регуляция / В.
Н. Жолкевич. — М.: Наука, 2001. — 73 с.

20. Жолкевич, В. Н. Энергозависимые контрактильные и сенсорные системы как регуляторы транспорта воды в растении / В. Н. Жолкевич // Материалы IV съезда общества физиологов растений России. — 1999. — Т. 1. — С. 155.

21. Жуковская, Н. В. Влияние нейротрансмиттера адреналина на водонагнетающуюдеятельность корня : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.00.12 / Жуковская Наталья Валерьевна.— Москва, 2009. — 24 с.

Зальцман, Г. Л. Основы гипербарической физиологии / Г. Л. Зальцман, Г. А. Кучук, А. Г. Гургенидзе. — Л.: ВМедА, 1979. — 318 с.

23. Зялалов, А. А. Полярность водопроводимости эпидермиса / А. А. Зялалов // Физиология растений. — 1981. — Т. 28, 5. — С. 982-983.

24. Зялалов, А. А. Физиолого-термодинамический аспект транспорта воды по растению / А. А. Зялалов. — Москва: Наука, 1984. — 136 с.

25. Зялалов, А. А. Эффект полярного транспорта воды в растении при действии безградиентного давления / А. А. Зялалов А. В. Анисимов // Докл. АН СССР. — 1984. — Т. 274. — С. 1013-1016.

26. Кларк, М. Схема с одной последовательной резонансной катушкой для экспериментов по импульсному ядерному магнитному резонансу / М. Кларк // ПНИ. — 1973. — Т. 7. — С. 62-70.

27. Королев, А. В., Жолкевич, В. Н. Влияние метаболических регуляторов на нагнетающую деятельность корня / А. В. Королев, В. Н. Жолкевич // II Доклады АН СССР. — 1990. — Т. 310, 2. — С. 507-511.

28. Косарев, А. В. Биодинамика, механизм и условия производства кооперативных потоков энергии в биологических структурах / А. В. Косарев // Вестник Оренбургского гос. у-та. — 2004. — Т. 6. — С. 93-99.

29. Косарев, А. В. Механизм подъёма питательных растворов против сил гравитации по проводящему пучку ксилемы и в почве [Электронный ресурс]. — 2010. — Режим доступа: http://new-idea.kulichki.net/pubfiles/101122133024.doc

30. Курсанов, А. Л. Транспорт ассимилятов в растении / А. Л. Курсанов. — Москва : Наука, 1976. — 647 с.

31. Леше, А. Ядерная индукция / А. Леше. — М., Изд. Иностр. лит., 1963. — 684
с.

Линг, Г. Физическая теория живой клетки. Незамеченная революция / Г.
 Линг. — Санкт-Петербург : Наука, 2008. — 376 с.

Лоренц, Г. А. Лекции по термодинамике / Г.А. Лоренц. — Ижевск : НИЦ
 "Регулярная и хаотическая динамика", 2001. — 176 с.

34. Мазей, Н. Г. Последействие импульсного давления на морфофизиологические особенности и продуктивность растений гречихи: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.12 / Мазей Наталья Григорьевна. — Нижний Новгород, 2002.

 Максимов, Н. А. Краткий курс физиологии растений / Н. А. Максимов. М: Сельхозгиз, 1958. — 559 с.

Мелвин-Хьюз, Э. А. Физическая химия / Э. А. Мелвин-Хьюз. — Москва:
 Издательство иностранной литературы, 1962. — 519 с.

37. Мелещенко, С. Н. О распространённых физических ошибках при описании водных потоков в системе почва - растение – атмосфера / С. Н. Мелещенко // Физиология растений. — 2001. — Т. 48, 2. — С. 298-305.

38. Мелещенко, С. Н. Система водного транспорта высшего растения и её элементы. Взаимосвязь корневого давления и транспирации в интактном растении / С. Н. Мелещенко // Физиология растений. — 2002. — Т. 49, 6. — С. 931-935.

Мищенко, К. П. Краткий справочник физико-химических величин / К. П.
 Мищенко, А. А. Равдель. — Л.: Химия, 1974. — 95 с.

40. Можаева, Л. В. Влияние температурных воздействий на скорость плача и некоторые стороны энергетического обмена корней подсолнечника / Л. В. Можаева, Н. В. Пилыцикова // Изв. ТСХА. — 1969. — № 4. — С. 14-30.

41. Можаева, Л. В. Выделение сократительного белка из корней тыквы / Л. В. Можаева, Е. М. Булычева // Докл. ТСХА. — 1970. — 160. — С. 148-151.

42. Нефедьева, Е. Э. Последействие импульсного давления на содержание фитогормонов и некоторые физиологические особенности растений гречихи / Е.
Э. Нефедьева, В. Н. Хрянин // Физиология растений. — 1999. — Т. 46, 2. — С. 231-238.

43. Нефедьева, Е. Э. Физиолого-биохимические процессы и морфогенез у растений после действия импульсного давления на семена: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук: 03.01.05 / Нефедьева Елена Эдуардовна. — Москва, 2010.

44. Полевой, В. В. Физиология растений / В. В. Полевой. — Изд. Высшая школа, 1989. — 464 с.

45. Самуилов, Ф. Д. Водный обмен и состояние воды в растениях / Φ. Д. Самуилов. — Казань : Изд. Казан. ун-та, 1972. — 31-44 с.

46. Сапожникова, В. В. Механизм влагопереноса древесного растения и возможные пути его регуляции биоактивными веществами: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.16 / Сапожникова Вероника Витальевна. — Москва : М.:МГУ леса, 2000. — 24 с.

47. Семихатова, О. И. Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений / О. И. Семихатова, М. В. Чулановская. — М-Л.: Наука, 1965.

48. Сибгатуллин, Т. А. Гидродинамические параметры растительных тканей: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук : 03.00.02 / Сибгатуллин Тимур Анварович. — Казань, 2010.

49. Слейчер, Р. Водный режим растений / Р. Слейчер. — Москва : Мир, 1970. —
365 с.

50. Уэбстер, М. Усовершенствованный прибор для измерения коэффициентов самодиффузии методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля / М.Уэбстер // ПНИ. — 1974. — Т. 10. — С. 37-40.

51. Фок, М. В. Авторегуляция неспецифической проницаемости мембраны эритроцита / М. В. Фок, А. Р. Зарицкий, Г. А. Зарицкая, Е. В. Переведенцева. — Москва: Наука, 1999. — 73 с.

52. Фримантл, М. Химия в действии, ч. 1 / М. Фримантл. — М.: Мир, 1998. — 528 с.

53. Холодова, В. П. Гидравлический сигнал как «первичный мессенджер водного дефицита» при солевом стрессе у растений / В.П. Холодова, А.Б. Мещеряков, В.Ю. Ракитин, В.В. Карягин, В.В. Кузнецов // Доклады Академии наук. — 2006. — Т. 407, 2. — С. 282-285.

54. Циклис, Д. С. Техника физико-химических исследований при высоких и сверхвысоких давлениях / Д.С. Циклис. — Изд. 4-е, пер. и доп. М.: «Химия», 1976. — 432 с.

55. Чугунова, Т. В. Роль паренхимных клеток в нагнетающей деятельности корневой системы.: автореферат дис. канд. биол. наук / Чугунова Татьяна Васильевна. — Москва, 1989. — 17 с.

56. Шиленков, А. В. Действие импульсного давления и низких температур на физиологические и биохимические процессы и урожай растений гречихи: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.12 / Шиленков Александр Владимирович. — Нижний Новгород, 2006. — 24 с.

57. Якушкина, Н. И. Физиология растений / Н. И. Якушкина. — М.: Просвещение, 1980. — 303 с.

58. Якушкина, Н. И., Бахтенко, Е. Ю. Физиология растений / Н. И. Якушкина,
Е. Ю. Бахтенко. — Изд. Владос, 2005. — 463 с.

59. Abe, F. Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in Saccharomyces cerevisiae / F. Abe, K. Horikoshi // FEMS microbiology letters. — 1995. — Vol. 130, 2-3. — P. 307-312.

60. Acevedo, A. D. Morphological and proliferative responses of endothelial cells tohydrostatic pressure: role of fibroblast growth factor / A. D. Acevedo, S. S. Bowser, M. E. Gerritsen, R. Bizios. // Journal of cellular physiology. — 1993. — Vol. 157. — P. 603-614.

61. Ache, P. Stomatal action directly feeds back on leaf turgor:new insights into the regulation of the plant water status from non-invasive pressure probe measurements / P. Ache // The plant journal. — 2010. — Vol. 62. — P. 1072-1082.

62. Albright, L. J. The influence of hydrostatic pressure upon biochemical activities of heterotrophic bacteria / L. J. Albright // Canadian journal of microbiology. — 1975. — Vol. 21, 9. — P. 1406-1412.

63. Anderson, W. A. Electrical current shims for correcting magnetic fields / W. A. Anderson // Rev. sci. instrum.. — 1961. — Vol. 32. — P. 241-250.

64. Anisimov, A. V. Spin-echo NMR study of the translational water diffusion selectively along the apoplast and the cytoplasmic and vacuolar symplasts of plants / A. V. Anisimov // Biophysics. — 2004. — T. 49. — C. 816-821.

65. Apodaca, G. Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli / G. Apodaca // Am. j. physiol. renal. physiol. — 2002. — Vol. 282. — P. 179-190.

66. Arkhipov, V. P. Self-diffusion of water molecules in solutions of electrolites at pressure ap to 2500 kg/cm<sup>2</sup> / V. P. Arkhipov, M. I. Emel'yanov, F. M. Samigullin, N. K. Gaisin // J. struct. chem.. — 1978. — Vol. 19, 5. — P. 709-712.

67. Baker, C. J. An improved method for monitoring cell death in cell suspension ad leaf disc assays usng evans blue / C. J. Baker, N. M. Mock // Plant cell tissue and organ culture. — 1994. — Vol. 39. — P. 7-12.

68. Balny, C. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes / C. Balny, P. Masson, K. Heremans // Biochim. biophys acta. — 2002. — Vol. 1595. — P. 3-10.

69. Bari, M. L. Effect of hydrostatic pressure pulsing on the Inactivation of Salmonella enteritidis in liquid Whole Egg / M. L. Bari, D.O. Ukuku, M. Mori; S. Kawamoto, K. Yamamoto // Foodborne pathogens and disease. — 2008. — Vol. 5, 2. — P. 175-182.

70. Bartels, D. Drought and salt tolerance in plants / D. Bartels, R. Sunkar // Critical reviews in plant sciences. — 2005. — Vol. 24. — P. 23-58.

71. Bartlett, D. H., Introduction to high-pressure bioscience and biotechnology / D.
H. Bartlett // Ann. N. Y. Acad Sci. — 2010. — Vol. 1189. — P. 1-5.

72. Behan, M. K., MacDonald, A. G., Jones, G. R., Cossins, A. R. Homeoviscous adaptation under pressure: the pressure dependence of membrane order in brain myelin membranes of deep-sea fish / M. K. Behan, A. G. MacDonald, G. R. Jones, A. R. Cossins // Biochim. biophys. acta. — 1992. — Vol. 1103. — P. 317–323.

73. Benedek, G.B. Nuclear magnetic resonance in liquids under high pressure / G.B.
Benedek, E. M. Purcell // J. chem. phys.. — 1954. — Vol. 22. — P. 2003-2012.

74. Bett, K. E., Cappi J. B. Effect of pressure on the viscosity of water / K. E. Bett, J.
B.Cappi // Nature. — 1965. — Vol. 207. — P. 620-621.

75. Blackman, L. M. Immunolocalisation of the cytoskeleton to plasmodesmata of Chara corallina / L. M. Blackman, R. L. Overall // Plant journal. — 1998. — Vol. 14. — P. 733-741.

76. Blackman, L. M. Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata / L.M. Blackman, J. D. Harper, R. L. Overall // European journal of cell biology. — 1999. — T. 78. — C. 297-304.

77. Blackman, L. M. Structure and function of plasmodesmata / L. M. Blackman, R.
L. Overall // Australian journal of plant physiology. — 2001. — Vol. 28. — P. 709-727.

78. Blackman, V. N. Osmotic pressure, root pressure and exudation / V. N. Blackman
// New phytol.. — 1921. — Vol. 20. — P. 270-282.

79. Borghetti, M. Ecotypic variation of xylem embolism, phenological traits, growth parameters and allozyme characteristics in Fagus / M. Borghetti, S. Leonardi, A. Raschi, D. Snyderman, R. Tognetti // Funct. Ecol.. — 1993. — Vol. 7. — P. 713-720.

Boyer, J. S. Water transport / J. S. Boyer // Ann. rev. plant physiol.. — 1985. —
 Vol. 36. — P. 473-516.

 Bridgman, P. W. The physics of high pressure / P. W. Bridgman. — London, 1958. — 347 p.

Butz, P. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products / P. Butz, A. Fernández-García, R. Lindauer, S. Dieterich, A. Bognár, B. Tauscher // Journal of food engineering. — 2003. — Vol. 56. — P. 233-236.

83. Carr, D. J. Historical perspectives on plasmodesmata / D. J. Carr // In intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata. — 1976. — P. 291-295.

84. Cho, C.-H. Water self-diffusion in Chlorella sp. studied by pulse field gradient
NMR / C.-H. Cho, Y.-S. Hong, K. Kang, V. I. Volkov, V. Skirda, C.-Y. J. Lee, C.-H.
Lee // Magnetic resonance imaging. — 2003. — Vol. 21. — P. 1009-1017.

85. Cleland, R. E. Plasmodesmal mediated cell-to-cell transport in wheat roots is modulated by anaerobic stress / R. E. Cleland, T. Fujiwara, W. J. Lucas // Protoplasma. — 1994. — Vol. 178. — P. 81-85.

86. Conlon T. Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR technique
/ T. Conlon // Biochim. biophys. acta. — 1972. — Vol. 288. — P. 354-361.

87. Cosgrove, D. J. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake and hydraulic conductance / D.J. Cosgrove // Intern. j. plant sci.. — 1993. — Vol. 154. — P. 10-21.

88. Crick, F. Diffusion in embryogenesis / F. Crick, // Nature. — 1970. — Vol. 225.
— P. 420-422.

89. DeFries, T. Pressure dependence of NMR proton spin–lattice relaxation times and shear viscosity in liquid water in the temperature range -15-10 °C / T. DeFries, J. Jonas // J. chem. phys.. — 1977. — Vol. 66, No 3. — P. 896.

90. Deliza, R. Application of high pressure technology in the fruit juice processing:
Benefits percieved by consumers / R. Deliza., A. Rosenthal, F.B.D. Abadio, H. Carlos,
O. Silva, C. Castillo // Journal of food engineering. — 2005. — Vol. 67. — P. 241-246.

91. Derksen, J. Pollen tubes: a model system for plant cell growth / J. Derksen //
Botanica acta. — 1996. — Vol. 109. — P. 341-345.

92. Ding, D. Q., Tazawa, M. Influence of cytoplasmic streaming and turgor pressure gradient on the transnodal transport of rubidium and electrical conductance in Chara corallina / D. Q Ding, M. Tazawa // Plant cell physiology. — 1989. — Vol. 30. — P. 739-748.

93. Dziubinska, H. Ways of signal transmission and physiological role of electrical potentials in plants / H. Dziubinska // Acta aocietatis botanicorum poloniae. — 2003. — Vol. 72, 4. — P. 309-318.

94. Erwee, M. G. Characterisation of the Egeria densa Planch. leaf symplast.
Inhibition of the intercellular movement of fluorescent probes by group II ions / M. G.
Erwee, P. B. Goodwin // Planta. — 1983. — Vol. 158. — P. 320-328.

95. Erwee, M. G. Characterization of the Egeria densa leaf symplast: response to plasmolysis, deplasmolysis and to aromatic amino acids / M. G. Erwee, P. B. Goodwin // Protoplasma. — 1984. — Vol. 12. — P. 162-168.

96. Farrar, T. C. Nuclear magnetic resonance / T. C. Farrar, M. S. Maryott, M. S. Malmberg // Ann. rev. phys. chem.. — 1972. — Vol. 23. — P. 193-216.

97. Fernandes, P. M. Genomic expression pattern in Saccharomyces cerevisiae cells in response to high hydrostatic pressure / P. M. Fernandes, T. Domitrovic, C.M. Kao, E. Kurtenbach // FEBS Lett.. — 2004. — Vol. 556, 1-3. — P. 153-160.

98. Fulda, S. Cellular stress responses: cell survival and cell death / S. Fulda, A. M.
Gorman, O. Hori, A. Samali // International journal of cell biology. — 2010. — P. 23.

99. Galmés, J. J. Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO<sub>2</sub> concentration under water stress / J.J. Galmés, M. Ribas-Carbó, H. Medrano // Journal of experimental botany. -2011. - Vol. 62, 2. - P. 653-665.

100. Gonzalez, M. E. <sup>1</sup>H-NMR study of the impact of high pressure and thermal processing on cell membrane integrity of onions / M. E.Gonzalez, D. M. Barrett, M. J. McCarthy, F. J. Vergeldt, E. Gerkema, A. M. Matser, H. Van As // Journal of food science. — 2010. — Vol. 75, 7. — P. 417-425.

101. Gonzalez, M. E. Onion Cells after high pressure and thermal processing: comparison of membrane integrity changes using different analytical methods and impact on tissue texture / M.E. Gonzalez, G. E. Anthon, D. M. Barrett // Journal of food science. — 2010. — Vol. 75, 7. — P. 426-432.

102. Gross, M. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes / M. Gross, R. Jaenicke // Eur. j. biochem.. — 1994. — Vol. 221, 2. — P. 617-630.

103. Hahn, E. L. Spin echoes / E. L. Hahn // Phys. rev.. — 1950. — T. 80. — C. 580-584.

104. Harris, R. K. Nuclear spin relaxation / R. K. Harris, N. Boden // Nuclear magnetic resonance. — 1972. — Vol. 1. — P. 115-168.

105. Harris, R. K. Nuclear spin relaxation / R. K. Harris, N. Boden // Nuclear magnetic resonance. — 1973. — Vol. 2. — P. 112-164.

106. Hartmann, C. Mechanical stresses in cellular structures under high hydrostatic pressure / C. Hartmann, K. Mathmann, A. Delgado // Innovative food science and emerging technologies. — 2006. — Vol. 7. — P. 1-12.

107. Hertz, H. G. The pressure dependence of the proton relaxation time of water at 0°C / H. G. Hertz, C. Radle // Zeitschrift für physikalische chemie. — 1969. — Vol. 68, 36. — P. 324-326.

108. Hill, A. E. An Osmotic model of the growing pollen tube / A.E. Hill, B. Shachar-Hill, J. N. Skepper, J. Powell, Y. Shachar-Hill // PLoS one.. — 2012. — Vol. 7, 5. — P. :e36585.

109. Holbrook N.M. Transporting water to the tops of trees / N. M. Holbrook, M. A.
Zwieniecki // Physics today. — 2008. — P. 76-77.

110. Holdaway-Clarke, T. L. Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata / T. L. Holdaway-Clarke, N. A. Walker, P. K. Hepler, R. L. Overall // Planta.. — 2000. — Vol. 210. — P. 329-335.

111. Hoover, D. G. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms / D. G. Hoover, C. Metrick, A. M Papineau, D. F. Farkas, D. Knorr // Food technology. — 1989. — Vol. 43. — P. 99-107.

112. Iwahashi, H.. Adaptation of Saccharomyces cerevisiae to high hydrostatic pressure causing growth inhibition / H. Iwahashi, M. Odani, E. Ishidou, E. Kitagawa // FEBS letters . — 2005. — Vol. 579, 13. — P. 2847-2852.

113. Jonas, J. Nuclear magnetic resonance at high pressure / J. Jonas // Rev. sci. instrum.. — 1972. — Vol. 43. — P. 643-649.

114. Jonas, J. Nuclear magnetic resonance at high pressures / J. Jonas // Annu. rev. phys. chem.. — 1975. — Vol. 26. — P. 167-190.

115. Kawamoto, T. Changes in the structure of water deduced from the pressure dependence of the Raman OH frequency / T. Kawamoto, S. Ochiai, H. Kagi // J. chem. phys.. — 2004. — Vol. 120. — P. 5867-5870.

116. Kawarai, T. High-hydrostatic-pressure treatment impairs actin cables and budding in Saccharomyces cerevisiae / T. Kawarai // J. biosc. and bioeng.. — 2006. — Vol. 101, 6. — P. 515-518.

117. Knoblauch, M. Münch, morphology, microfluidics – our structural problem with the phloem / M. Knoblauch, W. S. Peters // Plant, cell and environment. — 2010. — Vol. 33. — P. 1439-1452.

118. Kramer, P. J. Water relations of plants / P. J. Kramer. — New-York : Academic press, 1983. — 489 p.

119. Kramer, P. J. Water relations of plants and soils / P. J. Kramer, J. S. Boyer. —San Diego CA: Academic press, 1995. — 495 p.

120. Kroeger, J. H. Pollen tube growth: Getting a grip on cell biology through modeling / J.H. Kroeger, A. Geitmann // Mechanics research communications. — 2012.
— Vol. 42. — P. 32-39.

121. Kroeger, J. H. Regulator or driving force? The role of turgor pressure in oscillatory plant cell growth / J.H. Kroeger, R. Zerzour, A. Geitmann // PLos one. — 2011. — Vol. 6, 4. — P. e18549.

122. Krynicki, K. Pressure and temperature dependence of self-diffusion in water / K.
Krynicki, C. D. Green, D. W. Sawyer // Faraday discuss. chem. Soc.. — 1978. — Vol.
66. — P. 199-208.

123. Lawrence, J. A. The influence of hydrostatic pressure upon biochemical activities of heterotrophic bacteria / J. A. Lawrence // Canadian journal of microbiology. — 1975. — Vol. 21, 9. — P. 1406-1412.

124. Lew, R. R. Pressure regulation of the electrical properties of growing Arabidopsis thaliana L. root hairs / R. J. Reid, R. L. Overall // Plant physiology. — 1996. — Vol. 112. — P. 1089-1100.

125. Liua, J. Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants / J. Liua, S. H. Howell // The plant cel.. — 2010. — Vol. 22. — P. 2930-2942.

126. Lopez-Saez, J. F. Fine structure of plasmodesmata / J. F. López-Sáez, G. Giménez-Martín, M. C. Risueño // Protoplasma. — 1966. — Vol. 61. — P. 81.

127. Loseva, N.L. The effect of AgNO<sub>3</sub> on the bioenergetic processes and the ultrastructure of *Chlorella* and *Dunaliella* cells exposed to different saline conditions / N.L. Loseva, A.Ju. Alyabyev, L.Kh. Gordon, I.N. Andreyeva, O.P. Kolesnikov a, A.A. Ponomareva, R.B. Kemp // Thermochimica acta. — 2007. — Vol. 458. — P. 71-76.

Malone, M. Only xylem-borne factors can account for systemic woundsignalling in the tomato plant / M. Malone, J. Alarcon // Planta. — 1995. — Vol. 196. — P. 740-746.

129. Malone, M. Surface potentials and hydraulic signals in wheat leaves following localised wounding by heat / M. Malone, B. Stankovich // Plant cell environ.. — 1991.
— Vol. 14. — P. 431-436.

Malone, M. The relationship between wound-induced proteinase inhibitorsand hydraulic signals in tomato seedlings / M. Malone, L. Palumbo, F. Boari, M. Monteleone, H. G. Jones // Plant cell environ.. — 1994. — Vol. 17. — P. 81-87.

131. Malone, M. Kinetics of wound-induced hydraulic signals and variation potentials in wheat seedlings / M. Malone // Planta. — 1992. — Vol. 187. — P. 505-510.

132. Margosch, D. Pressure inactivation of Bacillus endospores / D. Margosch, M. G.
Gänzle, M. A. Ehrmann, R. F. Vogel // Applied and environmental microbiology. —
2004. — Vol. 70. — P. 7321-7328.

133. Martindale, V. E. Phosphorylation of algal centrin is rapidly responsive to changes in the external milieu / V. E. Martindale, J. L. Salisbury // Journal of cell science. — 1990. — Vol. 96. — P. 395-402.

134. Mees, G. C. The mechanism of water absorption by roots. 1. Preliminary studies on the effects of hydrostatic pressure gradients / G. C. Mees, P. E. Weatherley // Proc. roy. soc. London. — 1957. — Vol. 147. — P. 367-380.

135. Meiboom, S. Spin-echo method for measuring nuclear magnetic relaxation times /
S. Meiboom, D. Gill // Rev.sci.instrum.. — 1958. — Vol. 29, 8. — P. 688-691.

136. Messerli, M. A. Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during pollen tube growth / M. A. Messerli, R. Créton, L. F. Jaffe, K. R. Robinson // Dev. biol.. — 2000. — Vol. 222. — P. 84-98.

137. Moir, A. Spore germination / A. Moir, B. Corfe, J. Behravan // CMLS cellular and molecular life science. — 2002. — Vol. 59. — P. 403-409.

138. Molina-Garcia, A. D. The effect of hydrostatic pressure on biological systems /
A. D. Molina-Garcia // Biotechnology and genetic engineering reviews. — 2002. —
Vol. 19. — P. 1-52.

139. Munns, R. Plant adaptations to salt and water stress: differences and commonalities / R. Munns // Advances in botanical research. — 2011. — Vol. 57. — P. 1-32.

140. Ohashi, T. Hydrostatic pressure influences morphology and expression of VEcadherin of vascular endothelial cells / T. Ohashi, Y. Sugaya, N. Sakamoto, M. Sato // Journal of biomechanics. — 2007. — Vol. 40. — P. 2399-2405.

141. Ono, F. Effect of very high pressure on life of plants and animals / F. Ono, Y. Mori, M. Sougawa, K. Takarabe, Y. Hada, N. Nishihira, H. Motose, M. Saigusa, Y. Matsushima, D. Yamazaki, E Ito, N. L. Saini // 23 rd International conference on high

pressure science and technology. Journal of physics: conference series — 2012. — Vol. 377.

142. Oparka, K. J. Direct evidence for pressure-generated closure of plasmodesmata /
K. J. Oparka, A. M. Prior // The plant journal. . — 1992. — T. 2, № 5. — C. 741-750.

143. Overall, R. L. A model of the macromolecular structure of plasmodesmata / R. L.
Overall, L. M. Blackman // Trends in plant science. — 1996. — Vol. 1, 9. — P. 307-311.

144. Paul, A. Hypobaric biology: arabidopsis gene expression at low atmospheric pressure / A. Paul, A. C. Schuerger, M. P. Popp, J. T. Richards, M. S. Manak, R. J. Ferl // Plant physiology. — 2004. — Vol. 134. — P. 215-223.

145. Petrucci, R. H. General chemistry principles and moderna / R. H. Petrucci, F. G. Herring, J. D. Madura, C. Bissonnette. — Pearson prentice hall, 10th edition, 2010. — 1424 p.

146. Pickard, W. F. The role of cytoplasmic streaming in symplastic transport / W. F.
Pickard // Plant cell environment. — 2003. — Vol. 26. — P. 1-15.

147. Plyushch, T. A. Structural aspects of in vitro pollen tube growth and micropylar penetration in Gasteria verrucosa (Mill.) H. Duval and Lilium longiflorum Thunb / T. A. Plyushch, M. T. M. Willemse, M. A. W. Franssen-Verheijen, M. C. Reinders // Protoplasma. — 1995. — Vol. 187. — P. 13-21.

148. Powles, J. G. Exact analytic solutions for diffusion impeded by an infinite array of partially permeable barriers / J. G. Powles, M. J. D Mallet, G. Rickayzen // Proc. r. soc. Lond. a.. — 1992. — Vol. 436. — P. 391-403.

149. Pradillon F. Pressure and life: some biological strategies / F. Pradillon, F. Gaill //
Rev environ sci biotechnol. — 2007. — Vol. 6. — P. 181-195.

150. Reichelt, S. Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall / S. Reichelt1, A. E. Knight, T. P. Hodge, F. Baluska, J. Samaj, D. Volkmann, J. Kendrick-Jones // Plant journal. — 1999.
— Vol. 19. — P. 555-567.

151. Reid, R. J.,Intercellular communication in Chara: factors affecting transnodal electrical resistance and solute fluxes // Plant, cell and environment. — 1992. — Vol. 15. — P. 507-517.

152. Rivalain, N. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies / N. Rivalain, J. Roquain, G. Demazeau // Biotechnology advances. — 2010. — Vol. 28. — P. 659-672.

153. Robards, A. W. Interctllular communication in plants:studies on plasmodesmata /A. W. Robards. — Springer, 1976. — 15 p.

154. Roberts, A. G. Plasmodesmata and the control of symplastic transport / A. G.
Roberts, , K. J. Oparka // Plant, cell and environment. — 2003. — Vol. 26. — P. 103-124.

155. Roche, Y. Behavior of plant plasma membranes under hydrostatic pressure as monitored by fluorescent environment-sensitive probes / Y. Rochea, A. S. Klymchenkoc, P. Gerbeau-Pissota, P. Gervaisb, Y. Mélyc, F. Simon-Plasa, Jean-Marie Perrier-Cornet // Biochimica et biophysica acta. — 2010. — Vol. 1798. — P. 1601-1607.

156. Rothschild, L. J. Life in extreme environments / L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli // Nature. — 2001. — Vol. 409. — P. 1092-1101.

157. Samali, A. Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response / A. Samali, U. FitzGerald, S. Deegan, S. Gupta // International journal of cell biology. — 2010. — P. 1-12.

158. Schulz, A. Plasmodesmal widening accompanies the short term increase in symplasmic phloem unloading in pea root tips under osmotic stress / A. Schulz // Protoplasma. — 1995. — Vol. 188. — P. 22-37.

159. Shimada, S. Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast Saccharomyces cerevisiae / S. Shimada, M. Andou, N. Naito, N. Yamada, M, Osumi, R. Hayashi // Applied microbiology and biotechnology. — 1993. — Vol. 40. — P. 123-131.

160. Silva, J. L. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages / J. L. Silva, D. Foguel, A. T. Da Poian, P. E. Prevelige // Curr. opin. struct. biol.. — 1996. — Vol. 6. — P. 166-175.

161. Snaar, J.E.M. A method for simultaneous measurements of NMR spin-lattice and spin-spin relaxation times in compartmentalized systems / J.E.M. Snaar, H. Van As. // J. Magn. reson.. — 1992. — Vol. 98. — P. 139-148.

162. Snapp, E. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions /
E. L. Snapp, R. S. Hegde, M. Francolini // The journal of cell biology. — 2003. — Vol. 163, 2. — P. 257-269.

163. Sparkes, I. Recent advances in understanding plant myosin function: Life in the fast lane / I. Sparkes // Mol. plant.. — 2011. — Vol. 4. — P. 805-812.

164. Sperelakis, N. Cell physiology source book / N. Sperelakis. — San-Diego:
Academic press inc, 1995. — 738 p.

165. Stein, W. D. Physical basis of movement across cell membranes / W. D. Stein // Academic press, Orlando. — 1986. — P. 173-181.

166. Steiskal, E. O. Self-diffusion measurements: spin-echoes in presense of a time dependent field gradient / E. O Steiskal, J. E. Tanner // J. chem. phys. — 1965. — Vol. 42, 1. — P. 288-292.

167. Steudle, E. Pressure probe techniques: basic principles and application to studies of water and solute relations at the cell, tissue, and organ level / E. Steudle // Bios. scientific publishers ltd. — 1993. — P. 5-36.

168. Steudle, E. Water uptake by roots: effect of water deficit / E. Steudle // J. exp. bot.. — 2000. — Vol. 51. — P. 1531-1542.

169. Stout, D. G. Nuclear magnetic resonance relaxation times and plasmalemma water exchange in Ivy Bark / D. G. Stout, P. L. Steponkus, R. M. Cotts // Plant physiol..
— 1978. — Vol. 62. — P. 636-641.

170. Stout, D. G., Steponkus, P. L., Cotts, R. M. Nuclear magnetic resonance relaxation times and plasmalemma water exchange in ivy bark / D. G. Stout, P. L. Steponkus, R. M. Cotts // Plant physiol.. — 1978. — Vol. 62. — P. 636-641.

171. Tamiya, H., Corrrelation between photosyntesis and light-independent metabolism in the growth of Chlorella / H. Tamiya, T. Yamura, K. Shibata, E. Hase, T. Ninei // Biochim biophys acta. — 1953. — Vol. 1. — P. 25-40.

172. Tanaka, H. A new scenario of the apparent fragile-to-strong transition in tetrahedral liquids: water as an example / H. Tanaka // J. phys.: condens. matter. — 2003. — Vol. 15. — P. 703-711.

173. Tanino, T. T. Abscisic acid increases terrestrial plant cell resistance to hydrostatic pressure / K. K. Tanino, T. H. Chen, L. H. Fuchigami, C. J. Weiser // Plant physiol. —
1992. — Vol. 98. — P. 745-748.

174. Torry, H. C. Nuclear spin relaxation by translational diffusion / H. C. Torry // Phys. rev. — 1953. — Vol. 92, 2. — P. 962-969.

175. Tucker, E. B. Cytoplasmic streaming does not drive intercellular passage in staminal hairs of Setcreasea purpurea / E. B. Tucker // Protoplasma. — 1987. — Vol. 137. — P. 140-144.

176. Turgeon, M. The puzzle of phloem pressure / M. Turgeon // Plant physiology. —
2010. — Vol. 154. — P. 578-581.

177. Tyree, M. T. The cohesion-tension theory of sap ascent: current controversies /
M. T. Tyree // Journal of experimental botany. — 1997. — Vol. 48. — P. 1753-1765.

178. Valiullin, R. Time dependent self-diffusion coefficient of molecules in porous media / R. Valiullin, V. Skirda // Journal of chemycal physics. — 2001. — Vol. 114, 1. — P. 452-458.

179. Varadarajan, S. A novel cellular stress response characterised by a rapid reorganisation of membranes of the endoplasmic reticulum / S. Varadarajan, E. T. W. Bampton, J. L. Smalley, K. Tanaka, R. E. Caves, M. Butterworth, J. Wei, M. Pellecchia, J. Mitcheson, T. W. Gant, D. Dinsdale, G. M. Cohen // Cell death and differentiation. — 2012. — Vol. 19, 12. — P. 1896-1907.

180. Wan, X. Gating of water channels (aquaporins) in cortical cells of young corn roots by mechanical stimuli (pressure pulses): effects of ABA and of  $HgCl_2 / X$ . Wan, E. Steudle, W. Hartung // Journal of experimental botany. — 2004. — Vol. 55, 396. — P. 411-422.

181. White, R. G.. Actin associated with plasmodesmata / R. G. White, K. Badelt, R.
L. Overall, M. Vesk // Protoplasma. — 1994. — Vol. 180. — P. 169-184.

182. Winkler H. Exchange processes in NMR / H. Winkler, D. Michel // Adv. Colloid interface science. — 1985. — Vol. 23. — P. 149-177.

183. Winship, L. J. Pollen tubes and the physical world / L. J. Winship, G. Obermeyer,
A. Geitmann, P. K. Hepler // Trends in plant science. — 2011. — Vol. 16, 7. — P. 353-355.

184. Winship, L. J. Under pressure, cell walls set the pace / L. J. Winship, G. Obermeyer, A. Geitmann, P. K. Hepler // Trends in plant science. — 2010. — Vol. 15, 7. — P. 363-369.

185. Woessner, D. E. Nuclear transfer efects in nuclear magnetic resonance pulse experiments / D. E. Woessner // J. chem. phys.. — 1961. — Vol. 35. — P. 41-48.

186. Wright, K. M. Metabolic inhibitors induce symplastic movement of solutes from the transport phloem of Arabidopsis roots / K. M. Wright, K. J. Oparka // Journal of experimental botany. — 1997. — Vol. 48. — P. 1807–1814.

187. Wu Y. Calcium regulates the cell-to-cell water flow pathway in maize roots during variable water conditions / Y. Wu, X. Liu, W. Wang, S. Zhang, B. Xu // Plant physiology and biochemistry. — 2012. — Vol. 58. — P. 212-219.

188. Zambryski, P. C. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants / P. C. Zambryski, K. M. Crawford // Annual review of cell and developmental biology. — 2000. — Vol. 16. — P. 393-421.

189. Zhang, W. H. Effect of low oxygen concentration on the electrical properties of cortical cells of wheat / W. H. Zhang, S. D. Tyerma // Journal of plant physiology. — 1997. — Vol. 150. — P. 567–572.

190. Zholkevich, V. N. On physiological regulation of water transport in root systems /
V. N. Zholkevich // Stud. biophys. — 1981. — Vol. 85, 1. — P. 17-18.

191. Zimmerman, J. R. Nuclear magnetic resonance studies in multiple phase systems:
Life time of water molecule in an adsorbing phase of Silica Gel / J. R. Zimmerman, W.
E. Brittin // J. phys. chem.. — 1957. — Vol. 61. — P. 1328-1333.

192. Zonia, L. Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function /
L. Zonia, T. Munnik // Trends plant sci.. — 2007. — Vol. 12. — P. 90-97.

193. Zonia, L. Uncovering hidden treasures in pollen tube growth mechanics / L.
Zonia, T. Munnik // Trends plant sci.. — 2009. — Vol. 14. — P. 318-327.

194. Zonia, L. Understanding pollen tube growth: the hydrodynamic model versus the cell wall model / L. Zonia, T. Munnik // Trends in plant science. — 2011. — Vol. 16, 7. — P. 347-352.