



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
Visnik Dnipropetrovs'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 581.1.03+631.531.173

Автоматизована система реєстрації біоелектричних потенціалів

Д.В. Чернетченко, М.П. Моцний, Н.П. Боцьва, О.В. Єліна, М.М. Мілих

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Розроблено апаратно-програмний комплекс автоматизованої системи реєстрації біоелектричних потенціалів на базі USB-пристрою з подальшою обробкою оцифрованих сигналів на ПК. Запропоновано універсальну схему реєстрації біопотенціалів, яка дозволяє проводити експериментальні дослідження як в умовах окремого впливу на досліджуваний об'єкт холодової, теплової, фото- та електростимуляції, так і в умовах різноманітних комбінацій вказаних впливів. Клієнтська частина програми забезпечує візуалізацію, кількісний аналіз і збереження отриманих результатів у базі даних. Засобами комплексної автоматизованої системи зафіксовано біоелектричні потенціали листя кукурудзи у відповідь на теплові стимули. Охарактеризовано динаміку вказаних потенціалів, кількісно оцінено рівень потенціалів стабілізації. На базі отриманих експериментальних даних визначено параметри математичної моделі процесів генерації електричних імпульсів у клітині.

Ключові слова: реєстрація біоелектричних потенціалів; автоматизація фізичного експерименту; математична модель клітини; біопотенціали листя кукурудзи

Automated experiment for registration of bioelectrical potentials

D.V. Chernetchenko, M.P. Motsnyj, N.P. Botsva, O.V. Elina, M.M. Milykh

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

A hardware-software complex automated system of recording bioelectrical potentials, which is based on a USB-device with subsequent processing of signals with PC was developed in this work. We proposed a universal scheme of registration of bioelectrical potentials, which allows one to detect the reaction of biological objects to different stimuli, such as cold, heat, photo- and electrical stimulation, and to different combinations of these stimuli (Motsnyj et al., 2004). They could be applied for deeper understanding of the biological mechanisms of generation of electrical potentials in cells and discovering the accommodation processes of organisms as a whole to these stimuli. The system for registration of bioelectrical potentials consists of hardware and software parts. The software part consists of the client and server sides, which transmit experimental data to the network. The client-side software renders a quantitative analysis and stores the results in a database. An integrated system of registration and biometrical processing was applied for analysis of the electrical responses of maize leaves to heat stimuli. The dynamics of these potentials were studied and a quantitative analysis of the potential level stabilization was made. We found that amplitude relation of responses to the initial response increased and stabilized at the level of 130%. Mathematical models of the plant cell for discovering intracellular mechanisms of biopotentials registration were developed. As a result of modeling, we found that the electrical response of the cells is based on selective conductance of the cell membrane for H^+ and K^+ ions. By this way, we show the biophysical relation of plant potentials to intracellular biophysical mechanisms.

Keywords: bioelectrical potentials registration; automatized physical experiment; mathematical cell model; maize leaves biopotentials

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Гагаріна, 72, 49010, Дніпропетровськ, Україна
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin ave., 72, 49010, Dnipropetrovsk, Ukraine
Tel.: +38050-420-86-04. E-mail: rakon3@gmail.com*

Вступ

Останніми роками в Україні зростає зацікавленість дослідників і практиків щодо вирощування рослин у штучних контрольованих умовах. Оптимізація кліматичних і енергетичних характеристик середовища у такому процесі потребує безперервного прижиттєвого контролю показників життєдіяльності рослин, який ускладнюється необхідністю уникнення їх можливих пошкоджень. За таких умов стають актуальними методи електродіагностики стану та розвитку рослин (Motsnyj et al., 2004). Електричне збудження та відповідь вищих рослин зазвичай пов'язані зі швидкими відповідями на зовнішній стимул (Davies, 2004). Останні дослідження з електрогенезу рослин показують, що існує дуже велике різноманіття форм електричних відповідей (Fromm et al., 2007), навіть на стандартні зовнішні подразники: механічні, фото- чи теплові стимули. Сьогодні достатньо точно описаний електрогенез рослин: види їх електричної активності у відповідь на різні подразнення та роль клітинної мембрани у процесах генерації біоелектричних потенціалів (Davies, 1987; Davies, 2004). Але роль у внутрішньоклітинних процесах, міра та механізм їх впливу на динаміку біоелектричних реакцій окремих клітин в цілому розкриті недостатньо.

Теплові потенціали відповіді рослини зумовлені сильним локальним зменшенням концентрації CO_2 , який активно поглинається електронним мембранним транспортом (Kaziolek et al., 2004) фотосистеми II (PS II). Детальніше (Lautner et al., 2005) розглянуто відповіді на тепловий подразник *Populus trichocarpa*: встановлено, що сигнал залежить від наявності у клітинах рослини іонів кальцію. Як і потенціали дії клітин тварин, поширення електричних сигналів у рослинах відбувається завдяки іонним каналам. Іонні механізми збудливості клітин тварин зазвичай пов'язані з потоками іонів Na^+ та K^+ , у той час як для рослин головною роллю при формуванні потенціалів дії відіграють іони Ca^{2+} , Cl^- та K^+ (Samejima and Sibaoka, 1980; Felle and Zimmermann, 2007). Транспорт H^+ крізь плазматичну мембрану також може відігравати важливу роль для потенціалів дії (Opritov and Ryatygin, 2002; Vodeneev, Opritov and Ryatygin, 2006) та їх розповсюдження. Під час нагрівання листка рослини спостерігалось електричне збудження, що супроводжується активними H^+ -потоками у плазматичній мембрані та розпадом P-тип H^+ -АТФ-ази (Stahlberg et al., 2006). Ензими клітинної стінки, плазматичної мембрани та цитоплазми змінюють активність під час локальних змін концентрації іонів (Davies, 1987). Внесок H^+ -потоків устанавлюють завдяки факту локального підкислювання цитоплазми клітини (Bulychev and Kamzolkina 2006; Vodeneev et al., 2006) під час зростання потенціалів дії. Покладаючись на факти щодо іонної динаміки під час зростання електричного збудження клітин, можна побудувати еквівалентну математичну модель для детальнішого вивчення цих процесів, визначення внеску описаних електрохімічних механізмів у процес електрогенезу.

Опис динаміки електричних процесів на клітинному рівні після публікації відомої роботи А. Ходжкіна та А. Хакслі (Hodgkin and Huxley, 1952), де був започатко-

ваний такий підхід до нервової клітини, традиційно здійснюється із застосуванням методів моделювання. Розробка та перевірка адекватності подібної моделі для опису електродинаміки рослинної клітини потребують накопичення значного обсягу експериментальних даних, зокрема в умовах різних способів подразнення рослин і комбінацій таких подразнень.

Сучасні електронно-вимірювальні прилади здатні забезпечити реєстрацію біоелектричних потенціалів рослин як контактно, так і дистанційно, із високою чутливістю та малою інерційністю (Zhu, 2002). Але при цьому як для наукових досліджень, так і для виконання практичних завдань актуальною залишається комплексна автоматизація процесу реєстрації та обробки біопотенціалів із застосуванням сучасних комп'ютерних технологій (Hoppensteadt et al., 1986).

Мета цієї статті – розробити автоматизовану систему реєстрації та обробки біоелектричних потенціалів, описати процеси генерації електричних імпульсів у клітині в рамках математичної моделі.

Матеріал і методи досліджень

Схема системи реєстрації біоелектричних потенціалів (рис. 1) складається з таких модулів. Блок вимірювання (1) містить екрановану камеру для досліджуваного об'єкта та електроди ЕВЛ-1М, що не поляризуються. Блок реєстрації (2) забезпечує можливість одночасного надходження підсиленого сигналу на самописець Endim і на вхід пристрою оцифровки даних із подальшою обробкою у персональному комп'ютері. Для калібрування самописця застосовується підсилений сигнал синусоїдальної форми частотою 1 Гц від калібрувальника. Оцифровка даних здійснюється двоканалним USB-осцилографом IRIS з частотою дискретизації 100 Гц, при цьому похибка вимірювань складала не більше 2% у будь-якому з досліджуваних діапазонів вхідного сигналу. USB-осцилограф дозволяє проводити вимірювання та запис сигналу протягом декількох десятків годин.

Термостимулятор (3), оснований на ефекті Пельтьє, забезпечує як режим охолодження, так і режим нагрівання стимульованої частини поверхні об'єкта (положення I і II перемикача К3 відповідно). Параметри імпульсу подразнення формуються реле часу та регулятором струму. За необхідності пристрій реєстрації може додатково фіксувати динаміку зміни температури на контактах термостимулятора (положення II перемикача К2).

Фотостимулятор (4) містить блок світлодіодів чотирьох кольорів: білого, синього ($\lambda = 470$ нм), зеленого ($\lambda = 540$ нм), червоного ($\lambda = 690$ нм). Для зменшення нагріву досліджуваного об'єкта під час фотостимуляції світлодіоди мають спеціальний інфрачервоний фільтр. Освітленість, створена діодами, регулюється силою струму в них, контролюється фотометром. Тривалість стимулу задається реле часу або при тривалій стимуляції в ручному режимі. Електростимулятор (5) забезпечує подачу на об'єкт електричного стимулу, амплітуда якого регулюється реостатом і вимірюється цифровим мікроамперметром, а тривалість формується реле часу.

Розроблена схема системи реєстрації є універсальною. Вона дозволяє проводити експериментальні дослідження біопотенціалів як в умовах окремого впливу на досліджуваний об'єкт холодової, теплової, фото- та електростимуляції, так і в умовах різноманітних комбінацій вказаних впливів. Обробка, аналіз і подальша візуалізація зареєстрованих у процесі експерименту

оцифрованих біопотенціалів проводяться оригінальними програмними засобами. Для поєднання USB-осцилографа з персональним комп'ютером розроблено універсальний драйвер пристрою. Окрема програма забезпечує автоматичне збереження у пам'яті отриманих у цифровому форматі через USB-порт ПК даних про динаміку зміни потенціалу у відповідних файлах формату *.dat.

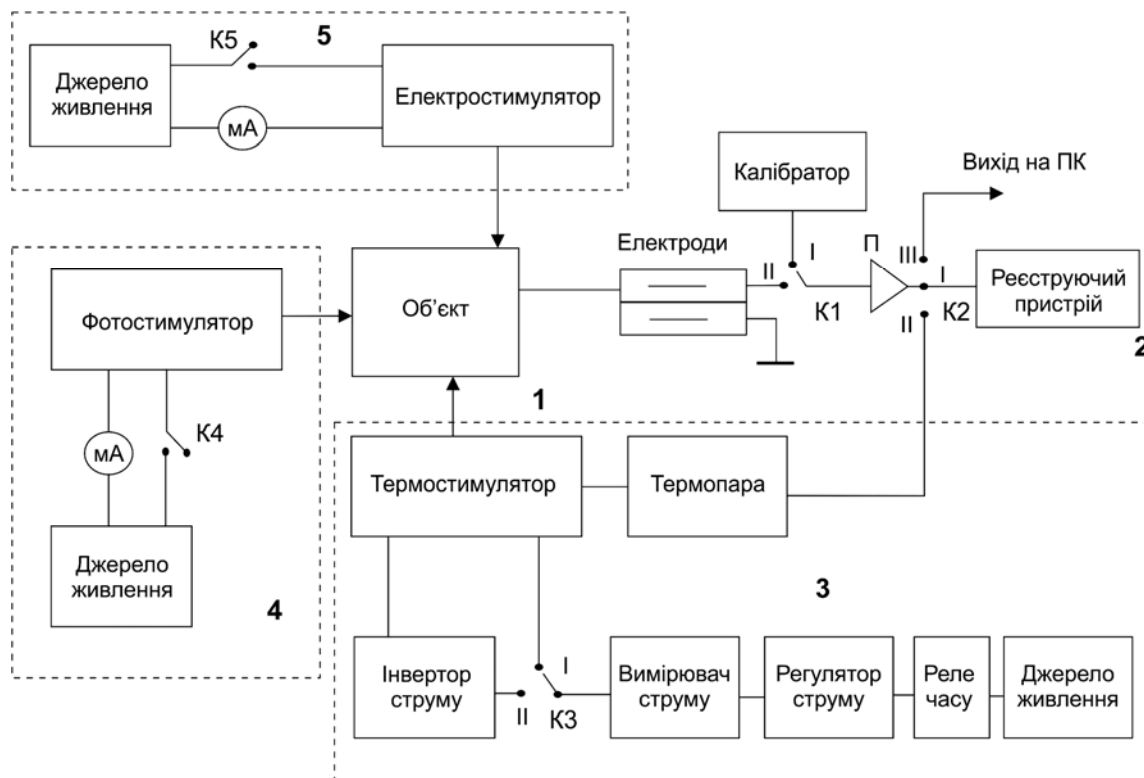


Рис. 1. Блок-схема системи реєстрації біоелектричних потенціалів:

І – блок вимірювання, 2 – блок реєстрації, 3 – блок термостимуляції, 4 – блок фотостимуляції, 5 – блок електростимуляції, П – підсилювач, К1, К2, К3, К4, К5 – перемикачі

Клієнтська частина програмного забезпечення розроблена на базі візуального середовища програмування LabView (Ogen and Jones, 2006). У вікні клієнтської програми наводяться та кількісно аналізуються отримані дані. Програма також дозволяє визначати та зберігати у базі даних експерименту такі головні показники зареєстрованих сигналів як амплітуди піків холодних (теплових або інших) потенціалів із відповідними часовими відмітками; відсоткові співвідношення амплітуд піків відведених потенціалів, що характеризують динаміку перебігу процесу; поточні налаштування часових і амплітудних параметрів для калібрування та кількісної оцінки отриманих сигналів і візуалізації шкал графічної залежності «потенціал – час».

Статистичний аналіз масивів отриманих даних та визначення параметрів математичної моделі проводиться з використанням математичного пакета Matlab.

Результати та їх обговорення

Випробування апаратного та програмного забезпечення розробленої автоматизованої системи реєстрації біоелектричних потенціалів проведена в експериментах із дослідження впливу холодних і теплових стимулів на

біоелектричну реакцію листя кукурудзи (Davies, 2004). При цьому здійснено як цифровий запис і програмну обробку зареєстрованих потенціалів, так і їх фіксацію на самописці для контролю та порівняння.

Запис біопотенціалів рослини у відповідь на ритмічне холодове подразнення («холодовий потенціал») без застосування згладжувального фільтра за даними з вікна клієнтської програми на ПК наведено на рис. 2 а. Підключення та налаштування програмно реалізованого фільтра зі змінними параметрами та згладжувального фільтра типу фільтра Баттерворта III порядку, які відсікають мережеві завади та випадкові високочастотні складові, дає змогу отримати більш чіткий та якісний сигнал (рис. 2 б, в), придатний для подальшої обробки.

Після налаштування фільтра запис електричних відповідей від електродів із поверхні рослини повторювали 15 разів для отримання заданої точності вимірів. За результатами окремих експериментів із вивчення теплового впливу, збережених у файлах бази даних, спеціальною програмою розробленого програмного комплексу розраховані необхідні значення та побудовано графік залежності відносної амплітуди потенціалу відповіді від інтервалу часу між першим і наступним тепловими стимулами

(рис. 3). Із часом відношення амплітуди послідовних відповідей до амплітуди першої відповіді на подразник значно зростає з поступовою стабілізацією на рівні 130%. Це свідчить про процес активації внутрішньоклітинних механізмів адаптації рослини до подразника. Стабілізація амплітуди під час стимуляції, ймовірно, пов'язана із значним (від 25 до 40 с) часом поновлення мембранного потенціалу після генерації попередньої відповіді.

Результати, отримані із застосуванням автоматизованого програмно-апаратного комплексу, у цілому добре узгоджуються з результатами попередніх експериментів

із реєстрації потенціалів листя кукурудзи під час термічної стимуляції, отриманими за допомогою лише аналогових пристроїв (Davies, 2004). Перевірка відповідності отриманих в експерименті та оброблених цифрових даних записам, одночасно зафіксованим самописцем, свідчить про високу точність роботи автоматизованої системи. Похибка, що накопичується через обмеження вимірювального USB-пристрою та наявність зовнішніх завад, перебуває в допустимих межах (2–5 %) і практично не впливає на характеристики вихідного сигналу.

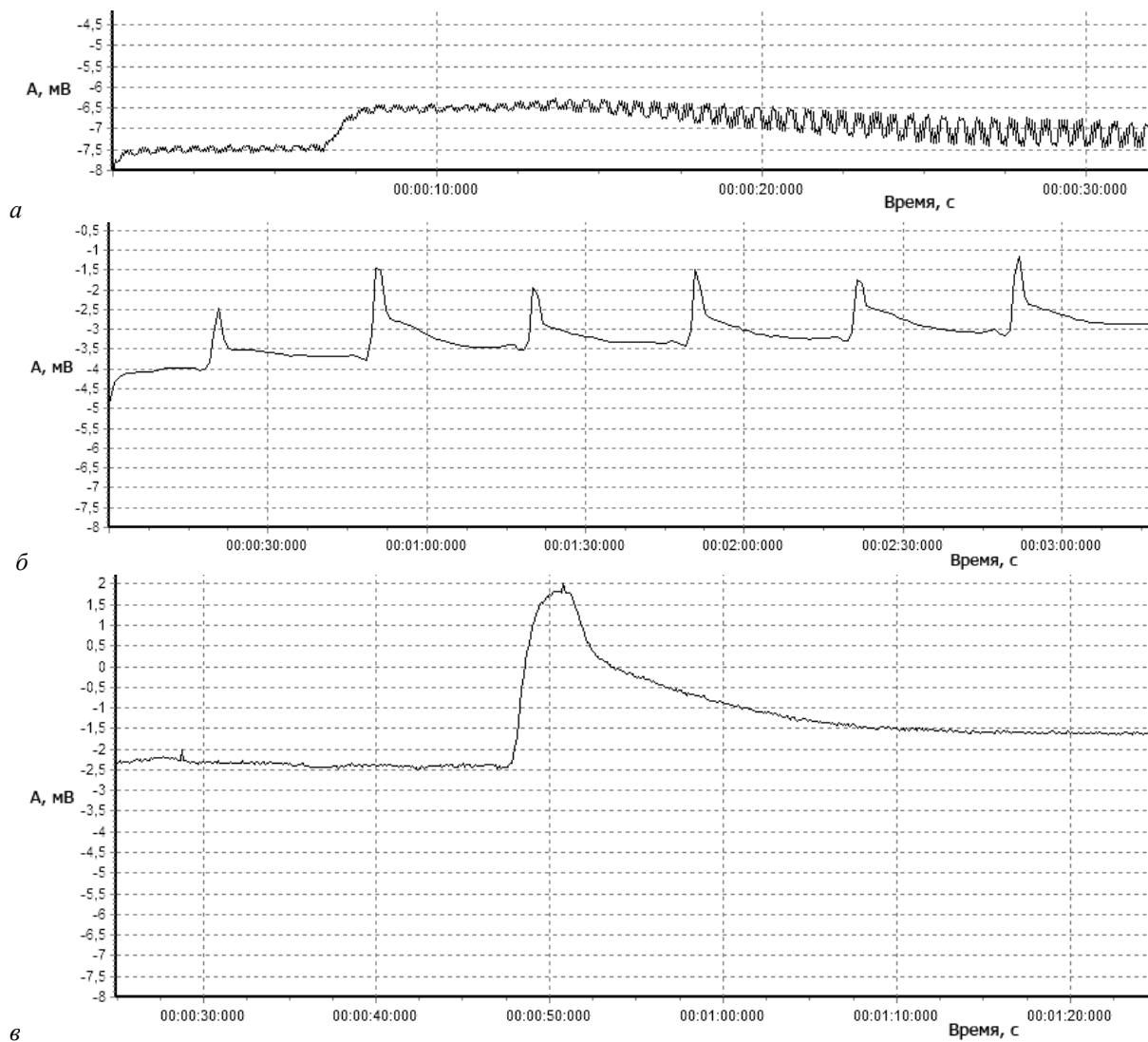


Рис. 2. Холодові потенціали під час ритмічної стимуляції:

а – без додаткової фільтрації сигналу, *б, в* – із застосуванням фільтрувальних засобів

Для аналізу можливих внутрішньоклітинних механізмів виникнення та динаміки зареєстрованих біоелектричних потенціалів розроблено модель клітини зі здатністю генерації активних електричних потенціалів. Для опису динаміки іонних струмів I_i та потенціалу на мембрані V_m на основі механізму Ходжкіна – Хакслі (Hodgkin and Huxley, 1952) запропоновано формулу:

$$I_i(V_m, t) = (V_m - E_i)g_i, \quad (1)$$

де E_i – потенціал рівноваги i -го іонного каналу, g_i – електрична провідність каналів, що визначаються за формулами:

$$\begin{aligned} g_i(V_m, t) &= \bar{g}_i \varphi^\alpha x^\beta, \\ \varphi(V_m, t) &= \frac{1}{\tau_\varphi} (\varphi_\infty - \varphi), \\ x(V_m, t) &= \frac{1}{\tau_x} (x_\infty - x). \end{aligned} \quad (2)$$

Функції $\varphi(t)$ та $x(t)$ описують швидкість реакції каналів та визначаються, як правило, методом сталого потенціалу на мембрані клітини. При цьому диференціальні рівняння (2) мають розв'язки:

$$\varphi(t) = \varphi_0 - [(\varphi_0 - \varphi_\infty)(1 - \exp(-t/\tau_\varphi))],$$

$$x(t) = x_0 - [(x_0 - x_\infty)(1 - \exp(-t/\tau_x))]. \quad (3)$$

Розроблене програмне забезпечення автоматизованої системи реєстрації потенціалів дозволяє визначати параметри моделі, що характеризують характер генерації потенціалу на мембрані клітини, у реальному часі у процесі експерименту із застосуванням апроксимації вхідних даних про динаміку змін електричного потенціалу.

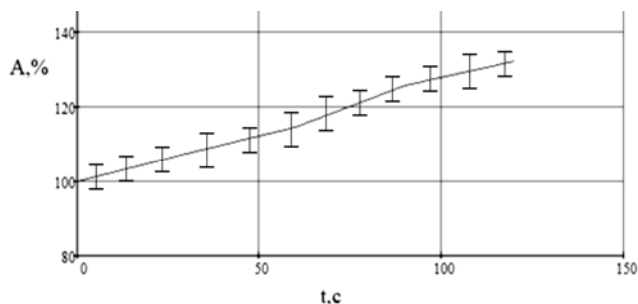


Рис. 3. Залежність амплітуди потенціалів листя кукурудзи від інтервалу часу між стимулами при ритмічній тепловій стимуляції: по осі ординат – амплітуда стимулів у відсотках до амплітуди першої відповіді

Сталі часу активації τ_φ та інактивації τ_x каналів для моделювання активності рослинної клітини обчислюються за експериментальними даними у середовищі математичного пакета Matlab, потім за формулами (2) розраховуються провідності іонних каналів активних клітин.

Для отриманих експериментальних залежностей провідності іонних каналів мають значення відповідно $g_1 = 32.455$ та $g_2 = 110.231$, які близькі до значень провідностей протонних каналів і каналів калію. Це достатньо достовірно вказує на походження зареєстрованих потенціалів. Періодичні осцилятивні відповіді, що спостерігалися в експериментах (рис. 2 а), є активною електричною відповіддю клітини на подразник потенціалами дії, в основі яких лежить взаємодія іонів H^+ та K^+ . Деяке відхилення розрахованих під час моделювання електричних провідностей від табличних значень для відповідних іонів спостерігається через наявність у клітині струмів інших типів, а також пасивного струму витоку іонів із клітини.

Висновки

Для підвищення ефективності методик електрофізіологічної діагностики стану та розвитку рослин під час безперервного прижиттєвого контролю показників їх фізіологічного стану актуальним є завдання комплексної автоматизації процесу реєстрації та обробки біопотенціалів із застосуванням сучасних комп'ютерних технологій. Розроблено універсальний апаратно-програмний комплекс реєстрації біоелектричних потенціалів на базі USB-пристрою з подальшою обробкою оцифрованих сигналів на ПК, який дозволяє проводити експериментальні дослідження як в умовах окремого впливу на

досліджуваний об'єкт холодової, теплової, фото- та електростимуляції, так і в умовах різноманітних комбінацій вказаних впливів. Оригінальні програмні засоби забезпечують фільтрацію від завад, візуалізацію, кількісний аналіз і збереження отриманих результатів у базі даних. Апробація апаратного та програмного забезпечення автоматизованої системи реєстрації біоелектричних потенціалів в експериментах із дослідження впливу холодкових і теплових стимулів на біоелектричну реакцію листя кукурудзи довела працездатність та високу точність розробленого вимірювального комплексу.

Засобами комплексної автоматизованої системи виконано реєстрацію та обробку біоелектричних потенціалів листя кукурудзи у відповідь на теплові стимули. За результатами кількісного аналізу динаміки отриманих потенціалів встановлено, що відношення амплітуди послідовних відповідей до амплітуди першої відповіді на подразник із часом значно зростає з поступовою стабілізацією на рівні 130%.

Для аналізу можливих внутрішньоклітинних механізмів виникнення та динаміки зареєстрованих біоелектричних потенціалів розроблено математичну модель клітини зі здатністю генерації активних електричних потенціалів. У результаті визначення параметрів моделі на базі отриманих експериментальних даних встановлено, що в основі електричної відповіді клітини лежить селективна зміна електричної провідності клітинної мембрани для іонів H^+ і K^+ . Таким чином показано зв'язок між потенціалами активності, що реєструвалися з поверхні рослини, та внутрішньоклітинними процесами.

Бібліографічні посилання

- Davies, E., 2004. New functions for electrical signals in plants. *New Phytol.* 161, 607–610.
- Davies, E., 1987. Action potentials as multifunctional signals in plants – a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ.* 10, 623–631.
- Eccles, J., 1966. *Physiology of synapses [Fiziologija sinapsov]*. Mir, Moscow (in Russian).
- Friesen, W.O., Friesen, J. A., 1994. *NeuroDynamix: Computer Models for Neurophysiology*. Oxford University Press, New York.
- Goldman, D.E., 1943. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27, 37–60.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544.
- Hoppensteadt, F.C., 1986. *An introduction to the mathematics of neurons*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hille, B., 2001. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Huguenard, J., McCormick, D.A., 1994. *Electrophysiology of the neuron: An interactive neuron*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Heldt, H.W., 1997. *Plant biochemistry & molecular biology*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Koch, C., Segev, I., 1989. *Methods in neuronal modeling: From synapses to networks*. Bradford Book, The MIT Press., Cambridge, MA.
- Lysikov, V.N., 2001. *Studying some features of maize genetics and developmental biology using electrophysiological tech-*

- niques action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *J. Exp. Bot.* 45(4), 463–469.
- Motsnyj, M.P., Elina, E.V., Vlasova, S.V., 2004. Issledovanie reakcii rasteniy, vizvannoї ritmicheskoy stimulyacii [The study plants responses induced by repetitive stimulation]. *Nauka ta Osvita, Odessa* 55, 37–38 (in Russian).
- Muyskens, M.A., Glass, S.V., Wietsma, T.W., Gray, T.M., Mark, A., 2007. Data acquisition in the chemistry laboratory using LabVIEW software. *J. Chem. Educ.* 73(12), 1112–1114.
- Ogren, P.J., Jones, T.P., Paul, J., 2006. Laboratory interfacing using the LabVIEW software package. *J. Chem. Educ.* 73(12), 1115–1116.
- Rosljakova, T.V., Molchan, O.V., Vasekina, A.V., Lazareva, E.M., Sokolik, A.I., Jurin, V.M., de Bur, A.H., Babakov, A.V., 2011. Soleustojchivost' jachmenja: Vzaimosvjaz' ekspressii izoform vakuoljarnogo Na^+/H^+ -antiportera s nakople-niem $^{22}Na^+$ [Salt tolerance of barley: The relationship isoform expression vacuolar Na^+/H^+ -antiporter with accumulation of $^{22}Na^+$]. *Fiziologija Rastenij* 58(1), 28–39 (in Russian).
- Roblin, G., 1985. Analysis of the variation potential induced by wounding in plants. *Plant Cell Physiol.* 26, 255–261.
- Rinzel, J., Ermentrout, G.B., 1989. Analysis of neural excitability and oscillations. MIT Press, Cambridge, MA.
- Stankovic, B., Witters, D.L., Zawadzki, T., Davies, E., 1998. Action potentials and variation potentials in sunflower: An analysis of their relationships and distinguishing characteristics. *Physiol. Plantarum* 103, 51–58.
- Thiel, G., Homann, U., Plieth, C., 1997. Ion channel activity during the action potential in *Chara*: A new insight with new techniques. *J. Exp. Bot.* 48, 609–622.
- Thorsten, E.E., Rainer, M., Fromm, J., 2009. Heat-induced electrical signals affect cytoplasmic and apoplastic pH as well as photosynthesis during propagation through the maize leaf. *Plant Cell Environ.* 32, 319–326.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 53, 247–273.

Надійшла до редколегії 12.11.2013