

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ КЛЕТОЧНОГО ДЫХАНИЯ НА АВТОКОЛЕБАТЕЛЬНУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ПЛАЗМОДИЯ *Physarum polycephalum*

© 2016 г. Т.И. Авсиевич, С.В. Фролов, С.Г. Проскурин

Тамбовский государственный технический университет, 392032, Тамбов, ул. Мичуринская, 112д

E-mail: tavsievich@tamb.ru

Поступила в редакцию 22.04.15 г.

После доработки 15.09.15 г.

Представлены результаты спектрального анализа временных зависимостей возвратно-поступательного движения эндоплазмы в изолированном тяже плазмодия *Physarum polycephalum*, полученные методом лазерной доплеровской микроскопии после воздействия ингибиторов клеточного дыхания цианида калия и салицилгидроксамовой кислоты, вызывающих полную остановку движения эндоплазмы. Приведены результаты, подтверждающие наличие только двух, отличающихся по частоте в два раза ($\omega_2/\omega_1 = 1,972 \pm 0,028$), гармонических составляющих зависимостей скорости движения эндоплазмы в различных условиях: в благоприятных условиях (без воздействия ингибиторов дыхания), в частично обработанном ингибиторами тяже, на этапе восстановления колебательной активности после полной остановки движения эндоплазмы.

Ключевые слова: амебозное движение, плазмодий Physarum polycephalum, ингибиторы клеточного дыхания, автоколебательное движение, доплеровская анемометрия.

Для исследования автоволновых процессов в живых организмах часто используется слизевой гриб – миксомицет *Physarum polycephalum*, который в вегетативной форме представляет собой одноклеточный многоядерный плазмодий с амебозным типом миграционной подвижности [1]. Клетка плазмодия представляет собой сеть протоплазматических трубочек – тяжей, в каждом из которых наблюдаются возвратно-поступательные движения эндоплазмы [2]. Двигательная активность в тяжах *P. polycephalum* генерируется благодаря процессу построения и разрушения актин-миозиновых filamentарных комплексов и зависит от концентрации свободного Ca^{2+} [3–5]. Плазмодий способен двигаться по градиенту хемоаттрактантов и благоприятных условий влажности и освещенности [6]. Сокращение генерируется чувствительной к кальцию актомиозиновой системой, которая имеет аминокислотный состав, схожий с мышечными сократительными белками, *P. polycephalum* часто используется в качестве модельного объекта для исследования мышечных сокращений [7,8].

Локальные сжатия (сокращения) и последующие релаксации, возникающие в различных областях плазмодия, вызывают сложно органи-

зованное движение эндоплазмы. В общем случае такое поведение рассматривается как автоколебательная система, т.е. сократительная система плазмодия обладает колебательной активностью. Можно выделить три типа сокращений, которые в совокупности приводят к колебательному поведению эндоплазмы плазмодия: продольные сокращения, радиальные сокращения и собственный цитоплазматический ток. Исследования 70-х годов прошлого века показали, что эти колебания совпадают по фазе и задаются одним осциллятором [9]. При анализе сократительного ритма в 30 различных участках одного плазмодия была установлена высокая синхронность сокращений и сделан вывод о том, что плазмодий *P. polycephalum* представляет единую синхронизированную сократительную систему [10–12]. Плазмодий имеет продольную систему актомиозиновых фибрилл по внешней части трубочек и циркулярную систему, окружающую эндоплазматический канал. При сжатии средней части отдельно взятого тяжа происходит десинхронизации автоколебаний в обеих его частях до тех пор, пока ток эндоплазмы не будет восстановлен. При соединении протоплазматической массы двух отдельных тяжей также наблюдается синхронизация сокращений. Это может говорить о том, что синхронизация осуществляется с помощью потока

Сокращение: SHAM – салицилгидроксамовая кислота.

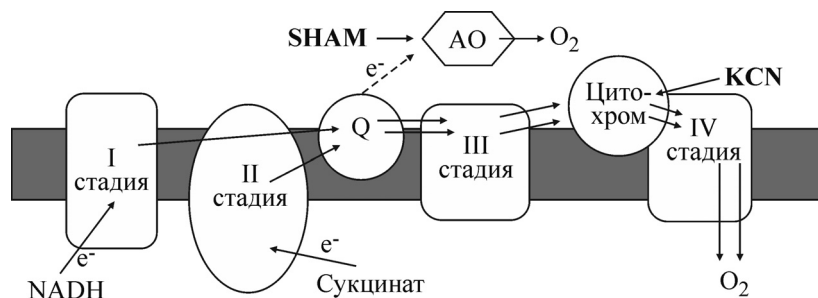


Рис. 1. Схема электрон-транспортной цепи митохондрий растений. I, II, III, IV – комплексы электрон-транспортной цепи с пунктами сопряжения, KCN – ингибитор цитохром *c*-оксидазы, SHAM – ингибитор альтернативной оксидазы [19].

эндоплазмы [13], однако природа этого явления до конца не изучена.

Согласно работе [14], колебания сократительной активности в плазмодии сопровождаются синхронными колебаниями мембранного потенциала. При исследовании корреляций колебаний, радиальной деформации, силы потока эндоплазмы и мембранного потенциала было установлено, что мембранный потенциал и радиальная деформация в любом участке тяжа колеблются синхронно и синфазно.

Подвижность плазмодия зависит от потребления кислорода – синтезируемые в процессе дыхания молекулы АТФ необходимы для генерации сокращений актомиозиновых молекул. Таким образом, воздействуя на процесс дыхания, можно оказывать влияние на двигательную активность эндоплазмы плазмодия.

При исследовании дыхательной активности плазмодия часто используется цианид калия – KCN [15]. Он, как известно, ингибирует активность фермента цитохром *c*-оксидазы в IV комплексе дыхательной цепи переноса электронов на внутренней мембране митохондрий. Механизм действия этого ингибитора заключается в способности цианид-аниона, вследствие химического сродства, связываться с Fe-Cu-центром в цитохром *c*-оксидазе, тем самым предотвращая восстановление кислорода с помощью электронов [16]. В результате клетки теряют способность усваивать кислород и аэробный синтез АТФ прекращается.

Многие простейшие организмы при воздействии неблагоприятных факторов, в том числе при воздействии KCN, способны активировать альтернативные пути клеточного дыхания, которые отделяются от основной дыхательной цепи на уровне убихинона [17]. Происходит это благодаря наличию специального фермента – альтернативной оксидазы, локализованного во внутренней мембране митохондрий и не чувствительного к цианиду [18]. Цианидрезистентная

альтернативная оксидаза катализирует перенос электронов от восстановленного убихинона (коэнзима Q) на кислород в обход основной цитохромной дыхательной цепи (рис. 1). Такой путь транспорта электронов имеет меньший выход АТФ по сравнению с переносом электронов по цитохромному пути. Продуктом восстановления кислорода цианидрезистентной оксидазой является вода, а не супероксид радикал или H_2O_2 .

Путем наблюдения за сокращениями плазмодия при воздействии ингибиторов дыхания на плазмодий с помощью тензометрических датчиков было показано, что в присутствии кетоглутарата (ключевой продукт цикла Кребса) не происходит остановки сократительной активности плазмодия [20]. В условиях, когда гликолиз и цитохромный путь ингибируются, кетоглутарат поддерживает осцилляции в тяжах, являясь единственным источником АТФ, чего не наблюдается в присутствии сукцината. Однако колебания прекращаются сразу же после воздействия салицилгидроксамовой кислоты (SHAM) [21]. Таким образом, кетоглутарат используется через цианидрезистентный путь дыхания, и количества АТФ, полученного через первый сайт фосфорилирования, достаточно для поддержания сократительной активности в норме. При обработке тяжа раствором, содержащим только SHAM, без KCN, не было зарегистрировано изменения колебаний.

Цианидрезистентное дыхание *P. polycephalum* также исследовали при воздействии цианида в зависимости от времени предварительного кислородного голодания [22]. В данном случае оценивалось воздействие KCN и SHAM непосредственно на процесс дыхания. Было показано, что ингибирование дыхания плазмодия KCN изменяет исходную скорость поглощения O_2 от 30 до 70%, в зависимости от времени предварительного кислородного голодания. Кинетика развития цианидрезистентного пути ды-

хания и его чувствительность к SHAM говорят о том, что цианидрезистентное дыхание отображает активность альтернативного пути транспорта электронов. Однако результатов, доказывающих, что во время голодания альтернативный путь дыхания активен при отсутствии цианида, получено не было. KCN полностью ингибирует процесс поглощения кислорода, однако не оказывает воздействия на сам процесс дыхания. Действует ингибитор почти мгновенно (за миллисекунды), что говорит о его способности быстро проникать внутрь клетки. При последующем добавлении SHAM всегда наблюдается резкая остановка дыхания, при этом не наблюдалось исключений из этого правила независимо от последовательности добавления ингибиторов.

Отдельно от цианида SHAM не оказывает влияния на скорость потребления кислорода в первые несколько минут. Тем не менее добавление цианида полностью прекращает дыхательную активность. Ингибирующий эффект SHAM происходит с задержкой, что может говорить о не прямой связи с ингибированием альтернативной оксидазы. Кинетика развития цианидрезистентного пути дыхания при воздействии KCN достигает ~30% в первые минуты и достигает максимума ~70% от начальной скорости поглощения кислорода. В случае с SHAM его уровень на протяжении всего времени остается относительно постоянным ~80%.

С помощью тензометрического датчика исследовались колебания плазмодия и при частичном воздействии ингибиторов, когда часть тяжа постепенно погружали в раствор, содержащий KCN и SHAM [23]. Колебания сохранялись даже тогда, когда длина погруженной части составляла 90% от длины тяжа. Полное погружение приводило к прекращению колебаний.

Исследование установления потока эндоплазмы между обработанной и необработанной частями тяжа тензометрическими методами [13] показало, что обработка ингибиторами одной части тяжа и искусственная остановка перетекания эндоплазмы между частями тяжа вызывает прекращение силовых колебаний вместе с сокращением и увеличением внутриклеточного давления. То же самое происходит и при полном погружении тяжа в раствор ингибиторов.

После восстановления тока эндоплазмы из обработанной половины тяжа в необработанную наблюдается снижение внутриклеточного давления наряду с монотонным увеличением изометрической силы [13]. Таким образом, увеличение внутриклеточного давления, вызванного дыхательными ингибиторами, не является

необходимым условием устойчивости сократительной активности.

Постоянный приток эндоплазмы в обработанную часть сопровождался увеличением генерируемой изометрической силы без колебаний. Восстановление эндоплазматического потока сопровождается появлением цикла сжатие–релаксация, несмотря на присутствие ингибиторов дыхания. Осцилляции не индуцировались при течении эндоплазмы из необработанной части в обработанную, следовательно, нет никаких факторов, которые бы могли переноситься эндоплазмой для создания колебаний. Обработанная часть, несмотря на отсутствие колебаний, остается активной системой. Таким образом, было сделано предположение о механической природе факторов, приводящих к синхронизации механо-химических осцилляций в плазмодии. Предполагается, что синхронизация колебаний между обработанной и необработанной частями происходит за счет механических сил периодического давления воздуха [13].

В работе [24] было показано, что прекращение сократительной активности плазмодия *P. polycephalum* при полном блокировании дыхания связано с возрастанием уровня цитоплазматического никотинамидадениндинуклеотида. Изменение отношения окисленной к восстановленной форме НАД⁺/НАДН может влиять на сократительную активность двумя способами. Либо через аденозиндифосфатрибозу, которая является сильным высвобождающим агентом ионов Ca²⁺, либо через НАД⁺-зависимые изменения в скорости продукции гликолитического аденозинтрифосфата.

Ранее, путем регистрации зависимостей скорости автоколебательного движения эндоплазмы в изолированном тяже плазмодия методом лазерной доплеровской микроскопии, удалось обнаружить две гармонические составляющие в зарегистрированных зависимостях скорости движения эндоплазмы [25]. Кроме того, показано, что частоты этих гармоник с хорошей точностью различаются ровно в два раза и характерны для изолированного тяжа плазмодия в нормальных условиях, а также при восстановлении двигательной активности после полной остановки движения эндоплазмы, вызванной обработкой ингибиторами клеточного дыхания KCN и SHAM.

В настоящей работе анализируется возвратно-поступательное движение эндоплазмы при добавлении ингибиторов клеточного дыхания и на этапе полного восстановления активности в буферном растворе после отмыва – удаления указанных ингибиторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод регистрации скорости двигательной активности эндоплазмы в тяже плазмодия с помощью знаочувствительного лазерного доплеровского микроскопа на базе люминесцентного микроскопа ЛЮАМ-Р1 основан на измерении доплеровского сдвига несущей частоты сигнала от движущейся частицы в составе эндоплазмы, который зависит от направления и скорости рассеивающих сигнал частиц.

Пучки излучения He-Ne-лазера (ЛГ-79-1) ($\lambda = 638,2$ нм, мощность $\approx 1-5$ мВт), пересекаясь внутри измеряемого объекта, образуют интерференционный объем 5 мкм^3 , который зависит от длины волны излучения, угла пересечения пучков и геометрии регистрирующей оптики. Движущиеся частицы, пересекая интерференционные полосы измерительного объема в перпендикулярном направлении, отражают и рассеивают свет, образуя доплеровский сдвиг, относительно несущей частоты в сигнале, который зависит от направления и скорости ее движения. Таким образом, знаочувствительная регистрация [27] и последующая компьютерная обработка последовательности доплеровских спектров позволяют получить временные зависимости скоростей в реальном режиме времени. Устройство регистрирует временную зависимость движения эндоплазмы в тяже плазмодия с точностью $\pm 0,5 \text{ мкм/с}$.

Плазмодий культивировали по стандартному методу на питательной подложке из 2% агарозного геля с овсяными хлопьями в чашке Петри, при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ в темном месте [28]. Когда плазмодий достигал размеров чашки Петри (около 10 см в диаметре), из целого миксомицета вырезали вместе с питательной средой тяж длиной 20 мм и диаметром около 0,2 мм, который помещали в измерительную кювету с площадью основания 20×10 мм из тонкого стекла, содержащую буферный раствор солей (1 мМ CaCl_2 , 2 мМ NaCl , 2 мМ KCl , 3 мМ MgCl_2 , рН $7,2 \pm 0,2$) для поддержания благоприятных условий функционирования плазмодия [13]. Восстановление колебаний в отрезке тяжа происходило в течение 15 мин после погружения в буферный раствор. Эксперименты проводили с использованием термостатирующей приставки, обеспечивающей постоянную температуру $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Измерение временных зависимостей скорости движения эндоплазмы $V(t)$ проводили в центре горизонтально ориентированного тяжа в среднем в течение 8 с (доплеровские спектры усреднялись по 2–10 измерениям, время нако-

пления каждого спектра составляло 0,8–1,6 с). Запись производили с четырехсекундным интервалом в течение 20 мин. Движение интерференционных полос происходит вдоль потока, расстояние между ними составляло $d = \lambda/2\sin(\alpha/2) = 1,08 \text{ мкм}$, а угол пересечения лучей $\alpha = 38^\circ$.

Процедура регистрации двигательной активности плазмодия включала несколько этапов. Первый эксперимент состоял в регистрации $V(t)$ в благоприятных условиях в течение 20 мин – без добавления ингибиторов в буферный раствор после помещения в него отрезка плазмодия. Затем в кювету добавляли ингибиторы (KCN – 5 мМ и SHAM – 7 мМ), вызывавшие полную остановку движения плазмодия в течение 5 мин. После этого изолированный тяж отмывали от раствора, содержащего ингибиторы, вновь помещали в буферный раствор солей и начинали регистрацию восстановления эндоплазматической подвижности в течение 20 мин [25].

В настоящем эксперименте кювету разделяли на две части тонкой (толщиной 0,5 мм) перегородкой из вазелина таким образом, что одна половина тяжа оставалась в одной части кюветы, а другая – в другой. Перегородка была необходима для того, чтобы при воздействии растворами в различных частях тяжа не было перетекания и перемешивания этих растворов. В одну часть кюветы заливали буферный раствор, а в другую тот же раствор, содержащий ингибиторы KCN и SHAM, после чего сразу же начинали регистрацию зависимости $V(t)$. Экспериментально было подтверждено (рис. 2), что присутствие перегородки никак не влияет на активность плазмодия. Регистрацию скорости производили в центре тяжа на границе между обработанной и необработанной частями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При помощи оконного преобразования Фурье выполнен спектральный анализ полученных в результате эксперимента временных зависимостей $V(t)$. На рис. 3а представлена зависимость скорости движения эндоплазмы от времени, измеренная в центре тяжа, одна часть которого заливалась буферным раствором, а другая раствором, содержащим ингибиторы. Зависимость, приведенная на рис. 3б, была получена через 30 мин после начала эксперимента и отражает полное восстановление автоколебательной активности плазмодия после удаления ингибиторов.

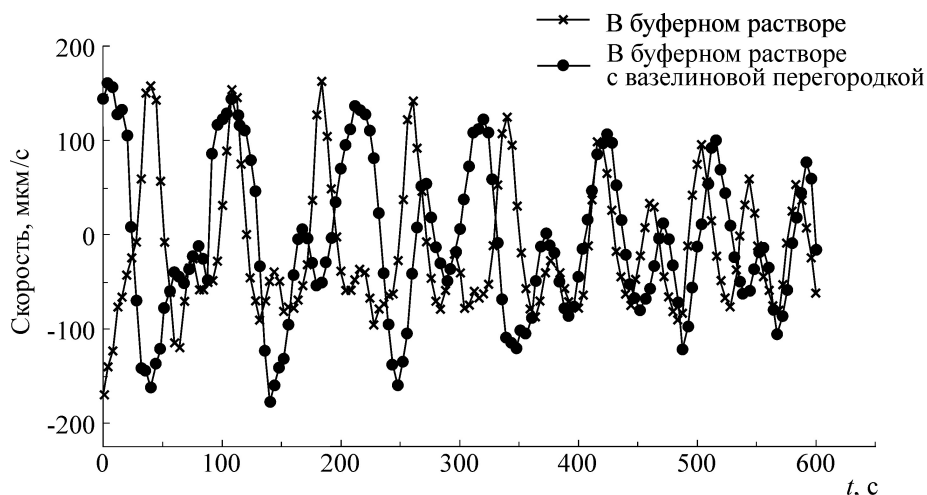


Рис. 2. Экспериментально полученные временные зависимости скорости движения эндоплазмы, $V(t)$, в буферном растворе солей и в том же растворе при наличии вазелиновой перегородки.

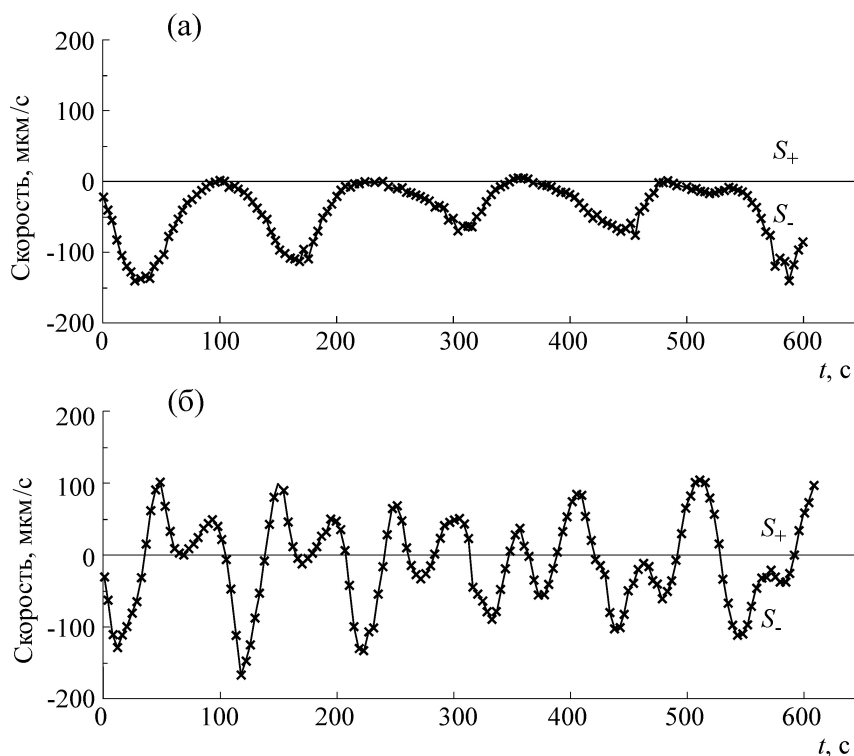


Рис. 3. Экспериментально полученные временные зависимости скорости движения эндоплазмы $V(t)$: (а) – в тяже, одна половина которого залита буфером, а вторая буфером, содержащим KCN и SHAM, (б) – через 30 мин на этапе восстановления колебаний плазмодия после удаления ингибиторов.

Зарегистрированные зависимости принципиально различаются, однако зависимость, полученная на этапе полного восстановления активности, схожа с ранее зарегистрированной зависимостью для тяжа в нормальных условиях в буферном растворе, что подтверждает возвращение системы к нормальному функциони-

рованию, аналогичному состоянию до обработки ингибиторами.

Знакопеременная регистрация скорости дает возможность количественно оценивать и направление миграции плазмодия как целого организма [27]. Сравнивая подынтегральные площади выше (S_+) и ниже (S_-) оси времени, можно сделать вывод о направленном движении в одну

либо в другую сторону в случае, когда $S_+ = S_-$, миграции не происходит. Для $V(t)$, полученной в первые минуты после добавления ингибиторов дыхания (рис. 3а), характерно движение эндоплазмы из обработанной части, т.е. измеряемая скорость отрицательна. Отношение подинтегральных площадей под кривой для первой зависимости составляет $S_-/S_+ = 6,6$, т.е. площадь ниже намного превосходит площадь выше оси абсцисс. На этапе восстановления активности (рис. 3б) соотношение площадей равно $S_-/S_+ = 1,4$. Через 15 мин после начала регистрации протоплазма начинала возвращаться в обработанную часть, вместе с этим восстанавливалась колебательная активность во всем тяже. Возможно, это происходит за счет некоторого неизвестного фактора, генерируемого в необработанной части плазмодия в ответ на частичное воздействие ингибиторов дыхания.

Для проверки вышеописанного предположения были использованы данные дополнительного эксперимента, в котором два одинаковых тяжа (длина 20 мм) помещали в одинаковые начальные условия – буферный раствор, но потом один из них заливали раствором KCN и SHAM сразу, а второй последовательно, с интервалом 15 мин – сначала одну половину тяжа, затем – другую. Таким образом, были уравнены условия, в которых находятся два тяжа. В результате были получены два отрезка тяжа плазмодия, находящихся в одинаковых условиях (в растворе ингибиторов). Однако в первом, который сразу заливали раствором ингибиторов, движение эндоплазмы не регистрировалось с точностью до $\pm 0,5$ мкм/с, а во втором, который заливали последовательно, гармонические осцилляции эндоплазмы сохранялись с частотой, близкой к $\omega = 0,01$ Гц и амплитудой порядка ± 100 мкм/с. В отрезке тяжа плазмодия, который сразу полностью заливали раствором ингибиторов, направленное движение не регистрировалось. Однако изменение интерференционной картины спеклов в области локализации измерительного объема было аналогично наблюдаемому в моменты остановки протоплазмы в обычных условиях. После отмывки изолированных тяжей – удаления раствора KCN и SHAM и замены его обычным буферным солевым раствором – обычное движение в них снова восстанавливалось. Различная последовательность добавления ингибиторов дыхания в кювету с плазмодием, при одинаковых начальных и конечных условиях, приводит к существенно отличающемуся поведению эндоплазмы.

Таким образом, можно сделать предположение, что при воздействии ингибиторов толь-

ко на часть тяжа необработанная часть тяжа играет роль стимулятора для поддержания колебаний в обработанной части. При этом, согласно работе [23], в эндоплазме плазмодия нет факторов, переносимых посредством диффузии для создания колебаний в других частях клетки.

Описанное поведение временных зависимостей скорости свидетельствует о том, что движение эндоплазмы в присутствии ингибиторов только в одной части плазмодия позволяет открыть какой-то новый путь фосфорилирования АТФ или запустить в действие гликолиз.

Период временной зависимости для тяжа в буфере без воздействий в среднем составляет $T_1 = 75$ с, после обработки ингибиторами с последующим их удалением в первые минуты восстановления активности $T_2 = 50$ с (гармоническое движение, превалирование первой гармоники в спектре), при этом движение эндоплазмы зафиксировано не было. Для зависимости, полученной для тяжа, одна половина которого была залита буферным раствором, а другая раствором, содержащим ингибиторы, период колебаний значительно увеличивается до $T_2 = 120$ с, что означает замедление движения. На этапе восстановления движения в буферном растворе период снова начинает уменьшаться $T_4 = 100$ с, возвращаясь к начальному значению. Относительно характеристик временной зависимости при добавлении KCN и SHAM, по сравнению с нормальными условиями, наблюдается увеличение периода колебаний, что соответствует результатам, полученным ранее [25], где фиксировалось увеличение амплитуды и замедление осцилляций. Однако по данным работы [10] частота осцилляции при ограничении кислорода не меняется. Предполагается, что вариации по частоте могут быть значительными, но они не зависят от того, в каких условиях находится организм – аэробных или анаэробных.

Спектральный анализ (оконное преобразование Фурье) временных зависимостей $V(t)$ проводили путем поочередного анализа участков длительностью 600 с (окон) со сдвигом 100 с, таким образом, для 20-минутной зависимости анализировалось 7 окон, по которым можно легко отследить происходящие изменения. Применение спектрального анализа к временным зависимостям скорости по сравнению с ранее полученными [25,26] показало, что, несмотря на существенные отличия в последовательности обработки ингибиторами дыхания, для них также характерно наличие двух ярко выраженных частотных пиков в спектрах $V(t)$ (рис. 4,5).

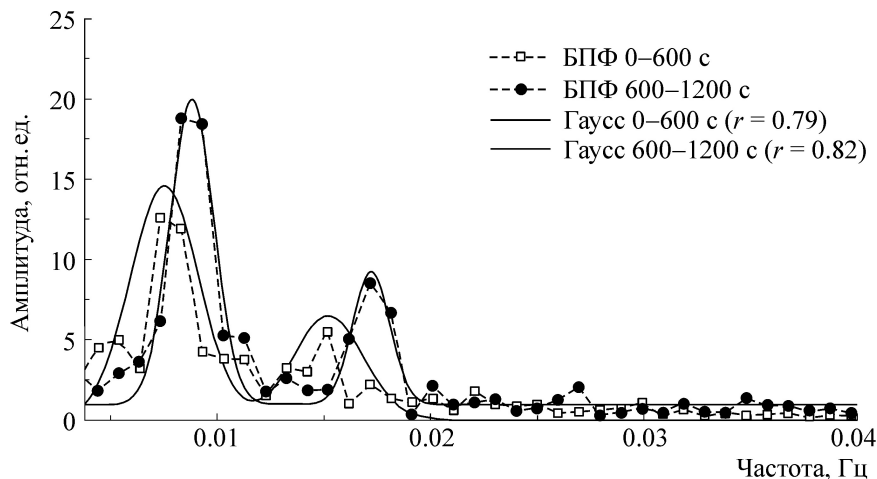


Рис. 4. Спектры мощности временной зависимости скорости движения эндоплазмы в тяжё, одна часть которого находится в буферном растворе, а другая в растворе, содержащем KCN и SHAM (см. рис. 3а). Символами обозначены полученные методом ОПФ значения частот участков длительностью 10 мин (с 0-й и с 10-й минуты). Сплошные линии – теоретическая подгонка при помощи распределений Гаусса (сумма гауссиан) с соответствующими коэффициентами корреляции Пирсона r .

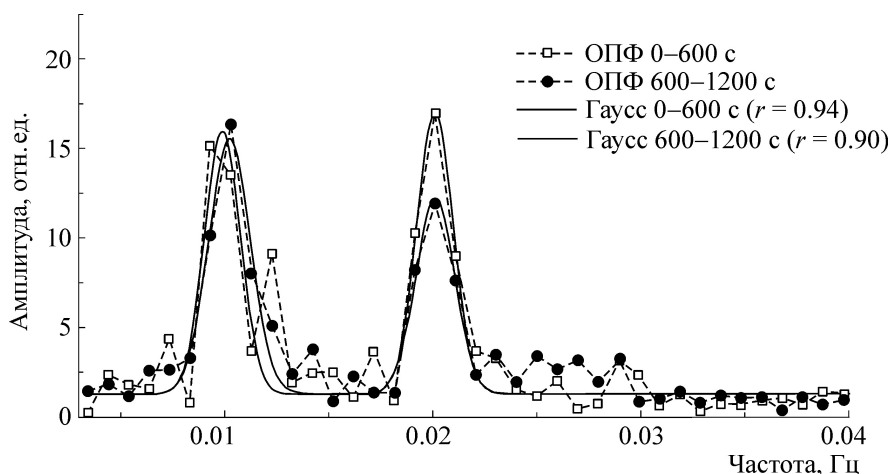


Рис. 5. Спектры мощности временной зависимости скорости движения эндоплазмы в буферном растворе на этапе восстановления активности после отмыва (рис. 3б). ОПФ – оконное преобразование Фурье, значения частот для участков длительностью 10 мин (с 0-й и с 10-й минуты). Сплошные линии – теоретическая подгонка при помощи распределения Гаусса с соответствующими коэффициентами корреляции Пирсона r .

Значения частот, соответствующих двум максимальным пикам частотного спектра временной зависимости для тяжё, одна из половин которого была залита раствором с ингибиторами (рис. 3а), составили соответственно $\omega_1 \pm \sigma = 0,0082 \pm 0,004$ и $\omega_2 \pm \sigma = 0,0161 \pm 0,0009$ Гц, где σ – соответствующее стандартное отклонение. Соотношение частот в пределах ошибки измерений (коэффициент вариации $V = 2\%$) примерно равно двум ($\omega_2/\omega_1 = 1,957$). Частоты сигнала во время полного восстановления активности плазмодия близки к значениям частот, полученных в буфере до обработки тяжё ($\omega_1 \pm \sigma = 0,01 \pm 0,0002$ и $\omega_2 \pm \sigma = 0,02 \pm 0,00006$ Гц

соответственно). Аналогичное отношение частот характерно и для этого сигнала $\omega_2/\omega_1 = 2,008$ с коэффициентом вариации $V = 1,7\%$. Следует отметить, что частоты в аналогичных условиях без воздействий в растворе буфера (первая зависимость и этап восстановления), имеют наиболее близкие значения, что говорит о том, что автоколебательная активность способна возвращаться к исходному состоянию, полностью восстанавливая миграционную активность. Значения частот гармоник временных зависимостей (рис. 3а,б) приведены в табл. 1.

Данные результаты свидетельствуют о присутствии двух гармонических осцилляторов в

Таблица 1. Частоты гармоник зависимостей скорости, полученной для тяжа, одна половина которого была залита буферным раствором, а вторая раствором, содержащим ингибиторы (рис. 3а и рис. 4)

		t, c	0-й	100-й	200-й	300-й	400-й	500-й	600-й
$V_1(t)$	Гармоника 1	ω_1	0,0077	0,0077	0,0078	0,0085	0,0085	0,0084	0,0085
	Гармоника 2	ω_2	0,0152	0,0151	0,0151	0,0161	0,0163	0,0169	0,0173
	$\omega_2/\omega_1 \pm 2\%$			1,9612	1,9683	1,938	1,8846	1,9100	2,0094
$V_2(t)$	Гармоника 1	ω_1	0,0097	0,0097	0,0099	0,0101	0,0101	0,0101	0,0102
	Гармоника 2	ω_2	0,0200	0,0199	0,0200	0,0201	0,0201	0,0199	0,0201
	$\omega_2/\omega_1 \pm 1,7\%$			2,0606	2,0535	2,0272	1,9856	1,998	1,9607

Примечание. $V_1(t)$ – первые минуты после добавления ингибиторов, и зависимости скорости для тяжа на этапе восстановления – $V_2(t)$.

Таблица 2. Амплитуды пиков с частотами ω_1 и ω_2 в спектрах для зависимостей: в буферном растворе до обработки KCN+SHAM – $V_1(t)$; через 10 мин после обработки KCN+SHAM – $V_2(t)$; одна часть плазмодия в буферном растворе, а другая в растворе KCN+SHAM – $V_3(t)$; плазмодий в буферном растворе и растворе KCN+SHAM через 30 мин – $V_4(t)$. См. рис. 3б и рис. 5

Амплитуда		$V_1(t)$	$V_2(t)$	$V_3(t)$	$V_4(t)$
0-я минута	A_1	$17,1 \pm 5,3$	$25,9 \pm 7,4$	$12,3 \pm 4,2$	$14,4 \pm 5,1$
	A_2	$12,4 \pm 3,6$	$3,6 \pm 1,1$	$5,6 \pm 1,6$	$17,1 \pm 4,7$
10-я минута	A_1	$19,6 \pm 6,9$	$14,8 \pm 3,8$	$19,5 \pm 5,1$	$16,1 \pm 4,9$
	A_2	$11,8 \pm 3,7$	$7,3 \pm 2,2$	$8,1 \pm 1,5$	$12,3 \pm 3,6$

каждом зарегистрированном сигнале, несмотря на различные условия при регистрации временных зависимостей скорости. Кроме этого, во всех случаях сохраняется постоянство отношения частот гармонических колебаний, присутствующих в зависимостях $V(t)$, которое для всех четырех случаев (усредненное значение) составляет $\omega_2/\omega_1 = 1,972 \pm 0,025$.

Количественное сравнение амплитуд полученных гармоник (A_i) показало их энергетическую связь. Максимальные значения амплитуд определялись по соответствующим максимумам пиков для каждого окна, а затем усреднялись для всего спектра. Как видно из частотного спектра, соответствующего зависимости скорости движения эндоплазмы в растворах, добавление ингибиторов оказывает влияние на оба частотных пика в первые минуты измерения $A_1 = 12,3 \pm 4,2$ отн. ед. и $A_2 = 5,6 \pm 1,6$ отн. ед. Через 10 мин картина существенно изменяется – амплитуда каждого из пиков возрастает до значений $A_1 = 19,5 \pm 5,1$ и $A_2 = 8,1 \pm 1,5$ отн. ед. В табл. 2 приведены значения амплитуд первой (A_1) и второй (A_2) гармоник частотного спектра и для всех имеющихся зависимостей в начале измерения – 0-я минута и через 10 мин после начала измерений – 10-я минута. Наблюдается связь между перераспре-

делением интенсивности соответствующих пиков в полученных спектрах – при уменьшении амплитуды первого пика амплитуда второго повышается. Это говорит об энергетической взаимозависимости источников, задающих гармонические колебания, внутренних осцилляторов.

Путем суммирования значений подынтегральных площадей пиков для всего частотного спектра (табл. 3) было выявлено, что суммарная мощность спектра в окне длительностью 600 с со 100-секундным сдвигом остается относительно постоянной в каждом из полученных спектров. Независимо от воздействия на плазмодий изменяется только соотношение амплитуд гармонических составляющих спектра.

На основе рассчитанных частот были смоделированы теоретические зависимости скорости движения эндоплазмы от времени [25]. Теоретическая зависимость является суммой гармонических составляющих, выделенных в экспериментальной зависимости с соответствующими частотами, амплитудами и фазами (рис. 6а,б).

$$V(t) = A_1(t)e^{i(\nu_1 t + \varphi_1)} + A_2(t)e^{i(\nu_2 t + \varphi_2)} \quad (1)$$

где $A_{1,2}$ – амплитуды гармоник, $\nu_{1,2}$ – соответствующие частоты и $\varphi_{1,2}$ – фазы гармоник.

Таблица 3. Суммарные мощности пиков частотных спектров для всех временных зависимостей $V(t)$

Зависимость	0-й	100-й	200-й	300-й	400-й	500-й	600-й	Среднее значение суммарной площади пиков, отн. ед.
$V_1(t)$	149,2	126,7	128,2	131,9	128,4	130,6	133,9	$132,7 \pm 7,7$
$V_2(t)$	157,3	159,8	161,3	159,8	164,9	162,1	159,6	$160,7 \pm 2,9$
$V_3(t)$	64,7	60,6	74,5	85,6	89,5	90,6	90,8	$79,5 \pm 12,8$
$V_4(t)$	109,2	110,1	105,9	98	99,3	100,6	98,5	$103,1 \pm 5,2$

Подгонка модельного сигнала зависимостей скорости (2) с учетом амплитуд, частот и фаз дала хорошее соответствие с измеренными величинами скорости, $V(t)$, в обоих случаях.

Рассчитанное значение критерий Пирсона составило $\chi^2 = 11,4$ на уровне значимости $\alpha = 0,05$, что свидетельствует о согласии теоретических и эмпирических данных. Таким образом, основной вклад в генерацию колебаний плазмодия вносят только две гармонические составляющие. Для более точного описания, возможно, не хватает дополнительных факторов, которые следовало бы учитывать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные временные зависимости $V(t)$ и их спектральный анализ при помощи окон-

ного преобразования Фурье показывают, что после обработки изолированного тяжа плазмодия ингибиторами клеточного дыхания KСN и SHAM колебательная система способна к полному восстановлению двигательной активности, при условии удаления ингибиторов и помещения плазмодия в благоприятные условия. Спектральный анализ временных зависимостей скорости движения эндоплазмы подтвердил наличие только двух гармонических составляющих, независимо от условий, в которых находился изолированный тяж плазмодия. Значения частот гармоник различаются, однако их отношение с хорошей точностью равно двум ($\omega_2/\omega_1 = 1,972 \pm 0,028$) и остается постоянным во всех измерениях, независимо от условий, в которых находился плазмодий (см. [25]). Это свидетельствует о наличии одного внутреннего

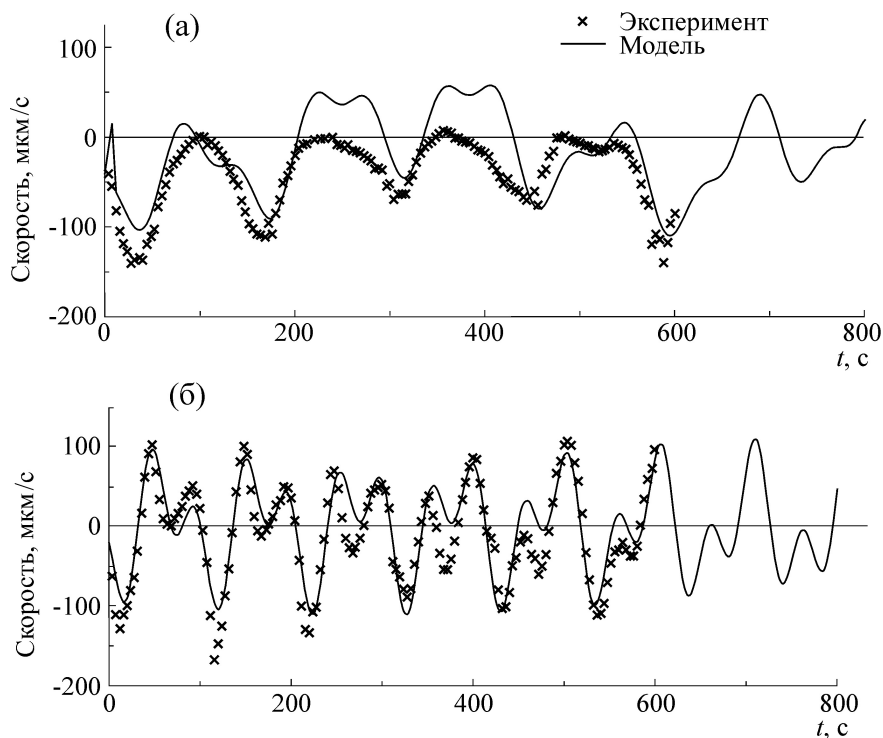


Рис. 6. Сравнение модели (сплошная жирная линия) с экспериментальными значениями (крестики) зависимостей $V(t)$: (а) – в центре тяжа, одна половина которого залита буфером, а вторая буфером, содержащим KСN и SHAM, (б) – через 30 мин на этапе восстановления колебаний плазмодия.

осциллятора [9], частота которого каким-то образом удваивается и сдвигается по фазе, либо двух типов осцилляторов, частоты которых отличаются ровно в два раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. W. Gawlitta, K. V. Wolf, H. U. Hoffmann, and W. Stockem, *Cell Tissue Res.* **209** (1), 71 (1980).
2. N. Kamiya, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**, 205 (1981).
3. G. F. Oster and G. M. Odell, *Cell Motil.* **4**, 469 (1984).
4. D. A. Smith and R. Saldana, *Biophys. J.* **61**, 368 (1992).
5. Ю. М. Романовский и В. А. Теплов, *Успехи физ. наук* **65** (5), 555 (1995).
6. Y. Miyake, S. Tabata, H. Murakami, et al., *Theor. Biol.* **178**, 341 (1996).
7. V. T. Nachmias and H. E. Huxley, *J. Mol. Biol.* **50** (1), 83 (1970).
8. S. Hatano and F. Oosawa, *J. Cell Physiol.* **68** (2), 197 (1966).
9. K. E. Wohlfarth-Bottermann, *J. Exp. Biol.* **81**, 15 (1979).
10. A. Grebecki and M. Moczon, *Protoplasma* **97**, 153 (1978).
11. W. Sachsenmaier and K. Hansen, in: *Biological and Biochemical Oscillators*, Ed. by B. Chance, et al. (Academic Press, New York, 1973), pp. 429–447.
12. В. А. Теплов, В. В. Митрофанов и Ю. М. Романовский, *Биофизика* **50** (4), 704 (2005).
13. Z. Baranowski and V. Teplov, *Cell Biol. Intern. Reports* **16** (11), 1091 (1992).
14. В. А. Теплов, С. И. Бейлина и Н. Б. Матвеева, *Тезисы II съезда биофизиков России* (М., 1999).
15. A. Rubo, R. Kellens, J. Reddy, et al., in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006).
16. M. Tsubaki, *Biochemistry* **32** (1), 164 (1993).
17. G. C. Vanlerberghe, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (4), 6805 (2013).
18. G. C. Vanlerberghe and L. McIntosh, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 703 (1997).
19. C. A. Robson and G. C. Vanlerberghe, *Plant Physiol.* **129**, 1908 (2002).
20. Z. Baranowski, *Cell Biol. Int. Rep.* **9** (1), 85 (1985).
21. H. T. K. Hoang, N. Akihiro, and A. Sakae, *Plant Prod Sci.* **8** (4), 383 (2005).
22. S. I. Beylina, B. Hrebenda, M. Cieslowska, and Z. Baranowska, *Cell Biol. Int. Rep.* **12** (1), 29, (1988).
23. A. Mazur and V. A. Teplov, *Acta Protozool.* **30**, 87 (1991).
24. V. A. Teplov, S. I. Beylina, N. B. Matveeva, et al., in: *Abstr. Book of Int. Symp. On Biological Motility, dedicated mem. acad. G. M. Frank (ONTI, Pushchino, 1994)*, pp. 227–228.
25. С. Г. Прокурин, Т. И. Авсиевич, *Биофизика* **59** (6), 1143 (2014).
26. Т. И. Авсиевич, К. Е. С. Ghaleb, S. V. Frolov, and S. G. Proskurin, *Proc. SPIE* **9448**, 94480H (2015).
27. Т. И. Авсиевич, С. В. Фролов и С. Г. Прокурин, *Оптика и спектроскопия* (в печати).
28. J. W. Daniel and H. H. Baldwin, in: *Methods in Cell Physiology*, Ed. by D. M. Prescott (Acad. Press, New York, 1964), Vol. 1, pp. 9–41.

Effect of Inhibitors of Cellular Respiration on Self-Oscillating Motility in *Physarum polycephalum* Plasmodium

T.I. Avsievich, S.V. Frolov, and S.G. Proskurin

*Department of Biomedical Engineering, Tambov State Technical University,
ul. Michurinskaya 112d, Tambov, 392032 Russia*

This work presents the results of the spectral analysis of the time dependences, $V(t)$, of endoplasmic shuttle motility in an isolated plasmodial strand of *Physarum polycephalum*, obtained by laser Doppler microscopy after exposure to inhibitors of cellular respiration, potassium cyanide and salicylhydroxamic acid, which lead to a complete cessation of endoplasmic motion. The results confirm the presence of only two harmonic components of $V(t)$ dependences with frequencies which differ by a factor of two, $\omega_2/\omega_1=1.972 \pm 0.028$, in different conditions: in normal conditions – without the addition of inhibitors; in the strand partially treated by inhibitors; in the phase of restoring the oscillatory activity after a full stop of endoplasm motion.

Key words: amoeboid movement, Physarum polycephalum plasmodium, inhibitors of cellular respiration, self-oscillating motility, Doppler anemometry