

## АВТОВОЛНОВАЯ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМОДИЯ *Physarum polycephalum*

© 2016 г. П.А. Григорьев, Н.Б. Матвеева\*, В.А. Теплов\*

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: vtep@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.16 г.

Целью работы являлось выяснение роли электрической активности плазмодия *Physarum polycephalum* в регуляции сократительной активности и самоорганизации направленной локомоции. Этот одноклеточный организм с невозбудимой мембраной является классическим объектом в исследованиях амебодной подвижности и имеет общие со многими тканевыми клетками закономерности двигательного поведения и сигнальные системы. Присутствие в агаровой подложке 50 мМ KCl под одной половиной отдельного плазмодиального тяжа сильно тормозит формирование фронтальной зоны и вызывает резкую морфологическую поляризацию тяжа, что предполагает участие электрических процессов в автоволновой самоорганизации структуры плазмодия. Гигантские размеры плазмодия позволяют регистрировать его электрическую активность одновременно в различных частях клетки. Установлено, что потенциалы и токи в удаленных друг от друга участках плазмодия колеблются синхронно, отличаясь только формой сигналов, вероятно, из-за различия фаз или числа возбужденных гармоник. Используя классическую технику локальной фиксации потенциала, мы записали токи (~50 пА) одиночных ионных каналов мембраны плазмодия. Обнаружено, что в спектре колебаний тока, генерируемого плазмодием, присутствуют высокочастотные флюктуации, которые, вероятно, связаны с периодическим откреплением мембраны от цитоскелета во время образования и роста псевдоподий. Также показано, что неомицин, субстратный ингибитор фосфолипазы C, останавливает колебания как механической, так и электрической активности плазмодия. Это соответствует его хорошо установленной способности ингибировать механически чувствительные Ca<sup>2+</sup>-каналы, которые, по-видимому, имеются в мембранах плазмодия. Полученные данные позволяют предполагать существование общих сигнальных систем, связанных с динамикой комплекса мембраны и цитоскелета, которые участвуют в гальвано- и хемотаксисах амебодных клеток.

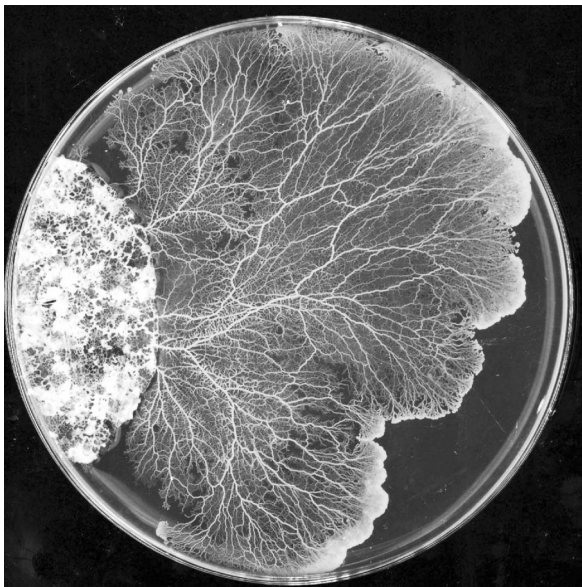
*Ключевые слова:* амебодная локомоция, автоколебания, регуляция, сократительная и электрическая активность, самоорганизация, плазмодий *Physarum polycephalum*.

Выяснение механизмов, лежащих в основе самоорганизации направленной миграции клеток, представляется важным из-за ее определяющей роли в процессах метастазирования опухолей и заживления ран, в иммунитете и морфогенезе, т.е. возникновении сложноорганизованных структур в процессе развития организмов. Нарушение способности к нормальным движениям и морфогенезу является одной из характерных черт трансформированных опухолевых клеток. Все вовлеченные в эти процессы клетки обладают амебодным типом подвижности, представляющим собой перемещения клеток по твердой поверхности с помощью временно образующихся на их поверхности вы-

ростов, называемых псевдоподиями (ложноножками). Для свободноживущих амебодных клеток способность к направленному движению по градиентам аттрактантов и репеллентов является основой их выживания. Хорошо известно, что амебам присущ гальванотаксис, и в поле постоянного тока они двигаются к катоду. Однако, несмотря на важность амебодной локомоции, механизмы, лежащие в основе всевозможных таксисов клеток, остаются во многом еще неизвестными.

Существенным элементом амебодной локомоции является интенсивное течение эндоплазмы в сторону перемещения. Для установления и поддержания таких потоков необходима высокая координация локальных сокращений по всему телу клетки, и возникает вопрос,

Сокращение: PIP<sub>2</sub> – фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат.



**Рис. 1.** Характерная полярная структура плазмодия, мигрирующего по поверхности агара. Диаметр чашки Петри – 19 см.

какие взаимодействия ответственны за такую координацию. Уникальные возможности для экспериментального выяснения этого вопроса предоставляет плазмодий миксомицета *Physarum polycephalum*. Этот одноклеточный организм с невозбудимой мембраной благодаря разобщению ядерного и клеточного деления способен при наличии пищи достигать гигантских размеров: толщины – двух миллиметров и площади – одного квадратного метра и более. Сократительный аппарат этой многоядерной клетки представляет собой локализованную в эктоплазме и прикрепленную к плазмалемме лабильную трехмерную сеть актиновых филаментов, в которой находятся биполярные олигомеры моторного белка – миозина. Сокращение такой микрофиламентной сети определяется фосфорилированием легких цепей миозина их киназами в присутствии ионов кальция  $Ca^{2+}$ .

Другим немаловажным атрибутом клеточной подвижности являются механохимические автоколебания, поскольку ни один сократительный аппарат не способен обеспечить перемещение организма на большие расстояния, не работая в колебательном режиме. Динамика плазмодия проявляется в ритмических пульсациях тела, основной период которых в зависимости от физиологического состояния клетки может находиться в диапазоне от 1 до 5 мин и меняется при рецепции внешних хемотактически активных стимулов [1–4]. Ритмические сокращения хорошо скоординированы вдоль тела плазмодия и вызывают интенсивные воз-

вратно-поступательные потоки эндоплазмы, которые обеспечивают не только внутриклеточное перемешивание, но также миграцию клетки. Она начинается при истощении в среде питательных веществ или появлении градиентов внешних стимулов и происходит вследствие того, что объем эндоплазмы, текущей в одном направлении, становится больше, чем в противоположном. При этом создается и поддерживается характерная полярная структура клетки в виде веерообразной пленки протоплазмы на фронте и следующей за ней древовидной сети протоплазматических трубок, называемых тяжами (рис. 1).

Колебания сократительной активности плазмодия сопровождаются синхронными колебаниями внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  [5,6], мембранного потенциала [7–11] и ряда других компонентов [12]. В настоящее время роль  $Ca^{2+}$  в регуляции сократительной активности хорошо установлена, однако значимость мембранного потенциала и его колебаний в координации двигательной активности амебоидной клетки до сих пор экспериментально не определена. Однако понятно, что изменения концентрации  $Ca^{2+}$ , регулирующие сократительную активность, происходят только благодаря изменениям проводимости ионных каналов, активности электрогенных ионных насосов и котранспорту в клеточных мембранах.

Колебания электрической активности плазмодия могут быть следствием функционирования самостоятельного мембранного осциллятора, который при наличии общих компонентов может быть синхронизирован с внутриклеточным. Однако в настоящее время никаких сведений о существовании такого осциллятора в амебоидных клетках нет. Для выяснения механизма его автоколебаний необходимо определить вольтамперные характеристики мембраны и выявить нелинейные процессы, приводящие к колебательной неустойчивости мембранного потенциала. Причиной электрических колебаний может быть также наличие механочувствительных ионных каналов в прикрепленных к цитоскелету мембранах. Поскольку их проводимость зависит от механического напряжения, то колебания сократительной активности могут приводить к параметрическим колебаниям мембранного потенциала. В любом случае необходимо помнить, что плазмалемма выполняет важную функцию в модуляции сократительной активности при таксисах амебоидной клетки, поскольку реакция сократительной системы на аттрактанты происходит после их рецепции на внешней поверхности мембраны.

Основной трудностью в электрофизиологических исследованиях плазмодия миксомицета стандартными стеклянными микроэлектродами является быстрое формирование вокруг кончика микропипетки новой мембраны. Регистрируемая при проколе мембраны пиковая величина потенциала, достигающая  $-130$  мВ, через 5–10 с спадает до нуля, т.е. электрод оказывается вне клетки. Регенерация мембраны, а также наличие на ней постоянно возобновляемого слизевого чехла осложняют исследование ионных каналов плазмодиальной мембраны методом фиксации потенциала. Способность плазмодия быстро формировать новую мембрану была прослежена на каплях вытекшей эндоплазмы, которые образуются на поверхности крупных тяжей при их проколе стеклянной иглой и затем быстро желатинизируются [10,13,14]. Для предотвращения этих процессов в стеклянный микроэлектрод стали добавлять EGTA, что позволило регистрировать изменения мембранного потенциала при различных внешних воздействиях [15–18]. Уровень трансмембранного потенциала в плазмодии варьирует в диапазоне от  $-60$  до  $-130$  мВ и определяется главным образом активностью электрогенной протонной помпы, транспортирующей  $H^+$  из клетки, что объясняет чувствительность мембранного потенциала к рН среды [17,19,20].

Однако на плазмодии легко регистрировать колебания внеклеточной разности потенциалов. Разность поверхностных потенциалов обычно отводится с помощью неполяризующихся электродов от двух частей плазмодия, связанных между собой протоплазматическим тяжем и помещенных на KCl-содержащие агаровые подложки в разных электрически изолированных отделениях «двойной камеры» [8]. Уже в первых работах было обнаружено, что колебания поверхностного напряжения коррелируют с возвратно-поступательным (челночным) потоком эндоплазмы [7–9]. Частота колебаний совпадает с частотой челночного потока эндоплазмы, а амплитуда, способная достигать 30 мВ, не всегда коррелирует с амплитудой колебаний сократительной активности.

В отличие от работ, изучавших динамику поверхностных потенциалов, в работе [21] удалось с помощью вибрирующей стеклянной микропипетки [22] зарегистрировать экстраклеточные локальные ионные токи, плотность которых могла достигать  $15$  мкА/см<sup>2</sup>. На каплях эндоплазмы, вытекающих при проколе крупных тяжей, быстро образующих новую мембрану, было обнаружено, что ток всегда входил в местах ее многочисленных выпучиваний, а выходил из участков с гладкой поверхностью. В

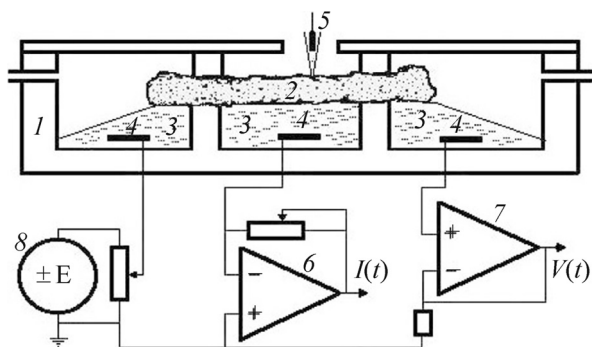
развивающихся из капель моноподиальных микроплазмодиях ток выходил как из фронтальной области, так и из втягивающего конца тяжа, а входил в его средней части. В этих частях амебоидных клеток обычно наблюдается заметная двигательная активность [2,4].

Однако наиболее яркое проявление автоволновой электрической активности плазмодия наблюдается в крупных плазмодиях [23,24]. Регистрируемые поверхностные потенциалы в разных частях плазмодия проявляют локальные синхронизированные колебания, аналогичные пульсациям сократительной активности [1,2,10,23]. В отличие от автоколебаний сократительной активности, механизмы колебаний мембранного потенциала в плазмодии миксомицета остаются до сих пор невыясненными. Цель данного экспериментального исследования состояла в получении дополнительных электрофизиологических данных о динамике потенциалов и токов в разных частях плазмалеммы с использованием техники локальной фиксации потенциала, что необходимо для установления механизма колебаний электрической активности плазмодия и выяснения их роли в регуляции сократительной активности амебоидных клеток и самоорганизации их направленной локомоции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмодий *Physarum polycephalum* (штамм ВКМ(F) 3283) выращивали в поверхностной культуре на подложке из 2% агарового геля с подкормкой овсяными хлопьями. В экспериментах, проводимых при 20–22°C, были использованы фрагменты изолированных протоплазматических тяжей длиной 4–6 см и диаметром 0,4–0,8 мм, вырезанные из плазмодия через 12–18 ч после его последней подкормки. Любые вырезанные из плазмодия фрагменты в течение нескольких секунд в местах повреждений восстанавливают целостность наружной мембраны и в дальнейшем ведут себя как самостоятельный организм, возобновляя через 15–30 мин колебания сократительной активности. Внешнее проявление механической активности тяжа определяется граничными условиями.

Если тяж оставить лежать прикрепленным к подложке, что практически исключает его продольную деформацию, то вдоль него устанавливается стоячая волна радиальной деформации с пучностями колебаний на концах тяжа и возникает интенсивный возвратно-поступательный поток эндоплазмы, которые хорошо воспроизводит наша распределенная математическая модель [25,26]. Если же фрагмент тяжа



**Рис. 2.** Блок-схема установки для измерения электрической активности плазмодия: 1 – экспериментальная камера, 2 – плазмодийный тяж, 3 – агар, 4 – неполяризующие электроды, 5 – стеклянная микропипетка-электрод для записи токов одиночных ионных каналов плазмалеммы, 6 – операционный усилитель для измерения тока, 7 – операционный усилитель для измерения напряжения, 8 – источник постоянного напряжения, для компенсации электродных потенциалов и получения вольт-амперных характеристик мембраны.

вертикально подвесить во влажной атмосфере с некоторой нагрузкой на конце, то в нем устанавливаются продольные изотонические автоколебания с амплитудой, иногда достигающей 10% его длины. В случае если фрагмент тяжа закрепить между крючками тензодатчика, то в изометрическом режиме сокращения, когда расстояние между крючками, т. е. длина тяжа, практически не изменяется, можно регистрировать колебания развиваемой тяжом силы натяжения. Эти колебания продольной динамики изолированного тяжа в обоих режимах регистрации можно даже количественно симулировать с помощью построенной нами математической модели [27]. С течением времени концы тяжа развиваются в новые фронтальные области. Позже один из конкурирующих фронтов становится ведущим, второй фронт вырождается и возникает характерная полярная форма мигрирующего плазмодия.

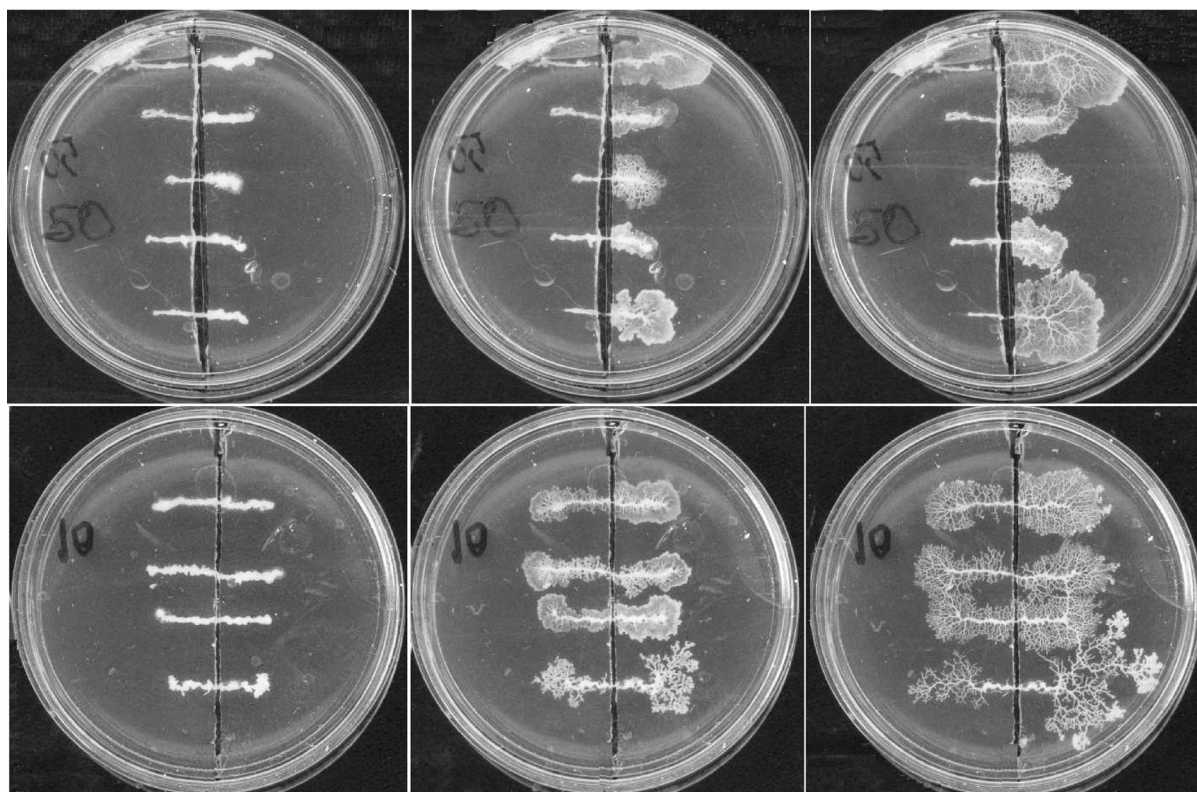
В данной работе продольную динамику тяжа регистрировали в изометрическом режиме с помощью высокочувствительной установки [28]. Чувствительность датчика силы составляет 0,2 мг, податливость – 0,1 мкм/мг, динамический диапазон – 50 мг. В качестве интерфейса между датчиком и компьютером использована плата сбора данных, имеющая в своем составе 8-канальный 12-разрядный АЦП, 12-разрядный ЦАП и 16 цифровых каналов ввода-вывода. Для функционирования системы разработано соответствующее программное обеспечение. Установка позволяет поддерживать заданное изменение во времени либо длины объекта, либо

нагрузки, измеряя в качестве ответа соответственно силу натяжения объекта или его деформацию. Тяж прикрепляли к крючкам тензиометра в горизонтальном направлении с помощью теплого расплавленного агара и погружали в кювету с контрольным 10 мМ раствором NEPES, pH 7,0.

Электрическую активность плазмодия регистрировали с помощью установки, блок-схема которой приведена на рис. 2. Установка позволяет измерять генерируемый плазмодием ток с чувствительностью около 10 пА и разрешением по времени до  $10^{-3}$  с, а напряжение – с чувствительностью 0,1 мВ. Для этого использовали два электрометрических операционных усилителя К544УД1А с высоким входным сопротивлением и малым уровнем входных токов. Первый (6 на рис. 2), включенный по схеме преобразователя ток-напряжение, использовался для измерения тока, а второй (7 на рис. 2), включенный по схеме повторителя напряжения, регистрировал напряжение. Источник постоянного напряжения (8) использовали для компенсации контактных потенциалов электродов и построения вольт-амперных характеристик плазмалеммы. В установке использовалось программное обеспечение (J. Demster, *Strathclyde Electrophysiological Software Win EDR 3.2.2*), а в качестве интерфейса между датчиками и компьютером служил АЦП NI USB-6009.

Для одновременной регистрации электрической активности разных частей плазмодия была изготовлена камера (1 на рис. 2), имеющая три отсека. В них наливали разогретый 2%-й агар (3), содержащий 5 мМ KCl, так, чтобы он покрывал неполяризующиеся хлорсеребряные электроды (4), установленные в отсеках. В перегородках между отсеками были прорезаны узкие (шириной 1 мм) канавки, которые заполняли вазелином, используемым в качестве герметика и электрического изолятора. В эти канавки плотно помещали плазмодийный тяж (2) так, чтобы он соприкасался с находящимся в отсеках агаром. Сопротивление между ближайшими отсеками с лежащим тяжом составляло около 0,5 МОм.

Для регистрации токов одиночных каналов в режиме фиксации потенциала применяли стеклянные микропипетки-электроды (5) с диаметром кончика около 2 мкм [29]. Запись можно производить с любого участка верхней поверхности тяжа с помощью установленных в микроманипулятор микропипеток. Референтным электродом мог служить любой из установленных в отсеках камер. В микропипетки не добавляли EGTA, так как они не вводились внутрь клетки, а только касалась ее поверхно-



**Рис. 3.** Структурная поляризация фрагментов плазмодиальных тяжей при разных ступенчатых градиентах KCl. Фотографии сделаны соответственно на третьем, четвертом и пятом часу после помещения изолированных фрагментов тяжей в чашку Петри перпендикулярно границе между агаром слева, содержащим 50 мМ KCl (верхний ряд) или 10 мМ KCl (нижний ряд), и агаром без KCl справа. В агаре 10 мМ HEPES, pH 4,6, 0,1 мМ Ca<sup>2+</sup>. Диаметр чашек Петри – 3,5 см.

сти. Это сочетает в себе преимущества высокой степени пространственного разрешения и не приводит к нарушению целостности мембраны. Микропипетки заполняли разогретым агаром, содержащим 10 мМ KCl. Как показано на рис. 3, эта концентрация электролита не оказывает сильного воздействия на плазмодий, по сравнению с концентрациями в 50 мМ и выше. Сопротивление микропипеток составляло около 10 МОм, а потенциал был менее 10 мВ.

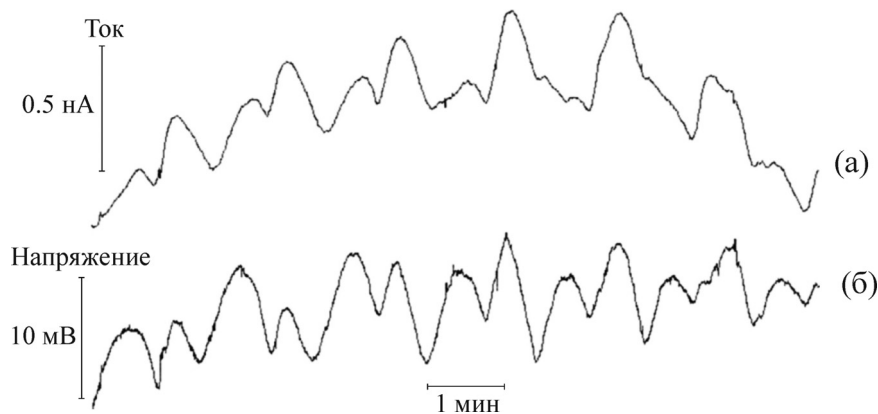
В работе использовали: HEPES и неомицин сульфат (Sigma, США). В ходе эксперимента растворы неомицина в HEPES, pH 7,0 готовили непосредственно перед обработкой плазмодия из-за довольно быстрой потери активности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

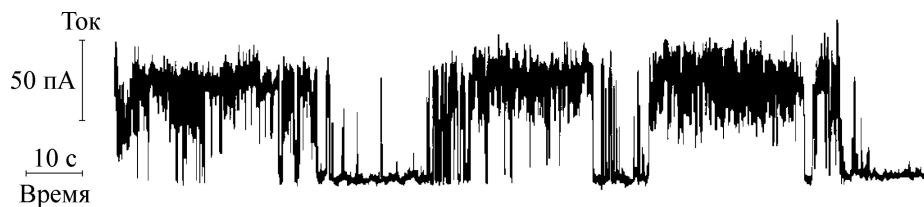
Как можно видеть из верхнего ряда фотографий на рис. 3, присутствие 50 мМ KCl в агаровой подложке слева под одной половиной тяжа сильно тормозит образование фронтальной области и вызывает резкую структурную поляризацию тяжа, что может свидетельствовать об участии электрических процессов в ре-

гуляции подвижности плазмодия и его структурной самоорганизации. Фотографии сделаны соответственно на третьем, четвертом и пятом часу после изоляции и помещения тяжей в чашку Петри перпендикулярно границе между агаром слева, содержащим 50 мМ KCl (верхний ряд) или 10 мМ KCl (нижний ряд), и агаром без KCl справа. В агаре присутствовали: 10 мМ HEPES, pH 4,6, 0,1 мМ Ca<sup>2+</sup>. Действие 10 мМ KCl проявляется значительно слабее, поэтому мы использовали эту концентрацию электролита в стеклянных микроэлектродах. На фотографиях также хорошо видно образование новых фронтов с формированием сети тяжей и последующее слияние плазмодиев при их встрече, что, как известно, приводит к установлению общего потока эндоплазмы, глобально координирующего автоволновую сократительную активность плазмодия.

Характеристики измеряемой электрической активности плазмодия варьируют в зависимости от состояния плазмодия и используемой экспериментальной техники [30]. Однако экстраклеточный метод измерений потенциалов имеет свои преимущества, так как в этом случае



**Рис. 4.** Одновременная запись колебаний тока (а) и напряжения (б), генерируемых изолированным тяжем в разных отсеках тройной камеры.



**Рис. 5.** Запись тока одиночного ионного канала плазмалеммы плазмодия, где четко видны два его состояния: закрытое (ему соответствует нулевой ток) и открытое (ему соответствует ток  $\sim 50$  пА). Канал время от времени спонтанно переходит из одного состояния в другое, промежуточных состояний нет.

не происходит нарушения мембраны стеклянным микроэлектродом и, таким образом, исключается влияние проколов на работу сократительного аппарата. При большом входном сопротивлении регистрирующего усилителя разность поверхностных потенциалов между различными частями тяжа отражает разность их трансмембранных потенциалов. Амплитуда колебаний этого напряжения в наших экспериментах достигала 30 мВ. Используя преимущества гигантских размеров плазмодия, мы одновременно могли исследовать электрическую активность в различных частях клетки. Типичный пример одновременной записи тока и напряжения, генерируемых тяжом в разных отсеках тройной камеры, показан на рис. 4. В этом случае кинетику тока (рис. 4а) регистрировали между первым и вторым отсеками тройной камеры, а напряжения (рис. 4б) – между первым и третьим. Видно, что колебания значений этих параметров в удаленных друг от друга частях клетки следуют синхронно, но с различными формами осциллограмм. Это, вероятно, происходит из-за различия фаз или числа возбужденных высших гармоник. Обнаружено, что в спектре колебаний тока, генерируемого плазмодием, присутствуют высокочастотные флуктуации, которые, вероятно, связаны с периоди-

ческим откреплением мембраны от цитоскелета на вершине псевдоподии во время ее образования и роста, как это происходит в амебоидных клетках при пульсациях с периодом 10 с [31]. На рис. 5 показана запись токов одиночных каналов плазмалеммы плазмодия, на которой четко видны два состояния канала: закрытое (ему соответствует нулевой ток) и открытое (ему соответствует ток  $\sim 50$  пА). Канал время от времени спонтанно переходит из одного состояния в другое, промежуточных состояний нет.

Ранее нами было установлено, что одним из ключевых регуляторов плазмодиального осциллятора, как и в большинстве клеток эукариотов [32], является фосфолипаза С. Субстратный ингибитор фосфолипазы С – шестивалентный поликатионный аминокликозид неомицин – с высоким сродством связывает фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат ( $\text{PIP}_2$ ), образуя электронейтральный комплекс [33], и таким образом блокирует связывание  $\text{PIP}_2$  с фосфолипазой С. Было показано, что  $\text{PIP}_2$ , регулирующее состояние актина плазмодия [34–36], является местом связывания неомицина и основным элементом, связывающим кортикальный цитоскелет плазмодия с мембраной [37].

На рис. 6 показана остановка автоколебаний сократительной (а) и электрической (б) активности плазмодия, вызванная 5 мМ неомицином при рН 7,0. Это соответствует его хорошо установленной способности ингибировать механочувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы. Ранее мы выяснили, что эффективность неомицина резко возрастает при увеличении рН среды [38], что, вероятно, определяется сильной рН-зависимостью мембранного потенциала плазмодия, возрастающего от  $-50$  мВ при рН 5,0 до  $-120$  мВ при рН 7,0 [39]. Градиент потенциала на мембране, безусловно, важен для проникновения неомицина к мишени, локализованной на цитоплазматической поверхности плазмалеммы. Концентрация неомицина, останавливающая автоколебания в плазмодии, снижалась от 3–5 мМ при оптимальном для культивирования плазмодия рН 4,6 [37] до 100 мкМ при рН 7,0 [38].

Реакция плазмодия на добавление неомицина сопровождается характерным для блокирующих  $\text{PIP}_2$  агентов появлением заполненных гиалоплазмой вздутых мембраны, что связано с ее локальными отслоениями от кортикального цитоскелета. Это также указывает на то, что главной мишенью ингибитора является  $\text{PIP}_2$ . После возобновления автоколебаний мембранные пузыри заполнялись протоплазмой. Связывание  $\text{PIP}_2$  неомицином стимулирует, как показано на препаратах сарколеммы сердечных клеток, активность фосфатидилинозит-5-киназы, фермента, катализирующего продукцию  $\text{PIP}_2$  [40]. Полученные результаты могут свидетельствовать о наличии механочувствительных каналов на мембране и позволяют предположить существование одних общих сигнальных систем, связанных с функционированием комплекса цитоскелета и мембраны, которые участвуют в гальвано- и хемотаксисах амебодидных клеток.

Наличие обратных связей, регулирующих активность фосфоинозитидов, позволяет предположить возможность колебательных изменений уровня  $\text{PIP}_2$ . На миксомицетах, как и на клетках млекопитающих [41],  $\text{PIP}_2$  и его метаболиты обладают всеми возможностями для контроля колебаний сократительной и электрической активности и управления направленным движением клеток. При существовании в мембранах плазмодия механочувствительных ионных каналов колебания электрической активности плазмодия можно объяснить в рамках нашей математической модели, которая количественно описывает наблюдаемые автоволновые сокращения эктоплазмы и челночные потоки эндоплазмы [25–27,42,43].

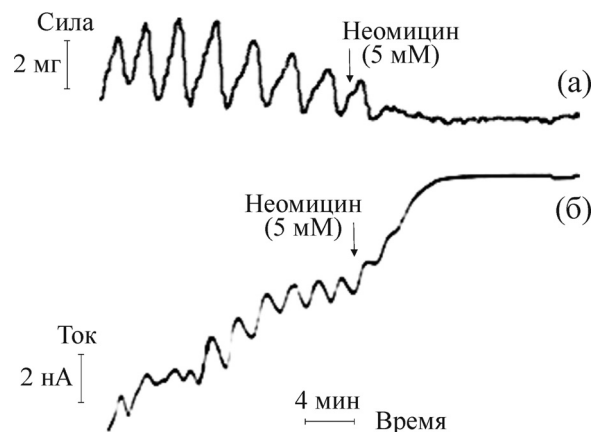


Рис. 6. Действие 5 мМ неомицина при рН 7,0 на колебания изометрической силы (а) и тока (б), генерируемые изолированными тяжами.

Основной гипотезой нашей базовой модели является предположение о существовании положительной обратной связи между деформацией цитоскелета и входом в актомиозиновую сеть ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , контролирующих, в свою очередь, активное сокращение и деформацию цитоскелета. В таком случае изменения мембранного потенциала будут пропорциональны деформации клетки. Это подтверждается тем фактом, что амплитуда колебаний потенциалов, точно так же, как и деформаций, существенно больше во фронтальной области плазмодия, чем в его тяжах. Согласно такой модели, колебания мембранных потенциалов будут глобально координироваться вдоль всего плазмодия за счет гидродинамических взаимодействий, и их можно также синхронизировать внешними периодическими воздействиями [44]. В недавней работе [11] авторы, используя кросскорреляционный анализ, доказали совпадение спектров частот колебаний электрического потенциала и перистальтических пульсаций в процессе их синхронизации при распространении плазмодия. Таким образом, корреляция между колебаниями разности поверхностных потенциалов и челночным потоком эндоплазмы, отмечаемая во многих работах, подтверждается статистически.

В заключение можно сказать, что трансплазмодиальный градиент электрического потенциала, поддерживающий распространение электрического тока через цитоплазму, объединяет распределенную систему плазмодия в единую энергетическую систему, в которой электрические характеристики цитоплазмы и внешней среды являются существенным фактором, определяющим ее пространственно-функциональную организацию. Таким образом, мы счи-

таем, что самоорганизация подвижности плазмодия основывается на закономерностях автоволновых процессов, причем важную роль в ней играют электрические и гидродинамические взаимодействия, регулирующие спонтанно возникающие сокращения цитоскелета.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. I. Beylina, et al., in *Self-organization. Autowaves and structures far from equilibrium*, Ed. V. I. Krinsky (Springer Verlag, New York, Berlin, 1984), pp. 218–221.
2. Yu. M. Romanovsky and V. A. Teplov, *Physics-Uspekh* **38** (5), 521 (1995).
3. S. I. Beylina, N. B. Matveeva and V. A. Teplov, *Biophysics* **41** (1), 137 (1996).
4. V. A. Teplov, S. I. Beylina and Yu. M. Romanovsky, *Russian J. Plant Physiol.* **45**, 139 (1998).
5. В. А. Теплов, Н. Б., Матвеева и В. П. Зинченко, в сб. *Биофизика живой клетки*, под ред. Г. М. Франка (НЦБИ АН СССР, Пушино, 1973), т. 4, сс. 110–116.
6. E. B. Rigway and A. C. H. Durham, *J. Cell Biol.* **69**, 223 (1976).
7. T. Iwamura, *Bot. Mag.* **62**, 126 (1949).
8. N. Kamiya and S. Abe, *J. Colloid Sci.* **5**, 149 (1950).
9. U. Kishimoto, *J. Gen. Physiol.* **41**, 1205 (1958).
10. R. P. Rhea, in *Dynamics of Fluids and Plasmas*, Eds. S. I. Pai et al. (Acad. Press, New York, 1966), pp. 35–58.
11. Y. Zheng et al., *BioSystems* **132–133**, 13 (2015).
12. N. Kamiya, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**, 205 (1981).
13. K. E. Wohlfarth-Bottermann and W. Stockem, *Wilhelm Roux' Archiv* **164**, 321 (1970).
14. G. Isenberg and K. E. Wohlfarth-Bottermann, *Cell Tissue Res.* **173**, 495 (1976).
15. K. E. Wohlfarth-Bottermann and K. Gotz von-Olenhusen, *Cell Biol. Intern. Rep.* **1**, 239 (1977).
16. R. Meyer and W. Stockem, *Cell Biol. Intern. Rep.* **3**, 321 (1979).
17. H. Kuroda and R. Kuroda, *J. Gen. Physiol.* **78**, 637 (1981).
18. J. Fingerle and D. Gradmann, *J. Membrane Biol.* **68**, 67 (1982).
19. N. B. Matveeva et al., *Acta Protozool.* **18**, 169 (1979).
20. M. Stegemann, et al., *Protoplasma* **141**, 83 (1987).
21. F. Achenbach and M. H. Weisenseel, *Cell Biol. Intern. Rep.* **5** (4), 375 (1981).
22. L. F. Jaffe and R. Nuccitelli, *J. Cell Biol.* **63**, 614 (1974).
23. A. Adamatzky and J. Jones, *Biophys. Rev. Lett.* **6**, 29 (2011).
24. S. Tsuda, et al., *IJNMC* **3** (2), 56 (2011).
25. V. A. Teplov, Yu. M. Romanovsky, and O. A. Latushkin, *BioSystems* **24**, 269 (1991).
26. V. A. Teplov et al., in *Nonlinear Dynamics and Structures in Biology and Medicine: Optical and Laser Technologies*, Ed. by V. V. Tuchin (Proc. SPIE, 1997), V. 3053, pp. 2–8.
27. V. A. Teplov, *Biophysics* **55** (6), 987 (2010).
28. F. E. Il'yasov, M. A. Morozov and V. A. Teplov, *Biophysics* **53** (6), 580 (2008).
29. B. Sakmann and E. Neher, in *Single Channel Recording* (Plenum Press, New York, 1983), pp. 41–42.
30. U. Acheubach and K. E. Wohlfarth-Bottermann, *Planta* **151**, 574 (1981).
31. A. Grebecki, *Intern. Rev. Cytology* **148**, 37 (1994).
32. M. J. Berridge and R. F. Irvine, *Nature* **315**, 321 (1984).
33. E. Gabev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **879**, 105 (1989).
34. J. Gettemans, et al., *J. Biol. Chem.* **270**, 2644 (1995).
35. V. De Corte, et al., *Eur. J. Biochem.* **241**, 901 (1996).
36. V. De Corte, J. Gettemans, and J. Vandekerckhove, *FEBS Lett.* **401**, 191 (1997).
37. Н. Б. Матвеева, С. И. Бейлина и В. А. Теплов, *Биол. мембраны* **23** (4), 306 (2006).
38. Н. Б. Матвеева и др., *Биофизика* **59** (5), 933 (2014).
39. R. Kuroda, et al., *Protoplasma Suppl.* **1**, 72 (1988).
40. E. Quist, N. Satumtira, and P. Powell, *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 21 (1989).
41. S. McLaughlin, et al., *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 151 (2002).
42. D. A. Pavlov, Yu. M. Romanovsky, and V. A. Teplov, *Biophysics* **41** (1), 153 (1996).
43. V. A. Teplov, et al., in *Dynamics of Cell and Tissue Motion*, Eds. W. Alt, A. Deutsch, and G. A. Dunn (Birkhaeuser, Basel, 1997), pp. 83–92.
44. V. A. Teplov, V. V. Mitrofanov, and Yu. M. Romanovsky, *Biophysics* **50** (4), 618 (2005).



## **Autowave Electromechanical Activity of the *Physarum polycephalum* Plasmodium**

**P.A. Grigoriev\*, N.B. Matveeva\*\*, and V.A. Teplov\*\***

*\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*\*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The aim of the work is to clarify the role of the electrical activity of the *Physarum polycephalum* plasmodium in control of the contractile activity and in self-organization of the directed locomotion. This single-celled organism with non-excitabile membrane is a classic object used in studies of amoeboid motility. It exhibits patterns of motile behavior common with many tissue cells and has the same signal systems. Presence of 50 mM KCl within the agar substrate under one half of the separate plasmodial strand strongly inhibits formation of the frontal zone and leads to the sharp morphological polarization of the strand what suggests participation of electrical processes in the autowave self-organization of the plasmodial structure. Gigantic sizes of the plasmodium allow registering its electrical activity simultaneously at different parts of the cell. It was established that potentials and currents at distant from each other parts of the plasmodium oscillate synchronously differing only in the shape of the signals, probably because of the distinction of phases or number of excited harmonics. Using the classical patch-clamp technique we recorded currents (~50 pA) of single ion channels of the plasmodial membrane. It was found that in the spectrum of current oscillations generated by the plasmodium there are high frequency fluctuations, which are probably connected with periodical detachments of membrane from cytoskeleton during formation and growth of pseudopodia. Also it was shown that neomycin, substrate inhibitor of phospholipase C, stops oscillations of both mechanical and electrical activity of plasmodia. This is consistent with its well-established ability to inhibit mechanosensitive Ca<sup>2+</sup> channels, which are apparently present in the plasmodial membranes. The data obtained suggest that common signal systems linked with dynamics of membrane-cytoskeleton association could be involved in the galvano- and chemo-taxis of amoeboid cells.

*Key words: amoeboid locomotion, auto-oscillations, regulation, contractile and electrical activity, self-organization, Physarum polycephalum plasmodium*