



К 20-летию кафедры ИЗОС

УДК 574.52, 556.115, 579.0, 576.5, 57.081, 57.084, 57.087

А. Н. Величко

Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина)

Анализ результатов исследования реакции термотаксиса *Paramecium caudatum*

*Рассматривается влияние температуры на двигательную активность инфузорий *Paramecium caudatum* при резком и медленном ее изменении. Показано, что взвесь инфуорий накапливается в диапазоне температур, близких к температуре культивирования клеток, а гиперполяризация мембраны приводит к увеличению скорости направленного плавания. Таким образом, при экстремально низких и высоких температурах механизмы терморегуляции инфузорий могут отличаться от тех, которые присутствуют при физиологических температурах. Проведенный литературный обзор позволил выявить научные исследования, в которых было изучено воздействие на термотаксис эффекта гипоксии, приводившего к движению популяции инфузорий в область низких температур.*

Термотаксис, водная среда, *Paramecium caudatum*, биотестирование

Термотаксис – это движение свободно передвигающихся растительных и животных организмов, вызываемое односторонним тепловым раздражением. Температура затрагивает все биологические процессы: равновесие, ферментативные реакции, сворачивание белков, темп роста и т. д.

Термотаксис – это хорошо известная индивидуальная приспособительная поведенческая реакция у многих живых организмов: простейших, гельминтов, насекомых, включая паразитических, и даже у новорожденных высших животных [1].

На данный момент большое внимание уделяется изучению термотаксиса инфузорий, особенно инфузории-туфельки – *Paramecium caudatum*. Свойство их популяционного приспособления к оптимальному диапазону температур за счет перемещения по тепловому градиенту использовано в методе Гертера и его разновидностях, основанных на принципе выявлении максимума распределения концентрации популяции по кювете диапазона при движении организмов в условиях искусственного созданного температурного градиента [2].

Цель данной статьи – систематизация и анализ данных результатов исследования термотаксиса

P. caudatum, полученных зарубежными учеными начиная с конца XVIII в. по настоящий момент.

Из работ немецкого ученого К. Мендельсона (1895, 1902) было известно, что *Paramecium* накапливаются в зонах с температурой, близкой к температуре их культивирования (оптимальная область температур) (Г. С. Дженнингс, 1906). Также было показано, что клетки увеличили свою поступательную скорость движения при перемещении в направлении их зоны оптимальной температуры (К. Тавада и Ф. Оосава, 1972). В отличие от этого, они демонстрируют частые изменения в направлении плавания при удалении от этой области (Я. Накаока и Ф. Оосава, 1977).

Исследуя накопления инфузорий в растворах различной вязкости и температурных градиентов, Тавада и Х. Миямото (1973) показали, что скорость изменения температуры вокруг образцов – важный аспект тепловой стимуляции, участвующий в возникновении накопления.

Хорошо известно, что движение посредством бьющихся ресничек в *Paramecium* находится под контролем мембранного потенциала на клеточной поверхности, т. е. гиперполяризация мембраны приводит к увеличению скорости направ-

ленного плавания (уклоняющий ответ), в результате увеличивается частота биений ресничек, в то время как деполяризация мембраны приводит к замедлению направленного курса плавания, изменению направления плавания или обратному плаванию (избегающий ответ) в результате инактивации и/или изменения направления биения ресничек (Р. Эккерт, 1972; Ю. Найто, 1974, 1982; Р. Макемер, 1975, 1988; Р. Макемер и А. Сугино, 1989). Эти наблюдения позволяют предположить, что возрастание градиента температуры образца вызовет гиперполяризацию мембраны, прежде чем он достигнет оптимальной области температур, и деполяризацию мембраны после прохождения через данную область. Другими словами, повышение температуры вызовет отклик мембранного потенциала, полярность которого будет зависеть от температуры вокруг клетки по отношению к оптимальной температуре. Ответ должен быть гиперполяризующим, если температура ниже оптимальной, и деполяризующим, если выше.

Ответы мембранного потенциала Paramecium тепловой стимуляции были зарегистрированы рядом авторов (Дж. Р. Хеннесси и др., 1983; Я. Накаока и др., 1987–1990) [3].

Методами электрофизиологии было показано, что при охлаждении и при нагреве среды с инфузорией была зафиксирована деполяризация мембраны.

Инфузории реагируют реакцией избегания на повышение температуры окружающей среды (так называемый общий тепловой стимул), когда клетки находились в области с температурой (θ_e), равной или выше, чем температура самой культуры (θ_c). Реакция была менее заметной при температуре среды, более низкой, чем температура культуры (рис. 1 и 2). На рис. 1 показана

реакция избегания (P_a) взвеси P.Caudatum, встречающих границы с более высокими температурами относительно низкой температуры среды (θ_e). P_a – это отношение числа образцов, которые не вошли в границы региона, к общему количеству образцов, встречающих границу.

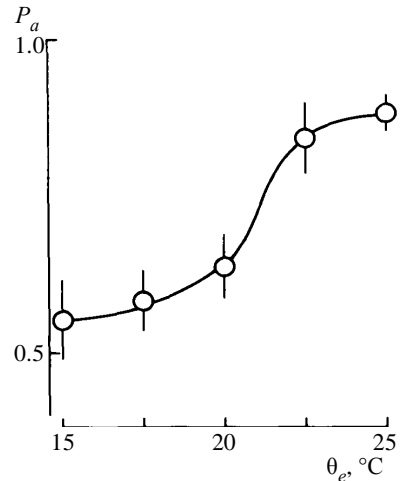


Рис. 1

На рис. 2 представлена реакция P.Caudatum на внезапное повышение температуры окружающей среды: а – 15 °С; б – 20 °С; в – 25 °С; г – 30 °С (v_s – скорость плавания; L – путь линейного плавания; F_t – превращающая частота).

Клетки реагируют на общий тепловой раздражитель с деполяризацией мембраны, когда температура среды была равна температуре культивирования или выше нее, но с гиперполяризацией мембраны при температуре среды ниже температуры культивирования (рис. 3). Подавление реакции избегания на более низких значениях температуры среды объясняется тем, что происходила реакция полярности мембранного потенциала.

Локализованный тепловой раздражитель, примененный к передней части клетки, всегда служил реагентом деполяризации мембраны. Тем не

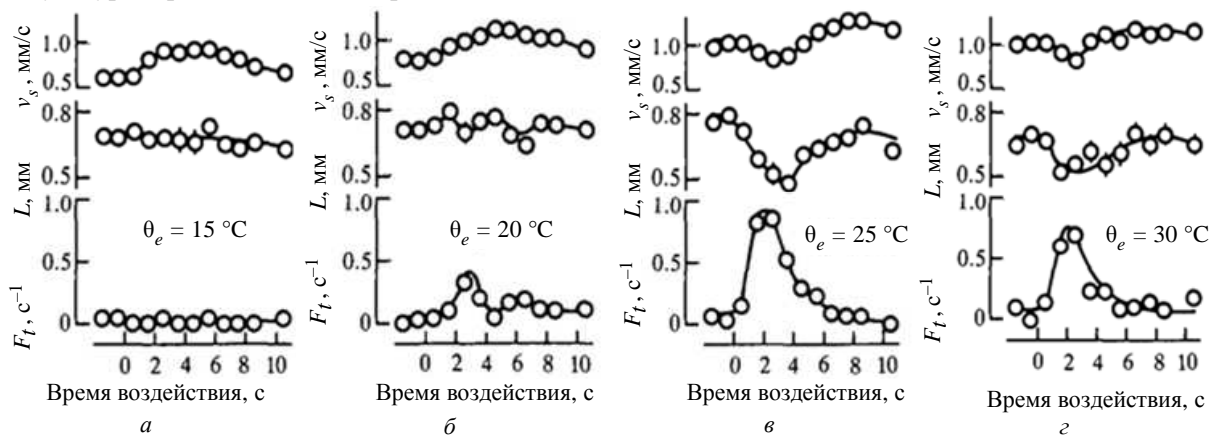


Рис. 2

менее, подобные стимулы, применяемые к задней области, деполяризуют мембрану при температуре среды, которая была равна температуре культуры или выше нее, но при гиперполяризации мембраны при температуре среды ниже, чем температура культуры.

Поскольку цитоплазма *Paramecium* практически изопотенциальна (Р. Эккерт и Ю. Найто, 1970), реакция мембранного потенциала взвеси к общему тепловому стимулу определяется проводимостью мембраны, изменения которой происходили в ее передней и задней частях. Когда температура среды ниже температуры культуры, деполяризация мембраны генерируется в передней части, уменьшаемой по амплитуде или преодолеваемой (обратно) по гиперполяризации мембраны, генерируемой в задней части [3].

Разность температур между двумя концами клетки настолько мала (менее 0.5 °С в температурном градиенте), что оба конца подвергаются практически одновременному повышению температуры (общей тепловой стимуляции). В связи с этим предполагается, что такое увеличение температуры в клетке произведет гиперполяризацию мембраны, прежде чем он достигнет области с температурой, равной температуре культуры, так как температура вокруг клетки ниже температуры культуры. Клетка продолжает (или даже ускоряет) плавание вперед в область более высоких температур, т. е. у клетки появляется реакция избегания.

Порог скорости нарастания температуры для вызова реакции мембранного потенциала был ниже для общей стимуляции, чем для локализованной стимуляции (см. рис. 1). Вся тепловая стимуляция затрагивает более широкую площадь мембраны в течение более длительного периода, чем локализованные возбуждения, что может быть возможной причиной нижнего порога срабатывания.

К. Мендельсон (1895, 1902) и Г. С. Дженнингс (1906) выяснили, что температура культуры *Paramecium* различалась в зависимости от уравновешенной температуры, при которой образцы ранее хранились в течение нескольких часов. Это означает, что температура, при которой реакции поляризации мембранного потенциала (изменение

температуры) меняется в соответствии с культурой температуры. Дж. Р. Хеннесси и Д. Л. Нельсон (1979) сообщили, что температурный порог для термического избегания у *Paramecium* меняется в соответствии с культурой температуры.

Гиперполяризующий ответ на общий тепловой стимул был замечен, когда температура среды была ниже температуры культуры независимо от первоначального значения. Это означает, что изменение температуры дает сдвиг по температуре культуры.

Результаты экспериментов показали, что *P. Caudatum* имеет активируемые теплом и холодом Ca^{2+} – ионные каналы с разной ионной селективностью и кальций-зависимой инактивацией. В результате притока Ca^{2+} повышается его внутренняя концентрация выше критического значения, вызывая временный разворот в направлении эффективного хода нескольких тысяч ресничек и разворот направления плавания, после чего происходит движение в новом направлении (Ю. Найто, 1968; Р. Экерт, 1972; Ч. Кунг и др., 1975; Д. Л. Нельсон и Ч. Кунг, 1978).

Естественная тенденция плыть вверх (отрицательный геотаксис) уравнивается тенденцией избегать теплых регионов, вторая тенденция доминирует.

При термических раздражителях инфузориитруфельки обнаруживают термотаксис. Наиболее благоприятная для их жизнедеятельности температура 24...28 °С, и если горизонтальную стеклянную трубку, в которой находятся инфузории, с одной стороны, подогревать до 30 °С, с другой – охлаждать до 10 °С, то все инфузории соберутся в том месте, где температура равна 27...28 °С [4].

Характеристики реакции инфузории на холод и тепло приведены в таблице.

Клетки *P. Caudatum* при восприятии холода или тепла в своем движении в жидкости увеличивают частоту прямолинейных движений. Увеличение частоты прямолинейных движений поддерживается во время нагрева среды, но очень кратковременно во время ее охлаждения. Электрофизиологические исследования показали, что фаза деполяризации – длительная при нагреве и

θ, °С	Деполяризация мембраны	Проницаемость ионных каналов	Блокирование ионного тока
Тепло	Длительная	Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}	Ni^{2+}
Холод	Кратковременная	Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}	Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}

краткая при охлаждении. Деполяризация исчезала или резко уменьшалась в среде, обедненной ионами Ca^{2+} . При введении электродов нагрев индуцировал длительный внутренний ток, когда ток ионов K^+ был подавлен. На ток, индуцированный теплом, не влияли эквимоллярные концентрации ионов Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} или Mn^{2+} , но он исчезал при добавлении эквимоллярной концентрации ионов Ni^{2+} . С другой стороны, индуцированный холодом внутренний ток мало зависел от концентрации ионов Ba^{2+} , Sr^{2+} , но спад внутреннего тока был малым или незначительным при добавке эквимоллярной концентрации ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} . Эти результаты показывают, что *P. caudatum* имеет активируемые теплом Ca^{2+} -ионные каналы и активируемые холодом Ca^{2+} -ионные каналы и что каналы, активируемые теплом, отличаются от активируемых холодом ионной селективностью и кальций-зависимой инактивацией.

Paramecium показывают способность перемещаться в зону предпочтительных температур. Механизмы ощущения температуры одноклеточными эволюционно передаются многоклеточным организмам. Современные исследования *Paramecium* показали, что различные ионные каналы включены в механизм термочувствительности так же, как кальциевые каналы – в реакцию на холод и тепло [3], [5]. Возможно, что температурный механизм связан с механорецепторами. Открытие температурно-чувствительных ионных каналов внесло вклад в исследование механизма клеточных ресничек. Были открыты термосенсорные медиаторы (простагландин I2) у *Paramecium*.

Концентрация внутриклеточного кальция была отражением реакции на холод. Охлаждение привело к незначительному увеличению ионов Ca^{2+} в передней части клетки [5].

Одноклеточные организмы обладают реакцией популяционного приспособления к оптимальному диапазону температур за счет перемещения по тепловому градиенту.

Г. М. Малвин и др. (1994) показали реакцию инфузорий на химический токсикант (NaN_3) в зависимости от предпочитаемой ими температуры. Так, к примеру, при воздействии азиды натрия (рис. 3) в концентрации 10 ммоль/л инфузории показали температурный оптимум в 10 °С.

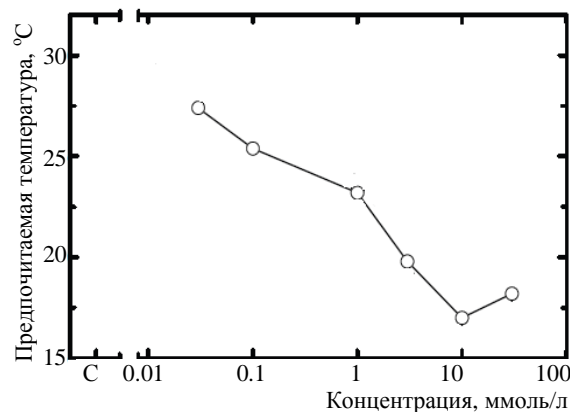


Рис. 3

Таким образом, можно сделать вывод, что одноклеточные выбирают зону оптимальных температур в зависимости от инфекций, гипоксии, ряда химических токсикантов, биохимических блокаторов метаболизма [6], [7].

Реакция *Paramecium caudatum* на резкие перепады температуры. Резкое изменение температуры увеличивает скорость взвеси. Высокая средняя скорость наблюдается сразу после изменения температуры, затем со временем она снижается экспоненциально, достигая стационарного значения, зависящего только от последующего изменения температуры (рис. 4). Данная реакция достигается, если взвесь *Paramecium* культивировали при 25 °С, а затем переносили в камеру под микроскопом, температура в которой поддерживалась равной 19.5 °С.

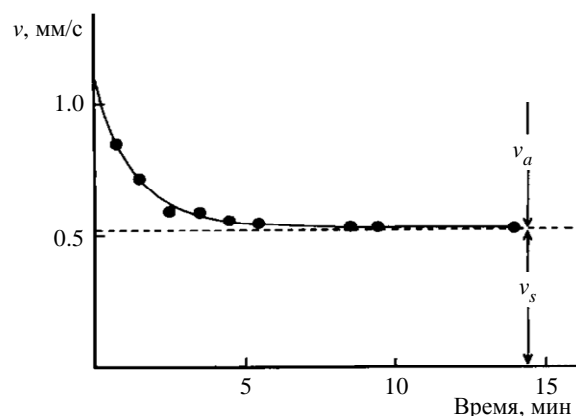


Рис. 4

Как показано на рис. 5, время изменения скорости выражается в виде

$$v(t, \theta) = v_s(\theta) + v_a(\theta) \exp(-t/\tau),$$

где v_s – постоянная скорость; v_a – скорость разгона и τ – время релаксации. Значение v_a определяется экстраполяцией кривой на рис. 5 от 0 до 5 мин.

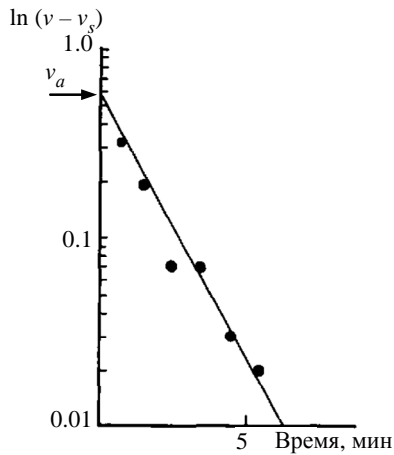


Рис. 5

Аналогичные эксперименты были проведены изменением температуры культуры от стационарной (25 °С) до различных температур. Результаты приведены на рис. 6, а. Устойчивая скорость v_X (1), скорость разгона v_a (2) и время релаксации τ (3) представлены как функции температуры. Температура раствора была изменена с 25 °С на большую или меньшую.

Время релаксации τ составляет около 1 мин, оно не зависит от температуры. Когда температура изменялась больше, чем на 1.5 °С, до высоких температур, или больше, чем на 4.5 °С, до низких температур, скорость увеличивалась, т. е. значение v_a было постоянным. *Paramecium* более чувствительны к высоким температурам, чем к низким.

Устойчивая скорость была максимальной при температуре 25 °С, при которой культивировались инфузории. Она уменьшилась при температуре свыше 25 °С. Это не было связано с необратимым повреждением инфузورий высокими температурами, так как устойчивая скорость возвра-

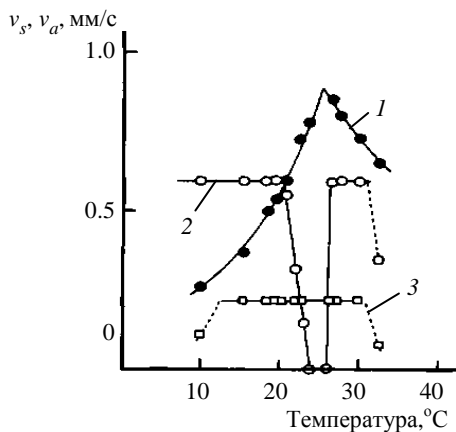
щается к исходному значению, когда температура возвращается к 25 °С. Скорость уменьшилась при снижении температуры до 25 °С.

Как показано на рис. 6, б, изменение логарифма постоянной скорости пропорционально $1/T$, где T – абсолютная температура по обе стороны температуры культуры [8].

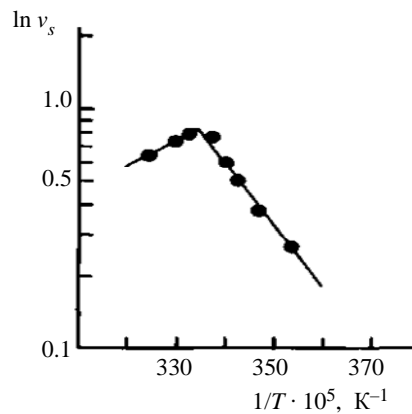
Реакция *Paramecium Caudatum* на постепенные перепады температуры. Температура одного конца клетки, подвергающейся постепенному перепаду (градиенту) температуры, постоянна (~25 °С), а критическая температура градиента при увеличенной вязкости измеряется при понижении температуры на другом конце клетки, а также при контроле скорости плавления инфузорий в середине клетки. Скорость взвеси была снижена с помощью увеличения вязкости, из-за чего получен более крутой критический градиент температур. Вязкость была увеличена за счет добавления метилцеллюлозы (4000 ф). Как показано на рис. 7, критический градиент температуры имеет линейную зависимость, обратную скорости плавления организмов (наклон 0.055 °С/с). Кривая 1 на рис. 7 – температура больше 33 °С, кривая 2 – температура меньше 10 °С.

Наклон 0.055 °С/с наблюдался и в контрольной группе.

Таким образом, порог чувствительности *Paramecium* к изменению температуры не зависит от вязкости раствора. Этот эксперимент исключает возможность обнаружения инфузориями разницы температур по всей длине. В противном случае критический градиент температуры будет зависеть от скорости взвеси.



а



б

Рис. 6

Два эксперимента, показанные на рис. 6 и 7, дают убедительные доказательства того, что инфузории обнаруживают изменения температуры при движении в оптимальном диапазоне температур, когда скорость изменения температуры >0.055 °C/с. При температуре ниже 10 °C или выше 33 °C *Paramecium* имеет достаточно высокую чувствительность к градиентам температур, как показано штриховой линией на рис. 7. В таких условиях очень хорошо видна реакция избегания инфузорий, которая наблюдается довольно редко в середине градиента температур.

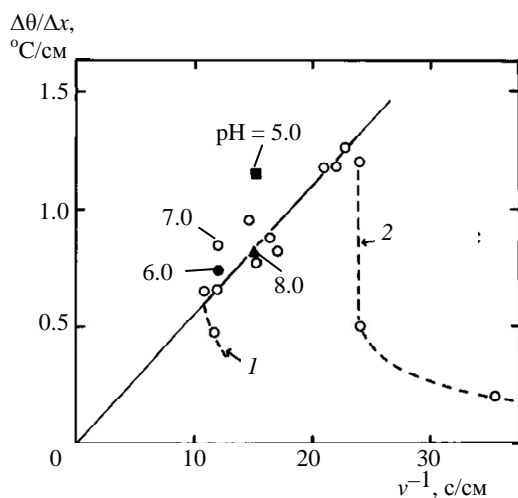


Рис. 7

На рис. 8 представлена зависимость критического температурного градиента от v^{-1} , где v – скорости плавания *Paramecium* при различной вязкости. Концентрация метилцеллюлозы (4000 сР) варьировала в диапазоне 0.015 % [9].

Таким образом, при экстремально низких и высоких температурах механизмы терморегуляции в *Paramecium* могут отличаться от тех, которые наблюдаются при физиологических температурах.

Проведенный литературный обзор позволил выявить научные исследования, в которых было изучено воздействие на термотаксис эффекта гипоксии, которая приводила популяцию инфузорий к движению в область низких температур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сунцов В. В., Сунцова Н. И. Происхождение и эволюция эпизоотической системы (экологические, географические и социальные аспекты). М.: Изд-во КМК, 2006. 247 с.
2. Herter K. Untersuchungen über den temperatursinn einiger insekten // Ausdem zoologischen Institut der Uni-

Кроме того, в работах [6], [7] обнаружена связь исследуемой тест-реакции с веществами-ингибиторами клеточного дыхания, что обусловило изучение литературы для обоснования выбора модельных токсикантов.

Однако современные исследования не вышли за границы лабораторных экспериментов, так как были длительными (более часа), технически сложными для реализации биотеста и приборной регистрации. Ранее формирование термотаксиса основывалось на эмпирических данных и теоретические основы создания тест-реакции на основе термотаксиса не были описаны. Существующие методы контроля опираются в основном на визуальные наблюдения при отсутствии количественных критериев тест-реакций.

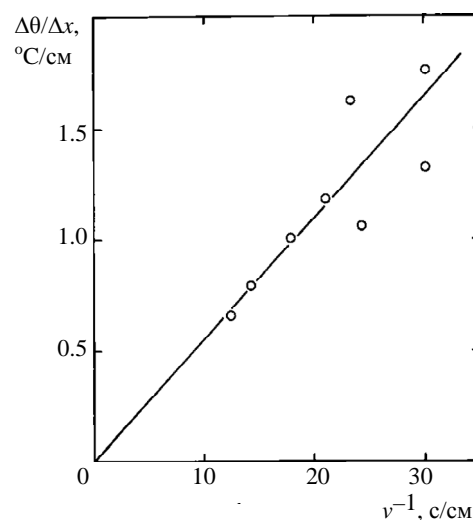


Рис. 8

При подготовке статьи были использованы материалы, собранные при работе в рамках проекта «Разработка биотехнической системы для экспресс-контроля токсичности водных сред на основе тест-реакции термотаксиса *P. Caudatum*» конкурсной программы «У.М.Н.И.К.» при финансировании Федерального государственного бюджетного учреждения «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере».

versitat GSttngen und dem zoologischen Institut der Universität Berlin. Germany, 1923. S. 221–288.

3. Tominaga T., Naitoh Y. Membrane potential responses to thermal stimulation and the control of thermoaccumulation in *paramecium caudatum* / Institute of

Biological Sciences, University of Tsukuba, Japan, 1992. P. 39–53.

4. Ладыгина-Котс Н. Н. Развитие психики в процессе эволюции организмов. М.: Советская наука, 1958.

5. Захаров И. С., Голядкин С. В. Перспективы применения термотаксиса микроорганизмов как тест-реакции для биотестовых систем // Изв. СПбГЭТУ «ЛЭТИ». 2008. № 9. С. 54–59.

6. Malvin G. M., Cecava N., Nelin L. D. Nitric Oxide Production and Thermoregulation in *Paramecium caudatum* // Intern. J. on Protistology. 2003. № 42. P. 259–267.

7. Gordon C. J. Temperature and toxicology: an integrative, comparative, and environmental approach. CRC Press, 2005. 289 P.

8. Tawada K., Oosawa F., Responses of *Paramecium* to temperature change // Protozoo. 1972. № 19. P. 53–57.

9. Tawada K., Miyamoto H. Sensitivity of *Paramecium* Thermotaxis to Temperature Change // Protozoo. 1973. № 20. P. 289–292.

A. N. Velichko

Saint Petersburg Electrotechnical University «LETI»

ANALYSIS OF THE REACTION RESULTS OF THE STUDY THERMOTAXIS *PARAMECIUM CAUDATUM*

*Deals with the effect of temperature on the motor activity of ciliates *Paramecium caudatum* under heavy and slow her change. It is shown that infuory slurry accumulates in temperatures close to the temperature of the cell culture and membrane hyperpolarization increases directional navigation speed. Thus, at extremely high and low temperatures, ciliates thermoregulation mechanisms may be different from those that are present at physiological temperatures. Conducted a literature review revealed the scientific studies that have been studied thermotaxis impact on the effect of hypoxia, which led to the movement of ciliates population to low temperatures.*

Thermotaxis, aqueous medium, *Paramecium caudatum*, bioassay

К 20-летию кафедры ИЗОС

УДК 535.247.4

С. С. Гринь, М. А. Турубанов, Т. В. Кустов

Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина)

Расчет характеристик и оптическая схема источника излучения для биотестового прибора

Описана разработка оптической схемы источника излучения измерительной системы для контроля биотестовых реакций. Проведен сравнительный анализ трех основных оптических схем, которые применяются в фотометрических системах. В работе также приведено обоснование выбора одной из оптических схем, позволяющей получить максимально возможный параллельный световой пучок, учитывая предполагаемые габариты измерительной системы, а также получения на выходе кюветы максимальной четкой контрастной картины.

Угол дифракционного рассеяния вперед, инфузории, апертурный угол расходимости пучка, оптическая схема

Основным критерием выбора оптической схемы источника излучения является получение параллельного пучка с минимальным апертурным углом расходимости. Он должен быть меньше угла дифракционного рассеяния вперед микроорганизмами в исследуемой пробе или равен ему (рис. 1) [2].

На рис. 1 показано дифракционное рассеяние вперед одним микроорганизмом: α_0 – угол рассе-

яния; b – диаметр клетки. Согласно теории Густава Ми, угол дифракционного рассеяния частицами с размерами, большими длины волны, определяется выражением

$$\alpha_0 = \frac{\lambda}{b},$$

где λ – длина волны падающего излучения.