

**ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АППАТЫ РЕСПИРАТОРНЫХ РЕСНИЧЕК И
ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ**

Бигдай Е.В., Самойлов В.О.

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН
наб. Макарова, 6, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ
e-mail: bigday50@mail.ru

Аннотация. Статья содержит литературные данные и результаты экспериментов, посвященных изучению роли и молекулярных механизмов локомоторной активности немышечных клеток. Объектом экспериментальных исследований служили реснички респираторного эпителия дыхательных путей, а также жгутики обонятельных клеток. *In situ* применялись методы прижизненной люминесцентной и световой телевизионной микроскопии, а также фармакологический анализ. Реснички мерцательного эпителия дыхательных путей совершают координированные упорядоченные биения, обусловленные функционированием тубулин-динеиновой молекулярной системой подвижности. Двигательная активность обонятельных жгутиков (ОЖ) в отсутствие одорантов неупорядочена, что также, как и в ресничках, связано с тубулин-динеиновым взаимодействием. Одоранты инициируют упорядочение движений: ОЖ направляют их дистальный конец в сторону источников запаха, что обуславливается функционированием актинмиозиновой системы опорно-двигательного аппарата. Таким образом, двигательную активность ОЖ обеспечивают две молекулярные системы подвижности: тубулин-динеиновая в отсутствие одорантов и актин-миозиновая, инициируемая ими. Почти во всех видах подвижности биологических систем (от микробов до человека) участвуют всего три молекулярные системы: актин-миозиновая, тубулин-динеиновая и тубулин-кинезиновая.

Ключевые слова: опорно-двигательный аппарат, респираторные реснички, обонятельные жгутики, актин-миозиновая и тубулин-динеиновая системы подвижности.

**MUSCULOSKELETAL MOLECULAR APPARATUS OF RESPIRATORY CILIA AND OLFACTORY
FLAGELLA**

Bigdaj E.V., Samojlov V.O.

Pavlov Institute of Physiology RAS
nab. Makarova, 6, Sankt-Peterburg, 199034, Russia
e-mail: bigday50@mail.ru

Abstract. This article contains the literature data and the results of experiments on the study of the role and molecular mechanisms of locomotor activity of non-muscle cells. The objects of experimental studies were cilia of the respiratory epithelium of the respiratory tract, as well as flagella of olfactory cells. Methods of intravital fluorescence and television light microscopy, as well as pharmacological analysis were used *in situ*. The cilia of ciliated airway epithelium make coordinated ordered beats due to the operation of tubulin-dynein molecular mobility system. Motor activity of olfactory flagella (OF) in the absence of odorants is not ordered, which is also, as in the cilia, connected with tubulin-dynein interaction. Odorants initiate the ordering of movements: OF guide their distal end towards the odor sources, which is caused by the operation of the actin-myosin system of musculoskeletal apparatus. Thus, the motor activity of the OF provided by two molecular mobility system: tubulin-dynein in the absence of odors and actin-myosin initiated by them. In almost all kinds of mobility biological systems (from microbes to humans) are involved just three molecular systems: actin-myosin, tubulin-dynein and tubulin-kinesin.

Keywords: musculoskeletal apparatus, respiratory cilia, olfactory flagella, actin-myosin and tubulin-dynein mobility systems.

Многие типы немышечных клеток обладают подвижностью благодаря наличию на их поверхности двигательных структур, которыми являются реснички и жгутики – тончайшие выросты цитоплазмы, окруженные плазмолеммой. Диаметр их составляет от 0.20 до 0.25 мкм, а длина достигает 5-10 мкм у ресничек и до 300 мкм у жгутиков. Реснички, выстилающие мерцательный эпителий дыхательных путей, способны двигаться. Траектория их движений имеет маятникообразный характер, в котором различают фазу замаха и фазу эффективного удара. По данным В.В. Шабалина [1], полученным в нашей лаборатории методом прижизненной телевизионной микроскопии высокого разрешения, соотношение их продолжительностей в норме соответствует золотой пропорции: t полного цикла : t замаха = t замах : t удара = 1.62 ± 0.24 . При воспалительных процессах нарушается (причем по-разному, в зависимости от заболевания) как это гармоническое соотношение, так и траектория движения, что вошло в основу применения этого метода в качестве диагностического теста в клиническую практику Санкт-Петербургского государственного НИИ уха, горла, носа и речи [1]. Биения ресничек на поверхности мерцательного эпителия строго упорядочены и координированы. Вектор их согласованного движения направлен к глотке как в верхних, так и в нижних дыхательных путях, что является генетически детерминировано.

Реснички респираторного эпителия колеблются с определенной частотой. По литературным данным она составляет 3-4 Гц. Однако, как оказалось, это заниженная оценка частоты цилиарных биений, что объясняется забором биоптатов для исследований под местной анестезией, уряжающей колебания. Клиницистами в содружестве с нашей лабораторией удалось разработать методику безболезненного получения биоптатов из

верхних дыхательных путей без анестезии [1]. В результате удалось определить частоту биения ресничек у человека, равную 12-16 Гц. Благодаря своему упорядоченному и координированному биению реснички обеспечивают мукоцилиарный транспорт, очищая таким образом дыхательные пути.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе цилиарных движений, обусловлены наличием в ресничках опорно-двигательного аппарата, включающего цитоскелет и аксонемальные молекулы, взаимодействующие с ним. Аксонема образована цилиндрической конструкцией, имеющей конфигурацию $9 \times 2 + 2$ (9 пар периферических тубулиновых микротрубочек и 2 центральные микротрубочки, окруженные центральной капсулой), наружных и внутренних динеиновых ручек, радиальных спиц и других белковых молекул, которых насчитывается в аксонеме до 250. Однако ведущая роль в работе ресничек принадлежит динеину и тубулину. Такой набор ультраструктур характерен для аксонем всех локомоторных ресничек и жгутиков. Следовательно, цитоскелет ресничек и жгутиков является ультраструктурной основой их биомеханических свойств.

Микротрубочки (МТ) в аксонеме называются «цитокостями». Головки молекулы динеина обладают АТФ-азной активностью. Они скользят по МТ, приводя их в движение. Динеиновые ручки называют «цитомышцами», которые могут генерировать силу в 1-5 пН. Все динеины, сосредоточенные на длине в 1 мкм, могут создавать тянущее усилие в 900 пН [2]. Следовательно, динеиновые ручки работают как «цитомышцы» на «цитокостях» (микротрубочках). Обычно «цитокости» и «цитомышцы» объединяют термином «цитоскелет». По нашему мнению, систему взаимодействующих цитокостей и цитомышц целесообразно называть опорно-двигательным аппаратом клетки.

Динеиновые ручки способны регулировать не только силу, но и частоту биения ресничек, что определяется скоростью, с которой головки динеина открепляются от молекул тубулина после эффективного удара. В свою очередь, частота биения ресничек определяет скорость, а, следовательно, и эффективность мукоцилиарного транспорта.

Подвижные реснички респираторного эпителия млекопитающих обладают как механо- так и хемочувствительностью. По данным Bloodgood R.A. [3], механическая стимуляция приводит к учащению биения ресничек, зависимое от присутствия Ca^{2+} во внеклеточной среде, который входит в цилиарный цитозоль через TRPV4 катионный канал, локализованный в ресничках клеток респираторного эпителия.

Показано, что частота биения ресничек возрастает при повышении концентрации ионов водорода, а также под действием веществ, обладающих горьким вкусом. [2, 3]. В подвижных ресничках эпителиальных клеток дыхательных путей были обнаружены различные представители семейства рецепторов горького вкуса, которые локализованы в цилиарной мембране. Один из классов этих рецепторов (T2R-рецепторы) активирует сигнальный путь, сопряженный с G-белком α -гаструдином, который активирует ФЛС β 2 и повышение цитозольного Ca^{2+} [3]. С этим связано увеличение частоты цилиарных биений [2]. Реакция, по-видимому, обеспечивает защиту для эпителия дыхательных путей от токсичных веществ посредством большой скорости мукоцилиарного клиренса, повышая эффективность очищения дыхательных путей на 56 %. Такая реакция респираторного эпителия на горечи может свидетельствовать о существовании у респираторных ресничек химической чувствительности, направленной на регуляцию мукоцилиарного транспорта как составной части мукоцилиарного клиренса.

In vivo изменения частоты биения ресничек дыхательных путей возникает в результате взаимодействия рецепторов с выделяющимися лигандами. Основные эффекты возникают в результате активации рецепторов, сопряженных с G-белком, включая P_2Y_2 , аденозиновые, брадикининовые и, вероятно, мускариновые АцХ-рецепторы. Определенную роль в этом процессе может играть ацетилхолин (АцХ).

Важную роль в регуляции частоты биения ресничек в нижних дыхательных путях играет также внеклеточный АТФ, так как обладает паракриновой активностью в тканях нижних дыхательных путей. Пуриnergическая активация P_2Y рецептора – это один из самых мощных и стойких стимулов, направленных на увеличение частоты биения ресничек у ряда видов млекопитающих.

В изменении частоты цилиарных биений участвуют внутриклеточные сигнальные системы. Основные вторичные посредники цАМФ и Ca^{2+} . Предложены 3 основных механизма, которые участвуют в регуляции частоты биения ресничек у млекопитающих. Эти механизмы включают цАМФ-зависимое фосфорилирование, Ca^{2+} -зависимое NO-цГМФ-зависимое фосфорилирование и прямое действие на активность аксонемальных белков ионов кальция [2]. Подобной подвижностью обладают и обонятельные жгутики (ОЖ) [4, 5].

Следует отметить, что далеко не все исследователи признают наличие локомоторной активности обонятельных жгутиков млекопитающих [6]. Классические исследования А.А. Бронштейна [4] и результаты наших исследований посредством прижизненной телевизионной микроскопии высокого разрешения [5] показали, что обонятельные жгутики двигаются у земноводных и млекопитающих (крысы, кролики), включая человека.

Благодаря своей подвижности жгутики осуществляют активный поиск и обнаружение одорантов в обонятельной слизи, покрывающей обонятельный эпителий. Именно с обонятельных жгутиков начинается процесс восприятия запахов, поскольку в их дистальных отделах сосредоточены все компоненты обонятельной трансдукции, обеспечивающие не только взаимодействие одорантов со специфическими молекулярными рецепторами в цилиарной мембране, но и механизмы усиления сигнала. В результате этого одна молекула одоранта способна вызвать нервную импульсацию, направленную в обонятельную луковицу [7]. Следовательно, активный поиск пахучих веществ посредством перемещения в пространстве ОЖ является, очевидно, механизмом высокой чувствительности ольфакторной сенсорной системы.

ОЖ в отличие от респираторных ресничек, чьи движения всегда упорядочены и координированы, по-разному двигаются без действия и под действием одорантов. В отсутствие обонятельных стимулов локомоторная активность обонятельных жгутиков не упорядочена. ОЖ совершают движения в режиме рыскания. Жгутики как будто-бы «принюхиваются» к окружающей их среде. При этом их дистальный отдел вытягивается на короткий момент в определенном направлении, а затем возвращается обратно, что, по-видимому, увеличивает вероятность встречи молекулы одоранта с хеморецептором.

Кроме того, перемещения жгутиков в отсутствие стимула похожи на движения хлыста в руке погонщика: проксимальный отдел работает активно, а дистальный следует пассивно за ним, что сопровождается его изгибами и образованием петель. На основе электронной микроскопии обонятельной выстилки [4], характер локомоции жгутиков обуславливается тем, что опорно-двигательный аппарат, так же как и в ресничках, представляющий собой набор из $9 \times 2 + 2$ микротрубочек, сосредоточен в проксимальных отделах обонятельных жгутиков, тогда как в дистальных отделах его нет.

Данные электронной микроскопии были подтверждены нами посредством прижизненной телевизионной микроскопии с использованием колхицина, который в концентрации 1 мМ нарушает целостность микротрубочек в обонятельных жгутиках. Взаимодействие колхицина с тубулиновыми молекулами мы наблюдали визуально, благодаря тому, что в этих условиях колхицин обладает флуоресценцией [8]. Мы возбуждали флуоресценцию на длине волны 360 нм и регистрировали на длине волны 435 нм (см. рис. 1). Оказалось, что после обработки препарата обонятельной выстилки 1 мМ колхицином жгутики останавливались [9]. Таким образом, их опорно-двигательный аппарат представляет собой динеин-тубулиновую систему, в которой взаимодействие цитомышц с цитокостями обеспечивает активацию неупорядоченной двигательной активности обонятельных жгутиков в отсутствие одорантов.

Мы предположили, что для движений обонятельным жгутикам, как и респираторным ресничкам, необходимы ионы кальция, которые обеспечивают взаимодействие головок динеина с тубулином в опорно-двигательном аппарате. Повышение концентрации внутриклеточного кальция в цитозоле ОЖ за счет его выхода из эндоплазматического ретикулума мало вероятно, поскольку в них его не обнаруживают. Мы предположили, что Ca^{2+} входит из внеклеточной среды через кальциевые каналы. При обработке препарата обонятельной выстилки рутениевым красным, который блокирует Ca^{2+} -каналы семейства TRP, и гадолинием, специфическим блокатором механочувствительных каналов, обонятельные жгутики останавливались [10]. Это позволило нам прийти к заключению, что ионы кальция входят в цилиарный цитозоль через механочувствительные каналы семейства TRP.

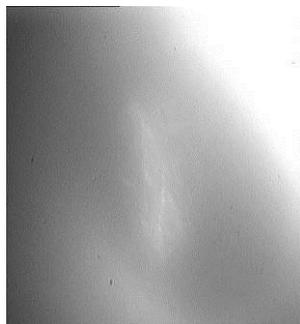


Рисунок 1 – Кадр видео изображения флуоресценции колхицина в обонятельных жгутиках лягушки

TRP-каналы принадлежат семейству каналов механотрансдукции. Они активируются при действии внешних механических сил и сил, производимых собственными движениями, и преобразуют механическую энергию в мембранный потенциал. Таким образом, обонятельные жгутики собственными изгибательными движениями могут, по-видимому, регулировать подвижность вне действия стимула. Следовательно, в отсутствие одорантов обонятельные жгутики, вероятно, могут вести себя как механорецепторы. Их двигательная активность при этом нуждается в энергетическом обеспечении посредством АТФ. К такому выводу мы пришли, исходя из опытов, в которых под действием ротенона (5 мкМ), ингибитора митохондриального дыхания, жгутики останавливались.

Подвижные органеллы обонятельных клеток, как и респираторные реснички, обладают и хеморецепторными свойствами: именно в их дистальных отделах сосредоточены специфические молекулярные рецепторы к одорантам, причем в жгутиках одной обонятельной клетки экспрессируются рецепторы только к одному пахучему веществу. В мембране обонятельных жгутиков, как и в мембранах различных мигрирующих клеток, сосредоточены компоненты внутриклеточных сигнальных путей, превращающие действие химического раздражителя в генерацию рецепторного потенциала, то есть обеспечивающие трансдукцию химических стимулов.

Стимуляция препаратов применяемыми нами одорантами (амиловый спирт, имеющий прогорклый запах, камфора, цинеол с запахом душистого эвкалипта, ванилин с цветочным ароматом, аммиак и β -меркаптоэтанол, обладающий гнилостным запахом) изменяла характер жгутиковых движений – из неупорядоченного он

становился упорядоченным. Дистальный отдел направлялся в сторону действующего стимула. Для подтверждения наблюдаемого визуально появления упорядочения локомоции нами были разработаны такие объективные критерии перехода неупорядоченного движения ОЖ в упорядоченное, как построением фигур, подобных фигурам Лиссажу (см. рис. 2), спектральный анализ и расчет энтропии.

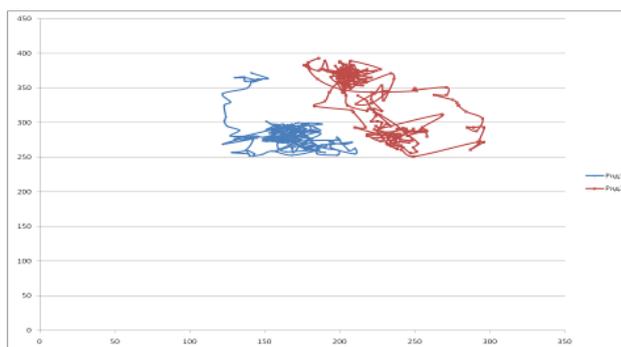


Рисунок 2 – Траектории, наподобие фигур Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия (справа) и после воздействия амиловым спиртом (слева) (оси x и y — координаты кончика ОЖ)

Под действием одорантов (за исключением камфоры) энтропия понижалась, что также свидетельствует об упорядочении двигательной активности обонятельных жгутиков. Камфора повышала энтропию, но при этом дистальный отдел приобретал направленное движение. Такое расхождение объясняется, вероятно, тем, что камфора усиливает экзотермические процессы.

Как показали результаты наших исследований, изменение характера локомоторной активности обонятельных жгутиков связано с инициируемой одорантами реорганизацией опорно-двигательного аппарата в дистальном отделе. В ответ на действие одорантов в нем происходит полимеризация глобулярного актина с образованием актиновых микрофиламентов, что было подтверждалось посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии (см. рис. 3), а также данными фармакологического анализа, построением фигур, подобных фигурам Лиссажу и расчетом энтропии.

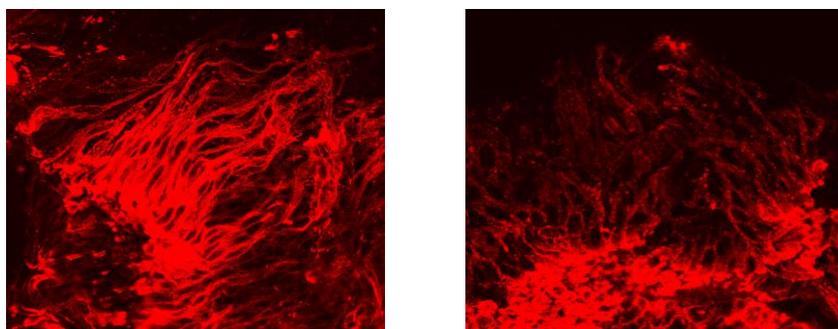


Рисунок 3 – Иммунофлуоресценция полимеризованного F-актина в обонятельных жгутиках, стимулированных амиловым спиртом (слева, цифровая микрофотография, увеличение 500x) и влияние цитохалазина на флуоресценцию полимеризованного F-актина в обонятельных жгутиках, стимулированных амиловым спиртом (справа, увеличение 700x)

Установлено, что под влиянием цитохалазина, ингибирующего полимеризацию актина, одоранты не вызывают упорядочения локомоции жгутиков (см. рис. 3, справа). При этом энтропия увеличивалась, что свидетельствует об уменьшении степени упорядоченности в системе. Следовательно, упорядоченное движение обонятельных жгутиков обеспечивается не тубулин-динеиновой, а актин-миозиновой системой подвижности. По-видимому, за счет взаимодействия актиновых микрофиламентов с цилиарным миозином они создают упорядоченное движение ОЖ в направлении источника одоранта. В жгутиках обонятельных клеток был идентифицирован миозин VIIa, который, вероятно, способен во взаимодействии с актином обеспечить хемотаксис жгутиков при появлении в среде соответствующих одорантов [11].

Как уже отмечалось, дистальный отдел ОЖ лишен полноценного цитоскелета. Вместе с тем в отсутствие одорантов жгутики проявляют кратковременное упорядочение своей двигательной активности. Мы предположили, что в основе этого упорядочения жгутиковых движений вне действия стимула лежит реорганизация цитоскелета в их дистальном отделе: в нем происходит кратковременная полимеризация мономерного актина. Это предположение было подтверждено данными фармакологического анализа и расчетом энтропии. После обработки препарата обонятельной выстилки цитохалазином ее энтропия увеличивалась, что

является показателем увеличения степени неупорядоченности цитоскелета опорно-двигательного аппарата ОЖ. По-видимому, вне действия обонятельного стимула в дистальных отделах обонятельных жгутиков существует полимеризованный актин, но это существование кратковременно.

Таким образом, опорно-двигательный аппарат обонятельных жгутиков включает две молекулярные системы подвижности: динеин-тубулиновую и актин-миозиновую. Теперь выяснилось, что вне действия химических стимулов актиновые филаменты формируются, но пилотные рыскающие движения, которые ОЖ совершают вне действия одоранта, обуславливаются тем, что в них непрерывно происходят кратковременные процессы полимеризации и деполимеризации актина.

Полученные данные свидетельствуют, что неупорядоченный режим двигательной активности вне действия одорантов, с одной стороны, обеспечивает состояние готовности и позволяет сравнительно легко переходить к определенному динамическому режиму, соответствующему реакции на предъявляемый стимул. С другой стороны, для упорядочения двигательной активности необходима полимеризация актина с образованием F-актина и, очевидно, постоянное присутствие небольшого пула F-актина способствует более быстрому переходу от неупорядоченного движения к упорядоченному в присутствии одоранта.

Теперь выяснилось, что актин-миозиновая система, не только вовлекается в процесс упорядочения движений под действием пахучего стимула, но функционирует и вне действия одорантов. Однако формирующиеся актиновые филаменты при этом быстро образуются и распадаются, создавая предпосылки для для мгновенной сборки F-актина при появлении в среде одоранта. Сложный процесс перестройки опорно-двигательного аппарата направлен на обеспечение направленного движения клеток в градиенте концентрации химических веществ по механизму хемотаксиса. Можно полагать, что обонятельные клетки, не имея возможности мигрировать, определяют градиент сигнальных молекул посредством упорядоченного движения своих обонятельных жгутиков.

Список литературы / References:

1. Самойлов В.О., Шабалин В.В., Захарова Г.П. Движение ресничек: "Золотая пропорция" в норме и при патологии / В кн.: *Гармония и дисгармония в медицине*. Вып.3. СПб, 2004, с. 90-102. [Samojlov V.O., Shabalin V.V., Zaharova G.P. Cilia movement, "golden proportion" in normal and pathological conditions / In book: *Harmony and disharmony in medicine*. Release 3. St. Petersburg, 2004, pp. 90-102. (In Russ.)]
2. Salath M. Regulation of Mammalian Ciliary Beating. *Annu Rev. Physiol.*, 2007, vol. 69, pp. 401-422.
3. Bloodgood R.A. Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia. *Journal of Cell Science*, 2010, vol. 123, pp. 505-509.
4. Бронштейн А.А. *Обонятельные рецепторы позвоночных*. Л.: Наука, 1977, 160 с. [Bronshitejn A.A. *Olfactory receptors of vertebrates*. L.: Nauka, 1977, 160 p. (In Russ.)]
5. Самойлов В.О., Бигдай Е.В., Руденко Я.Н. [и др.] Две молекулярные системы подвижности обонятельных жгутиков лягушки. *Биофизика*, 2008, т. 53 (6), с. 997-1000. [Samojlov V.O., Bigdaj E.V., Rudenko Ja.N. [et al.] Two molecular mobility systems of the olfactory flagella of frog. *Biofizika*, 2008, vol. 53 (6), p. 997-1000. (In Russ.)]
6. Menco B.P.M., Farbman A.I. Genesis of cilia and microvilli of rat nasal epithelia during pre-natal development. I. Olfactory epithelium, qualitative studies. *J. Cell Sci.*, 1985, vol. 78, pp. 283-310.
7. Lynch J.W., Barry P.H. Action potentials initiated by single channels opening in a small neuron (rat olfactory receptor). *Biophys. J.*, 1989, vol. 55, pp. 755-768.
8. Bhattacharyya B., Wolff J. Promotion of fluorescence upon binding of colchicine to tubulin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, vol. 71, no. 7, pp. 2627-2631.
9. Панов С.А., Бигдай Е.В., Дудич Б.А., Самойлов В.О. Участие тубулин-динеиновой молекулярной системы в двигательной активности обонятельных жгутиков. *Вестник военно-медицинской академии*, 2013, т. 3, вып. 43, с. 130-134. [Panov S.A., Bigdaj E.V., Dudich B.A., Samojlov V.O. Participation of tubulin-dinein molecular system in the motor activity of olfactory flagella. *Vestnik voenno-meditsinskoj akademii*, 2013, vol. 3, rel. 43, pp. 130-134. (In Russ.)]
10. Бигдай Е.В., Самойлов В.О., Панов С.А., Дудич Б.А. Опорно-двигательный аппарат обонятельных клеток. *Цитология*, 2012, т. 54, вып. 9, с. 666-667. [Bigdaj E.V., Samojlov V.O., Panov S.A., Dudich B.A. Musculoskeletal apparatus of olfactory cells. *Citologija*, 2012, vol. 54, rel. 9, pp. 666-667. (In Russ.)]
11. Wolfrum U., Liu X., Schmit A. [et al.] Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli. *Cell motil. cytoskeleton*, 1998, vol. 40, pp. 261-271.