

С.А. Панов¹, Е.В. Бигдай²,
Б.А. Дудич³, В.О. Самойлов¹

Участие тубулин-динеиновой молекулярной системы в двигательной активности обонятельных жгутиков

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Санкт-Петербург

Резюме. Проанализированы современные представления о подвижности обонятельных жгутиков в отсутствие одорантов и под действием их. Представлены результаты экспериментальных исследований тубулин-динеиновой системы обонятельных жгутиков, ее взаимодействия с актин-миозиновой системой. Установлено, что в отсутствие в окружающей среде пахучих веществ (одорантов) неупорядоченная двигательная активность обонятельных жгутиков в режиме рыскания обеспечивается тубулин-динеиновой молекулярной системой биологической подвижности. Разрушение этой системы не угнетает двигательную активность дистального отдела обонятельных жгутиков вне стимуляции одорантами. Показано, что взаимодействие одорантов с обонятельными рецепторами приводит к упорядочению движения жгутиков в направлении запаха за счет формирования актин-миозиновой молекулярной системы биологической подвижности. При этом обе молекулярные системы подвижности взаимодействуют в обонятельном жгутике при его движении.

Ключевые слова: обонятельные жгутики, молекулярные системы биологической подвижности, тубулин, динеин, колхицин, прижизненная флуориметрия, телевизионная микроскопия.

Введение. По данным А.А. Бронштейна и В.О. Самойлова [2, 4, 5], обонятельные жгутики (ОЖ), как бесхвостых земноводных, так и млекопитающих, включая человека, обладают подвижностью. В ОЖ присутствует аксонема (осевая нить), которая представляет собой цилиндрическую ультраструктуру, проходящую по оси жгутика и образующую ее подвижный каркас, построенный по схеме: $9 \times 2 + 2$ (9 периферических дублетов микротрубочек, расположенных по кругу, и 2 синглетные микротрубочки в центре) и управляемый динеиновыми ручками (рис. 1). Особенность ОЖ состоит в том, что полноценная аксонема обнаруживается не на всем протяжении жгутика, а только в проксимальном отделе [2, 14]. В дистальном сегменте, который может достигать 80% общей длины ОЖ, парные периферические микротрубочки сменяются одиночными (синглетными), а их число постепенно (по направлению к кончику) уменьшается до одной – двух. Так, у ОЖ лягушек проксимальный участок с полноценной аксонемой составляет всего от 4 до 40 мкм при общей длине жгутика от 20 до 200 мкм – соответственно [3]. У млекопитающих, обладающих ОЖ длиной примерно 50–60 мкм, проксимальный отдел занимает всего 2–3 мкм [11]. В ОЖ тубулин-динеиновая молекулярная система биологической подвижности сосредоточена поблизости от основания. Тогда как, реснички, находящиеся на апикальных полюсах клеток респираторного эпителия, имеют микротрубочки, на всем протяжении.

Кроме динеинов и тубулинов, в ОЖ лягушки-быка методом иммуноблотинга были обнаружены актин с

молекулярной массой 46 кДа [6] и миозин VIII [16]. При исследовании препаратов обонятельной выстилки лягушек с использованием конфокальной микроскопии [1] было установлено, что под действием пахучих веществ в дистальных отделах ОЖ из глобулярного актина образуется фибриллярный. Следовательно, в дистальной части ОЖ, лишенной тубулинового цитоскелета, под действием одоранта формируется актиновый цитоскелет. В отсутствие одорантов актиновые нити (F-актин) деполимеризуются и рассыпаются на глобулы (G-актин). Эти факты были подтверждены при изучении прижизненных препаратов обонятельной выстилки [4].

Реорганизация актинового цитоскелета, происходящая в естественных условиях при появлении в окружающей среде одорантов, обуславливает упорядочение двигательной активности ОЖ. Такое упорядочение происходит благодаря быстрому формированию в дистальной части ОЖ под действием пахучих веществ актин-миозиновой молекулярной системы биологической подвижности. Именно она обеспечивает упорядоченные движения жгутиков в направлении источника одоранта. В чем же тогда заключается роль тубулин-динеиновой системы подвижности ОЖ?

Полагаем, что она в отсутствие одорантов осуществляет неупорядоченные движения ОЖ – в режиме рыскания. Взаимодействие рыскающих движений жгутиков, когда на них не действуют пахучие вещества, с упорядоченной двигательной активностью при появлении в среде одорантов является, по-видимому, одним из механизмов необычайно высокой чувствительности обонятельной сенсорной системы.

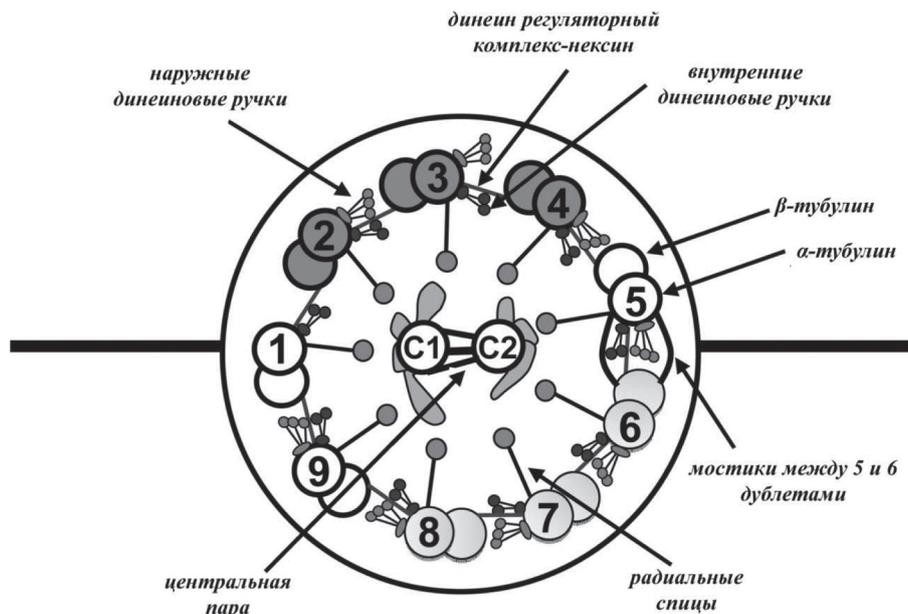


Рис. 1. Схема строения аксонемы жгутика

Цель исследования. Экспериментальная проверка гипотезы о ведущей роли тубулин-динеиновой молекулярной системы обонятельных жгутиков в создании их неупорядоченных движений в режиме рыскания при поиске одорантов в окружающей среде.

Материалы и методы. Использовали методы прижизненной телевизионной микроскопии высокого разрешения с последующей обработкой изображений, прижизненной флуориметрии, математический анализ на основе объективных критериев оценки подвижности обонятельных жгутиков, фармакологический анализ с применением колхицина.

Для осуществления прижизненной телевизионной микроскопии тонкий срез препарата обонятельной выстилки лягушек вида *Rana temporaria* и белых лабораторных крыс помещали в каплю раствора Рингера и размещали на предметном столике светового микроскопа. Общее увеличение системы для прижизненной флуоресцентной микроскопии составляло 10000 крат. Это позволяло рассматривать отдельные обонятельные жгутики на тонких срезах обонятельной выстилки и наблюдать их движение.

При стимуляции растворы одорантов подавали в проток под покровное стекло и регистрировали двигательную активность обонятельных жгутиков как в отсутствие одорантов, так и при поступлении их к обонятельной выстилке. Регистрацию осуществляли при помощи цифровой камеры непрерывно в течение 1,5 мин: 30 с до воздействия пахучего вещества, затем 60 с в момент воздействия и после него. Полученные видеоизображения обрабатывали специально созданными программами «Морфология 5.0», «DataProcessor» и «Jgut» с последующим построением частотного спектра, траекторий движения кончика жгутика на плоскости, перпендикулярной направ-

лению движения жгутика, вычислением энтропии и средней частоты [4].

Для доказательства участия тубулин-динеиновой молекулярной системы подвижности в двигательной активности ОЖ обрабатывали обонятельную выстилку колхицином. Известно, что он связывается с α -, β -тубулиновыми гетеродимерами около гуанозинтрифосфат-связывающего участка α -тубулина. При высокой концентрации этот агент вызывает деполимеризацию микротрубочек посредством ингибирования боковых связей между протофиламентами [15]. Показано [7], что колхицин, нефлуоресцирующий в водной среде или органических растворителях, приобретает способность светиться при связывании с тубулиновыми гетеродимерами, на которые распадаются тубулины при деполимеризации. Поэтому флуоресценция связывающегося с ними колхицина может свидетельствовать о деполимеризации тубулинов под действием колхицина.

Результаты и их обсуждение. При отсутствии в окружающей среде пахучих веществ ОЖ животных и человека совершают беспрестанные неупорядоченные движения в режиме рыскания с кратковременным замиранием в конце каждого двигательного акта. Дистальный конец ОЖ следует пассивно за проксимальным отделом. Жгутик напоминает хлыст в руке погонщика — активно колеблется проксимальный отдел, находящийся рядом с рукой, а остальная часть пассивно следует за ним.

При визуальном анализе двигательной активности ОЖ было установлено, что под действием колхицина проксимальный сегмент наблюдаемого жгутика вначале замедляет свои движения, а спустя 7–8 мин вовсе останавливается. Очевидно, что в ОЖ под действием колхицина происходит нарушение взаимодействия

динеина с центрами связывания на тубулине микротрубочек, поскольку известно [10], что колхицин, связанный с тубулином, «разрыхляет» микротубулярные структуры с последующей деполимеризацией их до гетеродимеров.

Обработка колхицином обонятельной выстилки лягушки и крысы после латентного периода в 2,5 мин усиливала флуоресценцию ОЖ. Следовательно, повышение интенсивности флуоресценции ОЖ, инициируемый колхицином, обусловливается деполимеризацией микротрубочек в аксонеме ОЖ. Максимальное свечение наблюдается через 3–4 мин. По-видимому, на это время приходится наибольшее содержание неполимеризованных динеиновых гетеродимеров в цитозоле после разрушения колхицином боковых связей между протофиламентами микротрубочек.

Вместе с тем исследование флуоресценции ОЖ, подвергнутых воздействию колхицина, позволило выявить размеры полноценной аксонемы, если признать, что область максимального свечения в ОЖ соответствует аксонеме. Оказалось, что эта область в ОЖ лягушки (n=70) занимает от 30 до 50% общей длины жгутика, то есть занимает 15–20 мкм от его основания. У крысы (n=25) область максимального свечения равна 8–10 мкм и достигает 50–70% длины ОЖ.

По данным исследования флуоресценции, аксонема ОЖ представляется более обширной, чем по результатам электронной микроскопии [12]. Расхождения небольшие и их можно объяснить тем, что мы проводили прижизненные исследования обонятельной выстилки, а при электронной микроскопии препараты подвергаются фиксации, что искажает размеры измеряемых показателей. С другой стороны, при флуориметрии свечение обычно выходит за границы своего источника.

Флуориметрический анализ взаимодействия колхицина с ОЖ свидетельствует, что оно приводит к деполимеризации микротрубочек в аксонеме. Для непосредственного выявления влияния колхицина на двигательную активность ОЖ нами использовались

объективные критерии соотношения ее упорядоченности и неупорядоченности [4].

Под действием колхицина сложные колебания наподобие фигур Лиссажу, представляющие собой траектории движения кончика ОЖ на плоскости, перпендикулярной его направлению, происходят в более обширном пространстве по сравнению с тем, в котором совершались движения жгутика до применения колхицина (рис. 2). Это свидетельствует о повышении степени неупорядоченности двигательной активности ОЖ под влиянием колхицина. О том же говорят повышение энтропии (на 43+5%), и расширение гармонического спектра сложных колебаний ОЖ за счет появления новых высокочастотных гармоник (рис. 3). При этом средняя частота колебаний ОЖ повышается на 25+4%.

Предъявление одорантов (в частности амилового спирта) на фоне предварительной инкубации обонятельной выстилки в растворе колхицина приводило к появлению активных упорядоченных движений дистальной части ОЖ. Об упорядоченности их двигательной активности свидетельствовали и сужение пространства, в котором колеблется дистальный сегмент ОЖ, смещаясь в сторону источника запаха (рис. 4), и уменьшение энтропии на $5,0 \pm 1,2\%$, и тенденция к сужению гармонического спектра. При этом понижается средняя частота колебаний ОЖ на $32 \pm 5\%$. Энтропия относительно начального уровня (до инкубации в колхицине, т.е. по сравнению с интактным препаратом) повышается.

Установлено, что разрушение микротрубочек, нарушая неупорядоченную двигательную активность ОЖ, не приводит к неспособности создавать их упорядоченные движения под действием одорантов. Иными словами, при разрушенных колхицином микротрубочках пахучие вещества упорядочивают двигательную активность ОЖ. Актин-миозиновая и тубулин-динеиновая системы, обеспечивающие жгутиковую подвижность обонятельных клеток, обладают автономностью, но без их взаимодействия невозможна нормальная двигательная активность ОЖ.

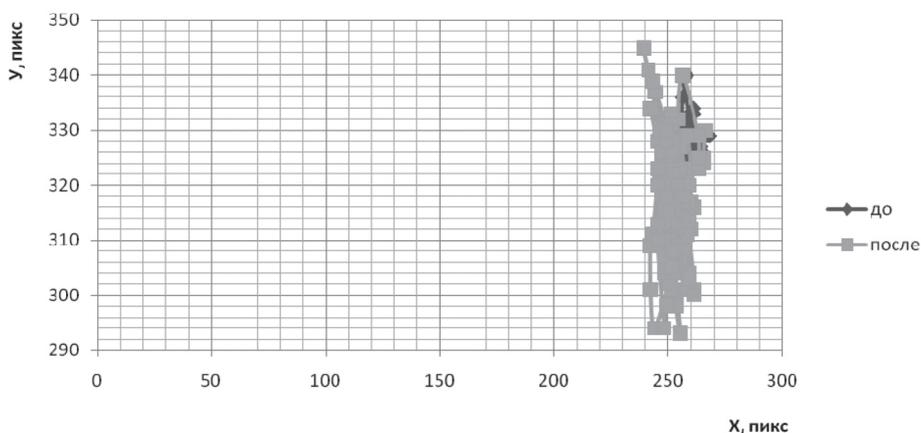


Рис. 2. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия колхицином и после него

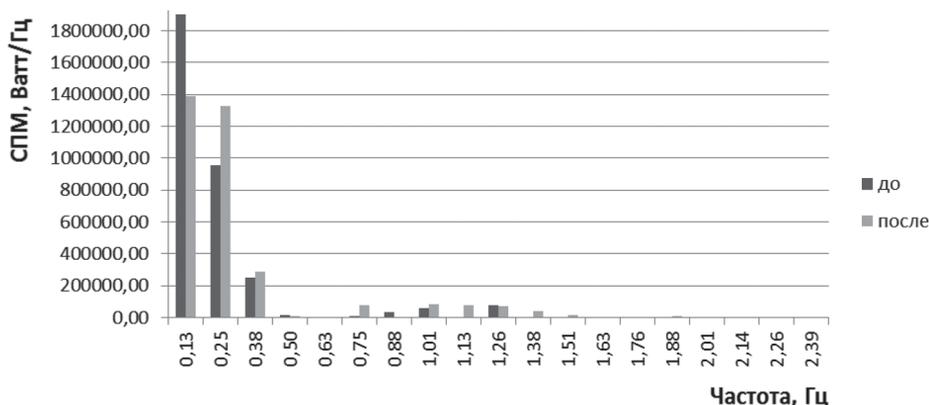


Рис. 3. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия колхицином

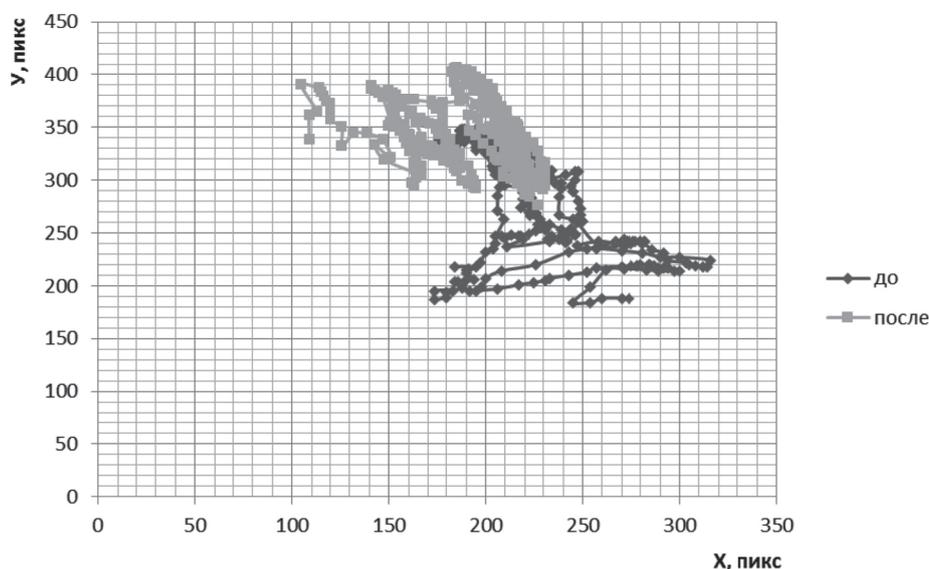


Рис. 4. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия амиловым спиртом на фоне колхицина

Заключение. Тубулин-динеиновая система ОЖ в отсутствие в окружающей среде одорантов обеспечивает неупорядоченные движения в режиме рыскания, что повышает вероятность встречи молекул пахучих веществ с хемочувствительными молекулярными рецепторами, встроенными в мембрану ОЖ. Это служит сигналом к мгновенному формированию актин-миозиновой системы, осуществляющей упорядоченные движения жгутиков в направлении источника запаха. Обе молекулярные системы подвижности ОЖ сложно взаимодействуют при функционировании.

Под действием колхицина проксимальный отдел ОЖ останавливается, а дистальный сохраняет свои движения. Разрушения микротрубочек не угнетают подвижность ОЖ. Известно, что в фибробластах, обработанных колхицином, деполимеризующим микротрубочки, увеличивается количество актино-

вых филаментов [9]. Следовательно, в фибробластах колхицин активирует полимеризацию актина при деполимеризации микротрубочек. Между динамикой микротрубочек и полимеризацией актина существует взаимодействие. В координации микротубулярной деполимеризации и активной полимеризации может участвовать LIM киназа 1 [8].

Можно предположить, что подобное взаимодействие осуществляется и в ОЖ. При этом разборка микротрубочек, инициируемая колхицином, вызывает полимеризацию актина в дистальном отделе, благодаря чему он сохраняет свою подвижность.

Известно, что при использовании цитостатиков для химиотерапии часто развиваются паросмии и гипосмии [13]. Полагаем, что такое нарушение обоняния может быть связано с повреждением тубулин-динеиновой системы в обонятельных жгутиках.

Литература

1. Бигдай, Е.В. Гетерогенность молекулярных механизмов обонятельной рецепции / Е.В. Бигдай [и др.] // Росс. физиол. журн. – 2004. – № 6. – С. 790–800.
2. Бронштейн, А.А. Обонятельные рецепторы позвоночных / А.А. Бронштейн. – Л.: Наука, 1977. – 160 с.
3. Бронштейн, А.А. Электронно-микроскопическое исследование органа обоняния позвоночных / А.А. Бронштейн // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1974. Т. 67, № 9. – С. 22–40.
4. Самойлов, В.О. Двигательная активность обонятельных жгутиков и хемотаксис / В.О. Самойлов [и др.] // Инфокоммуникационные технологии в инновациях, медикобиологических и технических науках: сб. науч. тр. четвертого междунар. науч. конгр. «Нейробиотелеком-2010». – СПб.: Политехника, 2010. – С. 190–194.
5. Самойлов, В.О. Молекулярные машины опорно-двигательных аппаратов респираторных ресничек и обонятельных жгутиков / В.О. Самойлов [и др.] // Биофизика. – 2013. – Т. 58. – № 2. – С. 269–275.
6. Anholt, RR. Molecular neurobiology of olfaction / RR. Anholt // Crit. rev. neurobiol. – 1993. – Vol. 7 (1) – P. 1–22.
7. Bhattacharyya, B. Promotion of fluorescence upon binding of colchicines to tubulin. / B. Bhattacharyya, J. Wolf // Proc. natl. acad. Sci. USA. – Vol. 71, №. 7 – 1974. – P. 2627–2631.
8. Gorovoy, M. LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells / M. Gorovoy // J. boil chem. – 2005. – Vol. 280 (28). – P. 26533–26542.
9. Jung, HI. Colchicine activates actin polymerization by microtubule depolymerization / HI. Jung // Mol cells. – 1997 – Vol. 7 (3). – P. 431–437.
10. Mair, R.G. Adaptation of rat olfactory bulb neurones / R.G. Mair // J. physiol. – 1982. – P. 326–341.
11. Menco, B.P.M., Ultrastructural localization of olfactory transduction components: the G-protein subunit Golf and type III adenylyl cyclase / B.P.M. Menco [et al.] // Neuron. – 1992. – Vol. 8. – P. 441–453.
12. Menco, BPU. Ciliated and microvillous structures of rat olfactory and nasal respiratory epithelia. A study using ultra-rapid cryofixation followed by freeze-substitution or freeze-etching / BPU. Menco // Cell tissue res. – 1984 – 235 (2). – P. 25–41.
13. Müller, A. Severe chemotherapy-induced anosmia / A. Müller [at al.] // Am. j. rhinol. – 2006. – Vol. 20 (4). – P. 485–486.
14. Reese, T.S. Olfactory cilia in the frog / T.S. Reese // J. cell biol. – 1965. – Vol. 25 (2). – P. 209–230.
15. Risinger, A.L. Microtubule dynamics as a target in oncology / A.L. Risinger // Cancer treat rev. – 2009. – Vol. 35 (3). – P. 255–61.
16. Wolfrum, F.R. Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli / F.R. Wolfrum // Cell motil cytoskeleton. – 1998. – Vol. 40 (3). – P. 261–71.

S.A. Panov, E.V. Bigday, B.A. Dudich, V.O. Samoilov

Tubulin-dynein molecular system involvement in olfactory cilia motility

Abstract: Modern olfactory cilia representations without and under expression to odorants are analyzed. The results of experimental research of tubulin-dynein olfactory cilia system and its cooperation with actin-miosine motility system are displayed. It is shown that without exposure to odorants unordered olfactory cilia motility in yawing mode is provided by tubulin-dynein molecular motility system. Destruction of this motility system does not suppress olfactory cilia distal section motility without exposure to odorants. Odorant-receptor cooperation results in molecular motility system ordering. At this, both cilia molecular motility systems cooperate during its movement.

Keywords: olfactory cilia, molecular motility systems, tubulin, dynein, colchicin, vital fluorimetry, television microscopy.

Контактный телефон: 8 (812) 297-31-69, e-mail: cell@infran.ru