

ОЦЕНКА МОЩНОСТИ РЕСНИЧКИ НА ПОДОШВЕ ПРЕСНОВОДНОЙ УЛИТКИ *Lymnaea stagnalis*

© 2015 г. Г.А. Павлова

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова. 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

E-mail: pavlovaru@yahoo.com

Поступила в редакцию 21.10.14 г.

В работе оценена мощность работы ресничек на подошве прудовой улитки *Lymnaea stagnalis* среднего размера, скользящей вверх в анаэробной среде. Установлено, что на подошве находится порядка $1,3 \cdot 10^9$ ресничек, их общая мощность составляет $1,47 \cdot 10^{-6}$ Вт, мощность одной реснички – $1,1 \cdot 10^{-15}$ Вт и одного ресничного биения – $1,1 \cdot 10^{-16}$ Вт.

Ключевые слова: ресничный эпителий, мощность реснички, локомоторный аппарат, пресноводная улитка, *Lymnaea stagnalis*.

Ресничные эпителии широко распространены у беспозвоночных и позвоночных, включая человека. Исследуются паттерны ресничных биений [1–3], нервная регуляция ресничной активности [4–6], цилиогенез [7], ресничная дискinezия [8]. Работа ресничных эпителиев описывается математическими моделями [9].

Однако оценка мощности ресничек затруднена, так как ресничные эпителии встречаются преимущественно во внутренних органах: бронхах, трахеях, фаллопиевых трубах, семявыносящих канатиках, желудочках головного мозга и центральном канале спинного мозга.

Брюхоногая прудовая улитка *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora) является уникальным модельным объектом, позволяющим исследовать ресничный эпителий подошвы ноги в естественных условиях без нарушения целостности ткани. Целью данной работы было оценить мощность реснички на подошве прудовика.

Прудовик (рис. 1) прикрепляется к опоре подошвой ноги благодаря слизи, продуцируемой подошвой [10], и скользит по опоре. Реснички, покрывающие подошву (рис. 2), бьются в слое слизи [10], работают по принципу «все или ничего» и обеспечивают медленное скольжение улитки [11]. По ресничкам подошвы распространяются метакрональные волны [10]. Цикл ресничного биения (рис. 3) представлен двумя фазами: эффективным ударом и реверсией [12]. Скорость скольжения прудовика может быть значительно увеличена активацией гладкомышечных клеток, подстилающих ресничный эпителий [11]. Было показано, что ос-

новным поставщиком энергии для ресничных клеток подошвы прудовика является гликолиз, а для мышечных – клеточное дыхание [11].

В данном исследовании удалось оценить, с точностью до порядка, количество ресничек на подошве прудовика, мощность всех ресничек, одной реснички, одного ресничного биения и мышц подошвы, участвующих в скольжении улитки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе приведены данные, полученные на улитках массой 2,7–3,3 г (в среднем 3,0 г), выловленных летом в подмосковных прудах. Улиток содержали в лабораторном аквариуме при комнатной температуре и естественном освещении, кормили листьями салата.

Оценка количества ресничек на подошве прудовика. Для оценки количества ресничек N на подошве прудовика были измерены площадь подошвы S_p и площадь, занимаемая одной ресничкой, S_r . Здесь, как и в предыдущем исследовании [13], для определения S_p у скользящего прудовика фотографировали проекцию подошвы на вертикальную стенку аквариума (рис. 4). Далее контур подошвы переносили на миллиметровую бумагу, и S_p подсчитывали как сумму квадратных миллиметров, очерченных периметром подошвы.

При расчете количества ресничек исходили из того, что плотно расположенные реснички [12] равномерно покрывают подошву прудовика [14]. Так как на подошве имеются также протоки бокаловидных клеток, ворсинчатые и вста-

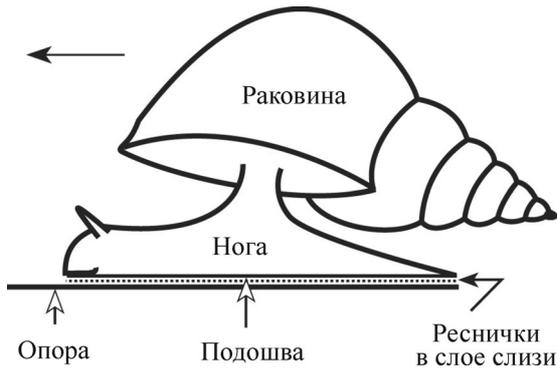


Рис. 1. Ползущий прудовик (схема, вид сбоку). Направление движения улитки показано стрелкой.

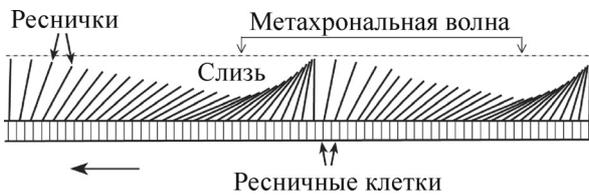


Рис. 2. Продольный срез фрагмента подошвы прудовика (схема). Стрелкой показано направление распространения метахрональной ресничной волны и движения улитки.

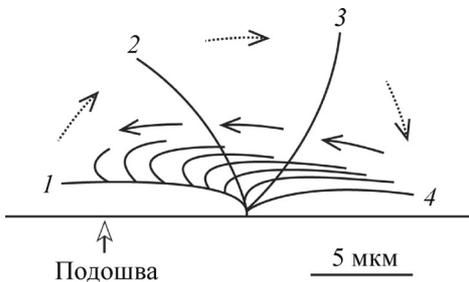


Рис. 3. Цикл ресничного биения (схема, вид сбоку). Направление эффективного удара показано пунктирными стрелками и отмечено четырьмя (1-4) последовательными позициями реснички. Реверсия – последовательное возвращение реснички в исходную позицию – показана сплошными стрелками и совпадает с направлением движения прудовика.

вочные клетки [7,14], мы полагали, что площадь подошвы, покрытая ресничками, $S'_p = 90\% S_p$.

Оценку S_p проводили с помощью электронной микроскопии. Фрагмент ресничного эпителия вырезали из роstralной части подошвы и фиксировали сначала глутаровым альдегидом (5%-й раствор на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4), а затем четырехокисью осмия [12]. Далее ткани обезвоживали в спиртах и заливали в эпон-812. На ультрамикротоме ЛКВ-III изготавливали срезы, которые просматривали в

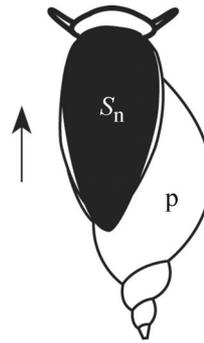


Рис. 4. Улитка, прикрепившаяся подошвой (S_p) к передней стенке аквариума, равномерно скользит вверх (показано стрелкой); р – раковина.

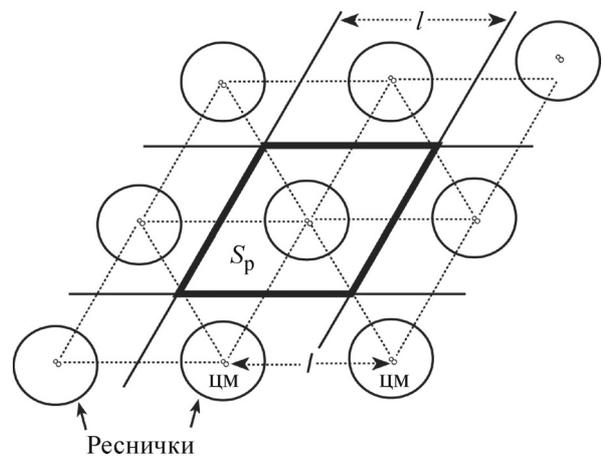


Рис. 5. Гипотетическая проекция ресничек на поверхность подошвы. Девять ресничек проецируются на вершины восьми равносторонних треугольников, показанных пунктиром, со стороной l (расстояние между центральными микротрубочками (цм) соседних ресничек). Жирные сплошные линии ограничивают площадь S_p , занимаемую ресничкой и равную площади двух равносторонних треугольников.

электронных микроскопах Hitachi HU-11 и Hitachi-12.

При оценках S_p исходили из того, что для обеспечения максимальной плотности ресничек на подошве проекции соседних ресничек должны образовывать равносторонний треугольник (рис. 5). По определению площадь такого треугольника

$$S_p = \frac{l^2\sqrt{3}}{4},$$

где l – расстояние между центральными микротрубочками соседних ресничек.

Мощность реснички. Чтобы оценить мощность реснички, сначала подсчитывали работу всех ресничек подошвы A , совершаемую ими

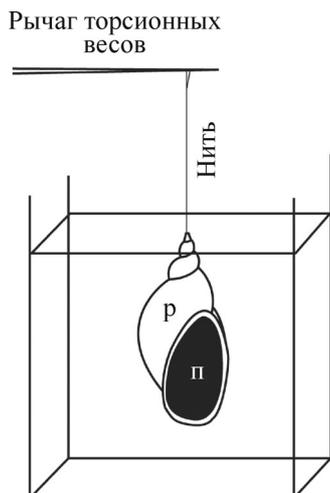


Рис. 6. Определение массы улитки в воде. Нить прикреплена кусочком скотча к верхушке раковины (р), другой конец петлей перекинут через рычажок торсионных весов (подробнее в тексте); п – подошва.

при равномерном скольжении и смещении улитки вертикально вверх на расстояние h . Чтобы заблокировать мышечную активность, скольжение исследовали в анаэробной среде [11]. Для приготовления такой среды отстоявшуюся воду, нагретую до 100°C , заливали в пластиковый культуральный флакон, высотой 195 мм, до самого верха, плотно закупоривая флакон пробкой. В этот флакон с остывшей до комнатной температуры водой быстро опускали прудовика и снова закупоривали флакон так, чтобы под пробкой не образовывался воздушный пузырь. Перед погружением в воду из дыхательных путей улитки убирали воздух, надавливая тупой стороной иголки на подошву. Благодаря отрицательной плавучести, прудовик опускался на дно. Анаэробная среда стимулировала скольжение, направленное вверх [11]. Улитка доползала до пробки, и флакон переворачивали вверх дном. За время наблюдения, превышающее 2 ч, флакон был перевернут несколько раз. Время (t), за которое самая роstralная точка подошвы улитки смещалась вверх на 10 см (h выбрано произвольно), измеряли многократно с помощью секундомера, скорость скольжения оценивали как $V = h/t$.

Работу всех ресничек подошвы A оценивали как сумму работы по перемещению улитки вверх A' плюс работу по преодолению вязкости слизи A_v . По определению $A' = mgh$, где m – масса улитки, g – ускорение свободного падения $9,8 \text{ мс}^{-2}$, h (здесь 10 см), а $A_v = Fh$, где F – сила, необходимая для преодоления сопротивления слизи. Используя основной закон вязкого течения (И. Ньютон, 1687 г.), получаем $F =$

ηVS , где η – вязкость слизи, V – скорость скольжения прудовика, $S = S_{\text{п}}$ – площадь подошвы. Таким образом, $A = A' + A_v = mgh + \eta VS_{\text{п}}h$.

Для определения значения m к верхушке раковины кусочком скотча прикрепляли нить, другой конец которой петлей перекидывали через рычаг торсионных весов (рис. 6). Перед полным погружением в воду из дыхательных путей улитки убирали воздух (см. выше). После взвешивания улитки отдельно взвешивали нить с опущенным в воду кусочком скотча, крепившимся ранее к раковине. Из веса улитки с нитью вычитали вес нити.

Подсчитывали мощность всех ресничек подошвы $W_{\text{рп}} = A/t$, где t – время (с), за которое произведена работа, мощность одной реснички как $W_{\text{р}} = W_{\text{рп}}/N$ и одного ресничного биения как $W_{\text{рб}} = W_{\text{рп}}/f$, где f – частота ресничных биений, равная 10 Гц и измеренная с помощью стробоскопа [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество ресничек на подошве прудовика.

Во время скольжения прудовика площадь его подошвы $S_{\text{п}}$ произвольно менялась от 200 до 300 мм^2 . Это минимальное значение $S_{\text{п}}$ было выбрано для расчета количества ресничек, так как необходимая при гистологических исследованиях изоляция ноги вызывала значительное сокращение площади подошвы. Таким образом, площадь подошвы, покрытая ресничками, $S'_{\text{п}} = 0,9S_{\text{п}}$ (см. выше) = 180 мм^2 .

С помощью электронной микроскопии было показано, что расстояние между центральными микротрубочками соседних ресничек (l) равно 0,4 $\mu\text{м}$ (рис. 7). Графически определили, что площадь, занимаемая одной ресничкой, $S_{\text{р}}$, равна сумме двух равносторонних треугольников (рис. 5). Таким образом, площадь, занимаемая ресничкой на подошве, составляет $S_{\text{р}} = \frac{0,4^2\sqrt{3}}{2} = 0,136 \text{ мкм}^2$, а количество ресничек на подошве $N = S'_{\text{п}}/S_{\text{р}} = 1,3 \cdot 10^9$.

Работа и мощность ресничек подошвы. Масса улитки в воде составляла в среднем 300 мг. Работа по подъему улитки вверх $A' = 0,0003 \text{ кг} \cdot 9,8 \text{ мс}^{-2} \cdot 0,1 \text{ м} = 2,94 \cdot 10^{-4} \text{ кг} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-2}$ (Дж). Скорость скольжения улитки незначительно менялась, но как в большинстве измерений, так и в среднем составляла 0,5 $\text{мм} \cdot \text{с}^{-1}$. Вязкость слизи на подошве прудовика не измеряли, для подсчетов было использовано значение вязкости слизи на подошве сухопутного брюхоногого

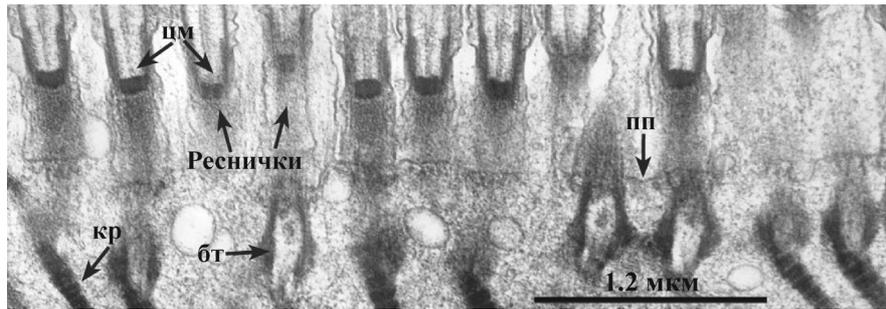


Рис. 7. Реснички на подошве прудовика. Электронная микроскопия сагиттального среза подошвы (фотография Л.Е. Бакевой). Поверхность подошвы (пп), центральные микротрубочки (цм), корешок реснички (кр), базальное тело (бт).

моллюска *Ariolimax columbianus*, равное 5 Па·с [15]. Отсюда следует, что при скорости скольжения прудовика $V = 0,5 \text{ мм} \cdot \text{с}^{-1}$ с площадью подошвы $S_{\text{п}} = 300 \text{ м}^2$ и смещении на расстояние $h = 10 \text{ см}$ работа ресничек по преодолению вязкости слизи $A_{\text{в}} = \eta V S_{\text{п}} h = 5 \text{ Па} \cdot \text{с} \cdot 0,005 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1} \cdot 0,03 \text{ м}^2 \cdot 0,1 \text{ м} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ Дж}$.

Несмотря на то, что при подсчетах $A_{\text{в}}$ было взято максимальное значение $S_{\text{п}}$ и высокое значение η , которое, по нашим представлениям, должно быть существенно ниже у пресноводного моллюска, чем у сухопутного, величина $A_{\text{в}}$ оказалась на порядок меньше работы A' , совершаемой по перемещению улитки вверх. Поэтому при дальнейших расчетах величина $A_{\text{в}}$ не учитывалась и считали $A = A'$. Время, за которое совершается работа A , оказалось равным 200 с, мощность всех ресничек подошвы $W_{\text{рп}} = A/t = 2,94 \cdot 10^{-4} \text{ Дж}/200 \text{ с} = 1,47 \cdot 10^{-6} \text{ Дж/с}$, мощность одной реснички $W_{\text{р}} = W_{\text{рп}}/N = 1,47 \cdot 10^{-6}/1,3 \cdot 10^9 = 1,1 \cdot 10^{-15} \text{ Вт}$, а одного ресничного биения $W_{\text{рб}} = 1,1 \cdot 10^{-16} \text{ Вт}$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные позволили впервые оценить мощность бьющейся реснички на подошве у пресноводной улитки *Lymnaea stagnalis*. Ее величина оказалась существенно меньше, чем у работающего жгутика, мощность которого достигает 10^{-16} Вт при частоте вращений 300 Гц [16]. Мощность всех ресничек одной клетки подошвы прудовика должна быть на два порядка больше мощности одной реснички, так как ресничные клетки могут содержать от нескольких сотен до 500 ресничек [17].

Наши данные позволяют оценить мощность гладкомышечных клеток $W_{\text{м}}$, подстилающих ресничный эпителий подошвы и способных усиливать локомоторную активность в четыре раза [11], а также мощность локомоторного аппарата

$W_{\text{ла}} = W_{\text{рп}} + W_{\text{м}}$, обеспечивающего быстрое скольжение: $W_{\text{м}} = 4 \cdot W_{\text{рп}} = 4 \cdot (1,47 \cdot 10^{-6}) \text{ Вт} = 5,88 \cdot 10^{-6} \text{ Вт}$, а $W_{\text{ла}} = 7,35 \cdot 10^{-6} \text{ Вт}$.

Возможно, что полученные данные позволяют оценить работу и некоторых других ресничных эпителиев. По нашим данным, 1 см^2 ($1/3$ площади) ресничного эпителия подошвы прудовика при частоте ресничных биений 10 Гц [11] за 200 с (см. выше) совершает работу $A_{\text{см}} = 2,94 \cdot 10^{-4} \text{ Дж}/3 = 0,9 \cdot 10^{-4} \text{ Дж}$, а за 1 с $4,5 \cdot 10^{-7} \text{ Дж}$. Эту величину можно считать отправной для оценки работы других похожих ресничных эпителиев. Например, 1 см^2 ресничного эпителия дыхательных путей человека, где вязкость слизи (1 Па·с [18]) не превышает вязкости слизи на подошве брюхоногого сухопутного моллюска [15], а реснички бьются в одной плоскости с частотой 13 Гц [1], по нашим подсчетам за сутки совершает работу $A_{\text{дпч}} = (4,5 \cdot 10^{-7}) \cdot 1,3 \cdot 86400 \text{ с} = 0,05 \text{ Дж}$.

Автор благодарит Л.Е. Бакееву за электронную микрофотографию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, № проекта 13-04-01052.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. A. Chilvers and C. O'Callaghan, *Thorax* **55**, 314 (2000).
2. M. J. Sanderson and M. A. Sleight, *J. Cell Sci.* **47**, 331 (1981).
3. P. Satir, *J. Cell Biol.* **18** (2), 345 (1963).
4. G. Audesirk, *Nature* **272**, 541 (1978).
5. *Symposium «Neurobiology of invertebrates»*, Ed by J. Sallanki and K. S. Roza (Biol. Hung, 1988).
6. A. O. D. Willows, G. A. Pavlova, et al., *J. Exp. Biol.* **200**, 1433 (1997).
7. К. Е. Домарацкий и Г. Е. Онищенко, *Цитология* **54** (6), 484 (2012).
8. D. V. Schidlow, *Annual Allergy* **73**, 457 (1994).

9. W. L. Lee and P. G. Jayathilake, *Computers & Fluids* **49** (1), 214 (2011).
10. P. Kaiser, *Z. Wiss. Zool.* **162**, 368 (1960).
11. G. A. Pavlova, *J. Comp. Physiol. A* **196**, 241 (2010).
12. Г. А. Павлова и Л. Е. Бакеева, *Журн. эвол. биохимии и физиологии* **29** (5–6), 495 (1993).
13. Г. А. Павлова, *Журн. эвол. биохимии и физиологии* **26**, 5, 702 (1990).
14. J. D. McKenzie, M. Counce, et al., *J. Neurocytol.* **27**, 459 (1998).
15. M. W. Denny and J. M. Gosline, *J. Exp. Biol.* **88**, 375 (1980).
16. М. Би́хи, *Черный ящик Дарвина* (Свободная пресса, Нью-Йорк, 1996).
17. Биологический энциклопедический словарь, 2-е изд., (Сов. Энциклопедия, М., 1986).
18. Практическая пульмонология детского возраста, 3-е изд., под ред. В.К. Таточенко (М., 2006).

Assessment of Cilium Force on the Foot Sole of the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis*

G.A. Pavlova

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119992 Russia*

In this study, we evaluated the force of the cilium on the foot sole of a medium-sized pond snail *Lymnaea stagnalis*, crawling up in the anaerobic water. It was found that there are $1.3 \cdot 10^9$ cilia on the foot sole, their force is $1.47 \cdot 10^{-6}$ W, the force of one cilium is $1.1 \cdot 10^{-15}$ W and the force of single ciliary beat is $1.1 \cdot 10^{-16}$ W.

Key words: ciliated epithelium, force of cilium, the mechanism of locomotion, freshwater snail, Lymnaea stagnalis