

## 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-

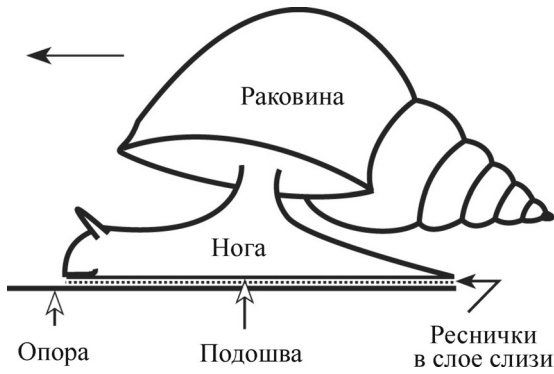


Рис. 1. Ползущий прудовик (схема, вид сбоку). Направление движения улитки показано стрелкой.



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

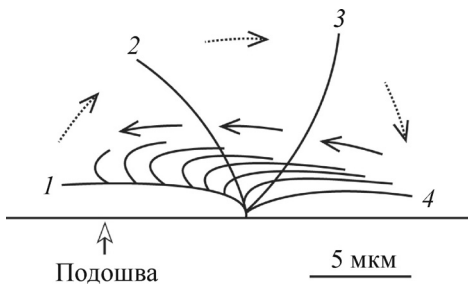


Рис. 3. Цикл ресничного биения (схема, вид сбоку). Направление эффективного удара показано пунктирными стрелками и отмечено четырьмя (1-4) последовательными позициями реснички. Реверсия – последовательное возвращение реснички в исходную позицию – показана сплошными стрелками и совпадает с направлением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

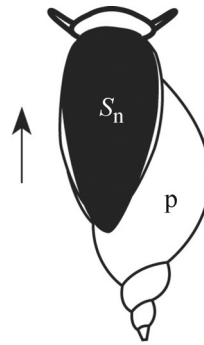


Рис. 4. Улитка, прикрепившаяся подошвой ( $S_p$ ) к передней стенке аквариума, равномерно скользит вверх (показано стрелкой); р – раковина.

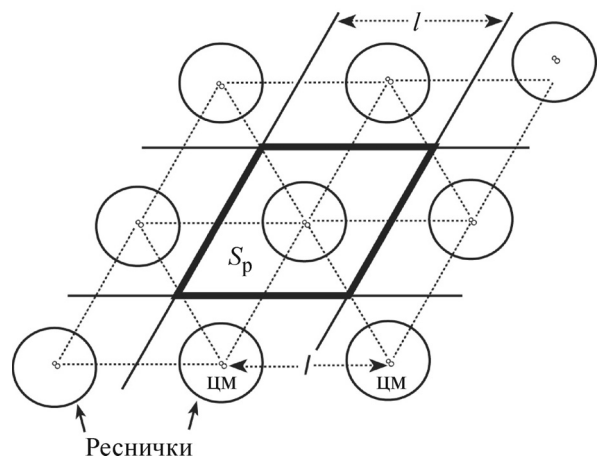


Рис. 5. Гипотетическая проекция ресничек на поверхность подошвы. Девять ресничек проецируются на вершины восьми равносторонних треугольников, показанных пунктиром, со стороной  $l$  (расстояние между центральными микротрубочками (цм) соседних ресничек). Жирные сплошные линии ограничивают площадь  $S_p$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

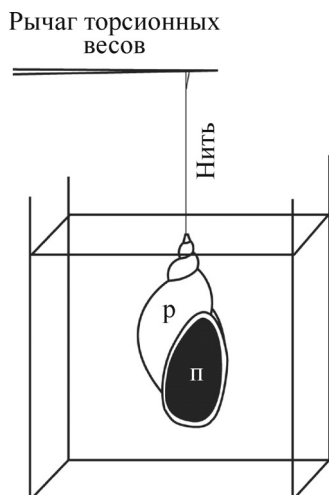
электронных микроскопах Hitachi HU-11 и Hitachi-12.

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  $100^\circ\text{C}$ , 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  $F =$

$\eta VS$ , где  $\eta$  – 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].

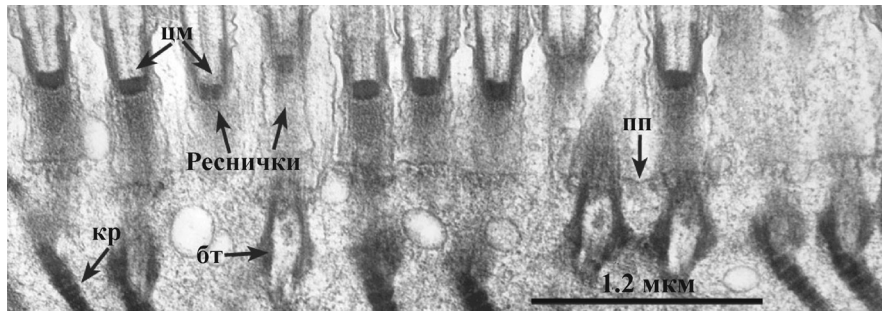
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Количество ресничек на подошве прудовика.

Во время скольжения прудовика площадь его подошвы  $S_{\text{п}}$  произвольно менялась от 200 до 300  $\text{мм}^2$ . 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  $\text{мм}^2$ .

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  $\eta$ , 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  $10^{-16} \text{ Вт}$  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,  $1 \text{ см}^2$  ( $1/3$  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,  $1 \text{ см}^2$  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*