

ХЕМОТАКСИС КАК МЕХАНИЗМ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ

© 2015 г. Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

E-mail: bigday50@mail.ru

Поступила в редакцию 18.05.15 г.

Статья посвящена современным представлениям о двигательной активности обонятельных жгутиков как варианту хемотаксиса. Она включает анализ литературных данных, а также результаты экспериментальных исследований авторов.

Ключевые слова: хемотаксис, обонятельные жгутики, актин, миозин, тубулин, динеин.

Термин «хемотаксис» введен в биологию в 1884 г. Вильгельмом Пфедфером, который описал его как направленную миграцию лейкоцитов в соответствии с химическим градиентом [1]. Это определение и сейчас общепринято [2]. Направленное движение клеток к химическому источнику в градиенте его концентрации является фундаментальным клеточным процессом и играет важную роль в развитии организмов, заживлении ран, во врожденном иммунитете и метастазировании опухолевых клеток у высокоорганизованных организмов, в процессах оплодотворения, а также в поисках пищи, реакции на аттрактанты и репелленты и образовании многоклеточных тел у простейших. Механизмы регуляции хемотаксиса сформировались на ранних этапах эволюции и сохранились вплоть до млекопитающих [3,4].

Обонятельные клетки принадлежат к клеткам жгутикового типа. Их апикальный полюс увенчан обонятельными жгутиками. Они представляют собой тонкие выросты плазматической мембраны этих клеток (диаметром около 0,2–0,3 мкм и длиной до 150 мкм) и присущи подавляющему большинству обонятельных клеток позвоночных. Эти органеллы обладают подвижностью у различных животных – лягушек, тритонов, миног, костистых рыб, пресмыкающихся, птиц, млекопитающих [5,6]. Характер их двигательной активности был выявлен в опытах на лягушках, а потом и на других животных. Исследователи солидарны во мнении, что обонятельные жгутики у преобладающего большинства позвоночных в отсутствие одорантов обладают неупорядоченной подвижностью. Они совершают движения в режиме рыскания, сканируя обширную область пространства вокруг себя в поиске пахучих веществ.

Двигательная активность всех подвижных ресничек и жгутиков осуществляется благодаря тому, что под их плазмолеммой находится аксонема, которая представляет собой опорно-двигательный аппарат клетки. Структурная организация ресничек весьма консервативна в процессе эволюции [7]. Аксонема построена из девяти пар периферических микротрубочек, связанных между собой динеиновыми ручками. В центре аксонемы находятся еще две микротрубочки, заключенные в оболочку, называемую центральной капсулой. Поэтому говорят, что аксонема ресничек и жгутиков имеет конфигурацию $9 \times 2 + 2$. Девять периферических дублетов соединяются между собой нексинными связями и с центральной парой – радиальными спицами (рисунок).

Как и другие (кинезиновые и миозиновые) надмолекулярные структуры, динеиновые ручки работают как «цитомышцы» на «цитокостях» (микротрубочках). С ними связано также энергетическое обеспечение движения ресничек и жгутиков. Механохимический процесс взаимодействия головок динеина, обладающих АТФ-азной активностью, с тубулином приводит к перемещению друг относительно друга двух дублетов микротрубочек, соединенных боковыми ручками. Механизм этого перемещения напоминает скольжение миозиновых нитей вдоль актиновых. Обнаружено поразительное сходство в работе двух основных молекулярных систем двигательной активности – в обоих происходит скольжащее перемещение «цитокостей» за счет натяжения «цитомышц».

Во мнениях о наличии локомоторной активности обонятельных жгутиков у млекопитающих солидарности среди исследователей нет. Весьма распространено представление, ос-

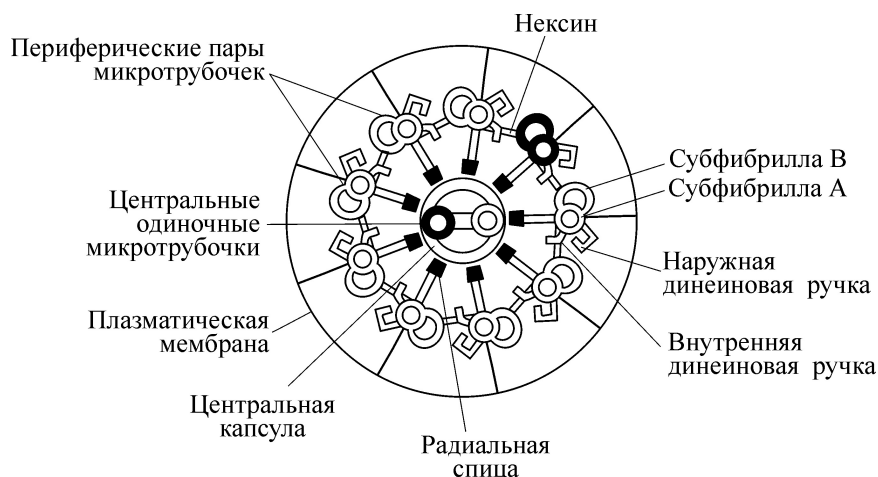


Схема ультраструктурной организации реснички.

нованное на данных, установленных посредством электронной микроскопии, что обонятельные жгутики млекопитающих неподвижны [8,9]. Оказалось, что структурная модель жгутика $9 \times 2 + 2$ прослеживается не на всем его протяжении, а только у основания. Неполноценностью аксонемы обонятельных жгутиков авторы данных работ обосновывают предполагаемое отсутствие у обонятельных жгутиков млекопитающих подвижности, обеспечиваемой тубулин-динеиновой системой.

В наших экспериментах посредством прижизненной телевизионной микроскопии высокого разрешения удалось обнаружить двигательную активность обонятельных жгутиков не только у лягушек (*Rana temporaria*), но и у крыс (*Rattus*), кроликов (*Leporidae*) и человека. Эта активность оказалась сходной с их подвижностью у земноводных: движения жгутиков у всех исследуемых нами животных неупорядочены, когда в среде нет одорантов. Очевидно, такие рыскающие движения повышают вероятность встречи молекул пахучего раздражителя с рецептором в цилиарной мембране.

По результатам наших исследований с применением колхицина рыскающие движения жгутиков обонятельных клеток вне действия стимула обусловлены функционированием тубулин-динеиновой системы, сосредоточенной в проксимальном отделе обонятельного жгутика. Именно там совершается взаимодействие динеина с тубулином и генерируется механическая энергия для двигательной активности этих органелл [10–12].

Источником энергии для локомоторной активности жгутиков служит АТФ, поскольку, как установлено в наших опытах, на фоне ингибиторов клеточного дыхания они останавли-

ваются. Мы показали также, что двигательная активность жгутиков совершается при повышении уровня ионов кальция в цитозоле этих органелл, которые останавливаются при появлении в среде ЭГТА, связывающего внеклеточный кальций [12]. Следовательно, локомоторную функцию обонятельные жгутики выполняют благодаря входу Ca^{2+} из внеклеточной среды.

Эксперименты, проведенные с использованием рутениевого красного, блокирующего Ca^{2+} -каналы семейства TRP, и гадолиния, блокирующего механочувствительные ионные каналы, позволили нам прийти к заключению, что кальций входит в цилиарный цитозоль через механочувствительные кальциевые каналы семейства TRP [13]. Очевидно, дистальный отдел обонятельного жгутика, в котором отсутствует полноценный опорно-двигательный аппарат, движется пассивно – наподобие хлыста в руке погонщика. Таким образом, обонятельные жгутики вне действия стимула реагируют на собственные изгибы, происходящие под действием механических усилий.

Подвижные органеллы обонятельных клеток обладают 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, обеспечивающие трансдукцию химических стимулов [14].

Вместе с тем в наших исследованиях показано, что как только происходит взаимодейст-

вие одоранта с обонятельным рецептором, локализованным в мембране дистального отдела жгутика, характер его движения изменяется. Оно становится упорядоченным и, подобно движению при хемотаксисе, совершается по направлению к источнику одоранта в градиенте его концентрации. Это было выявлено как визуально, так и посредством разработанной нами программы для компьютерного анализа, что обеспечило объективизацию и углубление данных о переходе неупорядоченных движений обонятельных жгутиков в упорядоченные [10,15].

По нашим данным, упорядоченное движение обонятельных жгутиков обеспечивается не тубулин-динеиновой, а актин-миозиновой системой подвижности. Посредством конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного зонда на F-актин (родаминфаллоидин) было установлено, что взаимодействие одоранта с рецептором мгновенно инициирует полимеризацию G-актина с образованием F-актина. Его нити направляются от основания обонятельного жгутика к его верхушке и, по-видимому, за счет взаимодействия с цилиарным миозином создают его упорядоченное движение в направлении источника одоранта. В обонятельных жгутиках был идентифицирован миозин VIIa, который, вероятно, способен во взаимодействии с актином обеспечить хемотаксис жгутиков при появлении в среде соответствующих одорантов [16].

Такая реакция обонятельных жгутиков на пахучие стимулы сходна с поведением мигрирующих клеток при появлении в среде хемоаттрактантов. Так, хемотаксис от клеток слизевика *Dictyosctelium* до лейкоцитов млекопитающих представляет собой циклический процесс. Механизм преобразования хемотаксических сигналов в упорядоченную направленную миграцию в градиенте аттрактанта связан с взаимодействием молекул химических раздражителей с мембранными рецепторами. Затем клетка преобразует этот сигнал в поляризованные внутриклеточные реакции, активируя каскад внутриклеточных посредников, включая фосфолипазу C, сопряженную с G-белком, фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат (PIP₃), протеинкиназу C [2,4].

В результате к мембране ведущего края клетки рекрутируются другие молекулы, обеспечивая в конечном итоге активацию Rho-семейства ГТФаз, включая Rac и Cdc42, и полимеризацию актина на ведущем крае. Rho-семейство мелких ГТФаз является основным регулятором актиновой сборки клетки. Все эти процессы приводят к хемотаксису.

При исследовании двигательных реакций жгутиков на разные одоранты обнаружилось, что направление их движения зависит от применяемого стимула. Например, амиловый спирт и цинеол являются хемоаттрактантами, а сероводород и камфора – репеллентами [17]. Кроме того, как следует из наших данных, в ответ на одоранты изменяется частота локомоторной активности обонятельных жгутиков.

Показано, что у парамеций (*Paramecia*) реакция на хемоаттрактант или репеллент также проявляется в изменении частоты биения ресничек [18], причем механизм хемотаксиса у этих одноклеточных организмов обеспечивается за счет изменения мембранного потенциала. В мембранах ресничек инфузории двух видов *P. caudatum* и *P. tetraurelia* локализуются потенциалзависимые кальциевые каналы, которые открываются деполяризующим рецепторным потенциалом. С входом ионов кальция именно через эти каналы, расположенные в ресничках, связана реверсивная реакция клеток даже в том случае, если похожие каналы есть в мембране клеточного тела [19].

Деполяризация возникает в результате входа ионов кальция в ресничку, который модифицирует эффективный удар и вызывает кратковременные изменения в направлении плавания. Частота биения ресничек коррелирует со сдвигами мембранного потенциала. Повышение частоты цилиарных биений сопровождается небольшой гиперполяризацией, тогда как снижение частоты коррелирует с небольшим, но деполяризационным сдвигом мембранного потенциала. Вследствие этого репелленты деполяризуют, а аттрактанты – гиперполяризуют клетки [20].

Реакция на химический стимул начинается с его взаимодействия с мембранными рецепторами, локализованными в цилиях. Реснички инфузории *P. tetraurelia* чувствительны к хлористому аммоний, а инфузории *P. caudatum* – к горечам, которые действуют как репелленты и вызывают реакцию избегания. Реакция на горечи двухфазна: сначала возникает деполяризация, за которой следует гиперполяризация. Интересно, что реснички деполяризуются при подаче горького раздражителя спереди (*vis a fronte*), а гиперполяризуются – сзади (*vis a tergo*) клетки. Следовательно, горькочувствительные рецепторы неравномерно распределены в разных участках клеточной мембраны.

Под действием таких химических стимулов, как ацетат, цАМФ, глутамат, в клетке происходит гиперполяризация. Она протекает в два этапа. Сначала в ресничках активируются калиевые каналы, а затем – Ca²⁺-насос, который

поддерживает это состояние плазмолеммы. Так, стимуляция инфузории (*P. tet aurelia*) L-глутаматом повышает концентрацию цАМФ через рецептор, сопряженный с аденилатциклазой. цАМФ активирует протеинкиназу А, которая, в свою очередь, является активатором Ca^{2+} -насоса цилиарной плазмолеммы [18,20].

В цилиарной мембране инфузории (*T. pyriformis*) обнаружены рецепторы к одорантам изоамилацетату и пропилизобутирату, являющимся аттрактантами, и к бензилацетату, являющемуся репеллентом. Рецепторы к пахучим молекулам выявлены у организмов разного уровня развития, от бактерий до млекопитающих. Действуя как сильные химические стимулы, они способны вызывать упорядоченное направленное движение даже при очень низких концентрациях. Некоторые ароматы (например, изоамилацетат, который обладает запахом бананов и яблок) вызывают положительный хемотаксис у свободноживущих нематод (*Caenorhabditis elegans*) и плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*), тогда как другие одоранты (амилацетат) являются репеллентами для кишечной палочки (*E. coli*). Низкие концентрации эвгенола, ментола, фурфурилового меркаптана и гвоздики вызывают реакцию избегания у инфузорий (*Tetrahymena*), являясь для них, как и для *E. coli*, репеллентами [21]. Однако показано, что в зависимости от концентрации они могут быть как аттрактантами, так и репеллентами.

В ресничках инфузорий сосредоточены также системы таких внутриклеточных посредников, как цАМФ, цГМФ, IP_3 , кальмодулин, которые гомологичны подобным агентам млекопитающих [19,21,22].

Таким образом, в хемотаксис цилиарных клеток вовлекается тубулин-динеиновая система подвижности, регулируемая уровнем мембранного потенциала.

А.А. Бронштейн [5] высказал предположение, что та или иная двигательная реакция обонятельных жгутиков, возникающая при их взаимодействии с одорантами, может приводить к изменению трансмембранного потенциала и включаться в акт рецепции в качестве одного из неотъемлемых звеньев. Это предположение до сих пор остается недоказанным в экспериментах. Сходство двигательных реакций обонятельных жгутиков на пахучие раздражители с локомоторной активностью реснитчатых клеток наводит на мысль, что изменения мембранного потенциала жгутиков обонятельных клеток, инициируемые их движениями, могут вносить вклад в усиление чувствительности обонятельного анализатора.

Из сказанного выше следует, что в одном обонятельном жгутике сочетаются свойства амёбовидных и реснитчатых клеток. В двигательном акте у них участвуют две молекулярные системы подвижности. Динеин-тубулиновая система, будучи полноценной только в проксимальном отделе, создает неупорядоченные движения в режиме рыскания. В обонятельных жгутиках при появлении в среде пахучих веществ инициируется реорганизация цитоскелета: очень быстро формируется актин-миозиновая система, обеспечивающая упорядоченное движение жгутика в направлении источника одоранта. Эта реакция обонятельных жгутиков подобна хемотаксису.

Применение в наших исследованиях объективных критериев перехода неупорядоченных движений в упорядоченные совместно с фармакологическим анализом позволило обнаружить, что упорядочение локомоции этих оргanelл наблюдается и вне действия раздражителя. Однако они кратковременны, и движения обонятельных жгутиков происходят случайным образом, в разных направлениях, что сближает их поведение с поведением амёбовидных клеток в отсутствие хемоаттрактанта в среде.

Взаимодействие в обонятельных жгутиках обеих молекулярных систем биологической подвижности, очевидно, также служит одним из механизмов необычайно высокой чувствительности обонятельной сенсорной системы.

Результаты наших исследований выявили, что реорганизация цитоскелета в обонятельных жгутиках инициируется одорантами и сопряжена с взаимодействием химического раздражителя с мембранными рецепторами и участием внутриклеточных сигнальных систем, компоненты которых (G-белок, аденилатциклаза, фосфолипаза С, ионные каналы) сосредоточены в дистальном отделе жгутика.

Механизм хемотаксиса в обонятельном жгутике до конца не ясен. Его схему можно представить по аналогии с хемотаксисом сперматозоидов следующим образом: одорант \rightarrow обонятельный рецептор $\rightarrow G_{olf} \rightarrow$ трансмембранная аденилатциклаза \rightarrow цАМФ $\rightarrow [Ca^{2+}] \rightarrow$ реакция моторных белков \rightarrow хемотаксис.

Движения сперматозоида и обонятельных жгутиков очень похожи. Сперматозоид непрерывно «измеряет» изменения концентрационного поля. За замером следует период приостановки или задержки (что-то вроде «принюхивания» обонятельного жгутика). Наконец, сперматозоид поворачивается, а затем следует период направленного передвижения в соответствии с градиентом концентрации.

Сравнение двигательной активности обонятельных жгутиков с локомоцией сперматозоидов допустимо, поскольку обнаружены функциональные параллели между сперматозоидами и обонятельными клетками. Так, в плазмолемме сперматозоидов собак и мышей, как и в мембране обонятельных жгутиков, экспрессируются молекулярные рецепторы к одорантам с цветочными запахами, которые являются хемоаттрактантами [23]. На этом основании принято говорить о молекулярных обонятельных рецепторах сперматозоидов.

В жидкости сперматозоиды морского ежа плавают по спиральной траектории, образуя кольца, продольная ось которых выстраивается в линию в соответствии с градиентом. Этот механизм получил название спирального клинотаксиса [23]. В механизм изменения траектории хемотаксического движения вовлекается мембранный потенциал, со сдвигами которого связана динамика концентрации внутриклеточного кальция, контролирующего частоту и траекторию движения жгутика сперматозоида.

Таким образом, двигательная реакция обонятельных жгутиков на хемоаттрактант (одорант), а также молекулярные механизмы реорганизации цитоскелета, обеспечивающие упорядоченное их движение, направленное в сторону действующего стимула, проявляют сходство с хемотаксисом одноклеточных.

Очевидно, что хемотаксис присущ и одноклеточным организмам, и мигрирующим клеткам многоклеточных организмов, и клеткам, находящимся в составе органов и тканей и снабженных жгутиками, способными взаимодействовать с хемоаттрактантами. Вероятно, механизм хемотаксиса претерпел незначительные изменения в процессе эволюции от простейших одноклеточных организмов до млекопитающих, включая человека.

Сказанное подтверждает предположение А.А. Бронштейна, сформулированное почти столетие назад: «...удачные морфологические, биохимические или физиологические решения какого-либо биологического процесса, уже найденные естественным отбором, консервативны и удерживаются в процессе эволюции и только лишь совершенствуются или более тщательно приурочиваются к какой-то определенной функции [5]».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. Пфедфер – цит. по *История биологии. С древнейших времен до начала XX века.* (Наука, М., 1972).
2. G. Cichetti, P. G. Allen, and M. Glogaver, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **13** (3), 220 (2002).
3. A. T. Sasaki and R. A. Firtel, *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 873 (2006).
4. P. J. M. Van Haastert and P. N. Devreotes, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 626 (2004).
5. А. А. Бронштейн, *Обонятельные рецепторы позвоночных* (Наука, Л., 1977).
6. Е. В. Бигдай и В. О. Самойлов, *Научно-технические ведомости СПбГПУ* **2** (50), 81 (2007).
7. N. Mizuno, M. Taschner, B. D. Engel, et al., *J. Mol. Biol.* **422**, 163 (2012).
8. R. G. Mair, R. C. Gesteland, and D. K. Blank, *J. Neurosci.* **7**, 3091 (1982).
9. B. P. M. Menco and A. I. Farbman, *Cell Tissue Res.* **270**, 47 (1992).
10. С. А. Панов, Е. В. Бигдай, Б. А. Дудич и В. О. Самойлов, *Вестн. военно-мед. академии* **3** (43), 130 (2013).
11. В. О. Самойлов, Е. В. Бигдай, Э. В. Крыжановский и др., *Биофизика* **58** (2), 269 (2013).
12. Е. В. Бигдай, В. О. Самойлов, Я. Н. Руденко и др., *Биофизика* **53** (6), 997 (2008).
13. Е. В. Бигдай, В. О. Самойлов, С. А. Панов и др., *Цитология* **54** (9), 666 (2012).
14. Е. В. Бигдай, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова* **90** (6), 790 (2004).
15. Е. В. Бигдай, В. О. Самойлов, В. В. Бекусова и др., *Биофизика* **55** (5), 886 (2010).
16. U. Wolfrum, X. Liu, A. Schmit, et al., *Cell Motil. and Cytoskeleton* **40**, 261 (1998).
17. Е. В. Бигдай и В. О. Самойлов, *Цитология* **54** (9), 703 (2012).
18. J. J. Van Houten, *Comp. Physiol.* **127**, 167 (1978).
19. H. Plattner and N. Klauke, *Int. Rev. Cytol.* **201**, 115 (2001).
20. M. Valentine, J. Yano, and J. L. Van Houten, *Jap. J. Protozool.* **41** (1), 1 (2008).
21. J. Láng, V. Rákász, A. Magyar, et al., *J. Recept. Sig. Transd.* **31** (6), 423 (2011).
22. L. Kohidai, K. Kovacs, and C. Csaba, *Cell Biol. Int.* **26** (1), 55 (2002).
23. U. B. Kaupp, N. D. Kashikar, and I. Weyand, *Annu. Rev. Physiol.* **7**, 93 (2008).

Chemotaxis as a Mechanism of Locomotor Activity of Olfactory Cilia

E.V. Bigday and V.O. Samoilov

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

The article is devoted to a modern understanding of locomotor activity of olfactory cilia as a form of chemotaxis. It includes an analysis of published data and also the results of experimental research performed by the authors.

Key words: chemotaxis, olfactory cilia, actin, myosin, tubulin, dynein