

МЕХАНИЗМЫ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКОГО И ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО СОПРЯЖЕНИЙ В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКАХ ЛЯГУШКИ (*Rana temporaria*)

© 2017 г. Е.В. Бигдай, Д.К. Фуфачев*, П.Р. Петров*, В.О. Самойлов

*Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6;*

**Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6*

E-mail: bigday50@mail.ru

Поступила в редакцию 07.09.16 г.

После доработки 21.11.16 г.

Исследованы механизмы электрохимического и электромеханического сопряжений в обонятельных жгутиках лягушки (*Rana temporaria*). Методом прижизненной световой телевизионной микроскопии высокого разрешения с использованием фармакологического анализа установлено, что двигательная активность обонятельных жгутиков вне действия одорантов обуславливается входом ионов Ca^{2+} через три типа ионных каналов – механочувствительные, циклонуклеотид-зависимые и потенциал-зависимые. Показано, что ольфакторная аденилатциклаза вне действия запаха стимулируется движениями жгутиков, а сами движения регулируются мембранным потенциалом. Мембранный потенциал в условиях отсутствия адекватного стимула может влиять на остроту обоняния и способность воспринимать слабые обонятельные раздражители.

Ключевые слова: электрохимическое сопряжение, электромеханическое сопряжение, CNG-каналы, потенциал-активируемые каналы, аденилатциклаза III.

Восприятие запахов начинается с взаимодействия одорантов с мембранными рецепторами, локализованными в обонятельных жгутиках (ОЖ), где формируется информация о запахе, поступающая непосредственно из обонятельной луковицы в переднее обонятельное ядро, энторинальную кору, обонятельный бугорок, грушевидную извилину и амигдаларный комплекс [1].

Способность обонятельного нейрона реагировать на адекватные химические стимулы определяется термодинамическим сопряжением концентрационных и электрических градиентов для каждого из ионов (K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^-). Мембранные потенциалы в обонятельных клетках лягушки составляют от -75 до -80 мВ и образуются в теле клетки [2,3]. При этом в отсутствие одорантов их электропроводность составляет около 158 пСм. Она обусловлена проницаемостью плазмолеммы ОЖ главным образом для ионов калия и кальция.

Что же касается натрия и хлора, то их проникающая способность через цилиарную

мембрану лягушки и крысы зависит от присутствия ионов кальция [2]. Так, хлорные каналы открываются только тогда, когда концентрация кальция в цитозоле достигает 2 мкМ. Заметим, что такое содержание кальция примерно в 50 раз выше, чем в покое, т.е. вне действия раздражителей [4].

От 20 до 40% электропроводности цилиарной мембраны обусловлены токами, текущими через ионные каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами (CNG-каналами). Они локализованы у лягушек в начальных отделах дистального сегмента и в проксимальных отделах ОЖ [2]. Их плотность составляет от 205 до 944 каналов на 1 мкм².

В покое концентрация цАМФ в ОЖ колеблется в пределах 0,1–0,3 мкмоль и повышается под действием одорантов. Полагают, что в обонятельных клетках поддерживается стационарный уровень цАМФ. Он определяется соотношением активностей аденилатциклазы и фосфодиэстеразы в нестимулируемых ОЖ, а также скоростью диффузии циклического мононуклеотида из жгутиков в дендриты или соматической обонятельной клетки.

Сокращения: ОЖ – обонятельные жгутики; CNG-каналы – ионные каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами.

По-видимому, в покое цАМФ образуется в той области ОЖ, где сосредоточена аденилатциклаза III. Благодаря базальной активности этого фермента АТФ превращается в цАМФ, который затем активирует CNG-каналы [4,5]. Показано, что каналы, открываемые циклическим аденозинмонофосфатом, в отсутствие одорантов открыты для ионов калия и кальция. При этом на фракцию тока, переносимого кальцием через CNG-каналы при уровнях мембранного потенциала, равных потенциалу покоя, приходится 40% трансмембранного тока [2].

Вместе с тем электропроводность для ионов калия не ограничивается проницаемостью жгутиковой мембраны в покое только через CNG-каналы. Обнаружены четыре типа K^+ -каналов с разной электропроводностью. Они экспрессируются как в булаве, так и в обонятельных жгутиках лягушек [6]. В частности, к ним относятся Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы с электропроводностью в 80 пСм, независимые от потенциала, и Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы с электропроводностью 130 пСм, которые открываются при деполяризации [7]. При концентрации калия в обонятельной слизи 10–20 мМ K^+ -каналы в апикальной области обонятельных жгутиков служат, вероятно, для того, чтобы посредством предеполяризации поддерживать пороговый уровень мембранного потенциала [8]. Показано также, что базальная электропроводность не зависит от длины ОЖ, т.е. от степени зрелости рецепторных клеток [9].

Потоки ионов через все типы ионных каналов изменяют мембранный потенциал, который, распространяясь с декрементом до аксона обонятельной клетки, в свою очередь, может вызывать генерацию потенциала действия, который распространяется непосредственно из обонятельной луковицы в переднее обонятельное ядро, энторинальную кору, обонятельный бугорок, грушевидную извилину и амигдаларный комплекс [1].

Действительно, в изолированных нестимулируемых обонятельных клетках рыб, лягушек, крыс наблюдали спонтанные потенциалы действия [2,6,8,10]. В нестимулируемых одорантами обонятельных клетках лягушки потенциалы действия могут генерироваться с частотой 100 в 1 мин. С ними, вероятно, связана чувствительность к слабым стимулам [2]. Оказалось, что у крыс обонятельные клетки спонтанно более активны, чем у лягушек. Частота спонтанных спайков у них может достигать 300–500 в 1 мин [11].

Авторы работы [8] регистрировали спайковую активность обонятельных клеток, находящихся в составе обонятельного эпителия лягушек, без стимуляции одорантами. Было пока-

зано, что частота спайков регулируется активностью локализованных в ОЖ CNG-каналов, проницаемых для ионов Ca^{2+} .

Таким образом, исходя из литературных данных, можно заключить, что в отсутствие обонятельных стимулов рецепторные клетки обонятельной выстилки обладают спонтанной электрической активностью. Она обусловлена электропроводностью обонятельных жгутиков, в мембране которых экспрессируются ионные каналы, открытые в покое. В этом процессе большая роль принадлежит локализованным в обонятельных жгутиках аденилатциклазе III и фосфодиэстеразе, которые активны в отсутствие адекватной стимуляции обонятельных клеток. В результате независимая от одоранта цАМФ-сигнализация может поддерживать базальные уровни цАМФ в течение довольно продолжительного времени.

Возникает вопрос – что является фактором одорант-независимой активации аденилатциклазы III при отсутствии адекватного раздражителя в окружающей среде?

Мы предполагаем, что таким фактором может служить двигательная активность обонятельных жгутиков. Показано [9,12,13], что без одорантов жгутики совершают неупорядоченные изгибательные хлыстообразные движения. Механизм их механической активности сосредоточен в проксимальном отделе. Под плазмолеммой обонятельных жгутиков находится аксонема (осевая нить), которая представляет собой цилиндрическую ультраструктуру, проходящую вдоль оси жгутика и образующую ее подвижный каркас, построенный по схеме: $(9 \times 2) + 2 - 9$ периферических дублетов микротрубочек, расположенных по кругу, плюс две синглетные микротрубочки в центре. Помимо микротрубочек в состав аксонемы входят динеиновые ручки, радиальные спицы и междублетные связи.

Эти структуры присутствуют у всех эукариот, за исключением тех, которые потеряли их в ходе эволюции. Механизмы двигательной активности ресничек и жгутиков изучаются главным образом на одноклеточных, но также у различных видов многоклеточных животных. Гомология белкового состава ОЖ и ресничек, а также тот факт, что молекулярные «машины», обеспечивающие двигательную активность, сохраняются неизменными на всех этапах клеточной эволюции, позволили нам предположить, что многие механизмы подвижности ресничек и жгутиков могут быть аналогичными.

Реснички и жгутики, приводимые в движение упругими механическими колебаниями, осуществляют клеточную подвижность эукариот.

При изгибании цилиарного аппарата мембраны натягиваются, благодаря чему в них развиваются механические усилия. Они передаются на механочувствительные каналы в цилиарной мембране. Эти каналы относятся к каналам семейства TRP, проницаемым для ионов Ca^{2+} [13].

Кроме того, показано, что в мембранах ОЖ экспрессируется аденилатциклаза III, которая необходима для обнаружения как запахов, так и механических стимулов [14]. Подобная механочувствительная аденилатциклаза обнаружена, например, в лимфонных S49-клетках крыс. Она напрямую, без участия Gs-белка, активируется растяжениями мембраны, возникающими при набухании клеток. Это механическое усилие передается через актиновый цитоскелет [15].

Можно предположить, что сама жгутиковая локомоция активирует аденилатциклазу III, приводя к повышению концентрации цАМФ в цитозоле и возникновению нестимулируемой одорантами электрической активности в обонятельных клетках. Однако подвижность обонятельных жгутиков не учитывается в анализе данных о спонтанной электрической активности обонятельных клеток, хотя для выбора объекта исследований некоторые авторы ориентируются на те рецепторные клетки, апикальный полюс которых содержит подвижные обонятельные жгутики [9,16]. Авторы работы [9] предлагают оценивать стадии развития обонятельных клеток как по длине, так и по их подвижности. Оказалось, что по мере созревания обонятельных клеток длина их ОЖ увеличивается, а частота колебаний возрастает. У состарившихся клеток жгутики самые длинные и малоподвижные. Срок жизни обонятельных клеток составляет 8–15 суток [12].

Вместе с тем было выдвинуто предположение, что изменение мембранного потенциала может влиять на двигательную активность ОЖ и вносить вклад в акт обонятельной рецепции [12].

Целью нашего исследования была проверка предположения о том, что изменение мембранного потенциала может влиять на двигательную активность обонятельных жгутиков лягушки (*Rana temporaria*) и вносить вклад в акт обонятельной рецепции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями, содержащимися в «Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» [17] и в приказе министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О

мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Метод прижизненного исследования двигательной активности обонятельных жгутиков. Работа выполнена *in situ* на изолированной обонятельной выстилке земноводных (самцов осенне-зимних лягушек (*Rana temporaria*)). Анализ литературы показал, что исследование обонятельных клеток в составе выстилки обеспечивает поддержание постоянства среды рецепторных клеток. Находясь в составе выстилки, живые обонятельные клетки не повреждаются ферментами, а также инвазивными регистрирующими процедурами и имеют более высокую чувствительность к одорантам, чем изолированные [8,18].

Для получения препаратов обонятельный эпителий отделяли от обонятельного бугорка и резали на тонкие пласты. Необходимо было добиться, чтобы ширина срезов была меньше толщины слоя обонятельного эпителия. Это позволяло укладывать срез на бок и давало возможность наблюдать за подвижностью обонятельных жгутиков в ходе прижизненной микроскопии.

Затем препараты обонятельной выстилки помещали на предметное стекло в капле раствора Рингера для холоднокровных, фиксировали покровным стеклом, чтобы в процессе наблюдения препараты не смещались, и размещали на предметном столике микроскопа МИКМЕД-2 (ЛОМО, Россия).

Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков проводили методом прижизненной световой телевизионной микроскопии, используя объектив 100× с масляной иммерсией. Регистрацию цилиарной активности проводили с помощью цифровой видеокамеры LCL-903K (Япония). Через плату ввода видеоизображение передавали на жесткий диск персонального компьютера. Записанные видеоизображения обрабатывали программой Virtual Dub 1.6 для конвертации к стандартному видеоформату Windows (*.avi).

Фармакологический анализ. В процессе опыта сначала регистрировали видеоизображение до воздействия фармакологическими препаратами, а затем на их фоне.

В качестве фармакологических агентов мы использовали CdCl_2 [8] и дильтиазем (ICN Biomedicals, США), которые являются специфическими ингибиторами потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа; KCl для деполяризации мембраны обонятельных жгутиков [19–21]; CaCl_2 , который снимает эффект деполяризации, вызываемый раствором KCl [8]; кофеин для

ингибирования фосфодиэстеразы (ICN Biomedicals, США). Специфическим ингибитором аденилатциклазы служил SQ 22.536 (Sigma, США) [4], а в качестве активатора этого фермента в мембране обонятельных жгутиков мы использовали форсколин (Sigma, США). SQ 22.536 и форсколин растворяли в диметилсульфоксиде, затем из них готовили рабочие растворы на основе раствора Рингера для холоднокровных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Визуальный анализ видеоизображений в наших экспериментах показал, что под влиянием KCl в концентрации 15 мМ двигательная активность жгутиков не менялась. Под влиянием 50 мМ KCl жгутики ускоряли свои движения ($n = 10$). Однако при деполяризации, возникающей под действием 200 мМ раствора хлористого калия, в 100% случаев обонятельные жгутики останавливались ($n = 11$).

Таким образом, мембранный потенциал ОЖ в зависимости от степени деполяризации может изменять двигательную цилиарную активность обонятельных клеток, либо учащая колебания, либо урежая их вплоть до полной остановки ОЖ.

Известно, что высокая концентрация KCl вызывает деполяризацию в разных типах клеток [19–21]. Эта деполяризация возникает при высокой внеклеточной концентрации калия в результате ослабления выходящего K^+ -тока, возникающего за счет аккумуляции K^+ в примембранном пространстве, приводящей к снижению градиента концентрации этого иона [19].

$CaCl_2$ способен снимать деполяризующее воздействие высокого уровня калия, поскольку на фоне деполяризации ионы кальция снимают блок с CNG-каналов [8]. Чтобы проверить наличие этого влияния на обонятельные жгутики, мы добавляли $CaCl_2$ (50 мМ) в раствор Рингера, содержащий высокую концентрацию KCl (200 мМ), и регистрировали двигательную активность обонятельных жгутиков. Оказалось, что в 100% случаев при снятии деполяризации локомоторная активность ОЖ восстанавливалась ($n = 10$).

Таким образом, наши результаты позволяют сделать вывод, что изменение мембранного потенциала влияет на двигательную активность жгутиков обонятельных клеток лягушки.

Вероятно, такое поведение жгутиков обусловливается ионами кальция, поскольку установлено, что подвижность ресничек и флагелл эукариот модулируется в ответ на некоторые внеклеточные стимулы, причем Ca^{2+} является важнейшим внутриклеточным фактором для изменений жгутиковой подвижности [22–24]. Как

показал визуальный анализ видеоизображений, обонятельные жгутики в наших экспериментах реагировали на деполяризующие изменения мембранного потенциала. Следовательно, можно предположить, что электромеханическое сопряжение обеспечивается входом ионов кальция через потенциал-зависимые ионные каналы.

Чтобы проверить это предположение, мы помещали препарат обонятельной выстилки лягушки в раствор $CdCl_2$ (2 мМ), являющийся специфическим блокатором потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа ($n = 13$). В 100% наблюдений обонятельные жгутики замедляли свою локомоторную активность вплоть до ее остановки. Очевидно, электромеханическое сопряжение этих подвижных органелл обонятельных клеток обуславливается входом Ca^{2+} через потенциал-зависимые каналы, открываемые при деполяризации.

Как сказано выше, в ОЖ при отсутствии одорантов открыты CNG-каналы. Казалось бы, ионы кальция должны были проходить через этот тип ионных каналов и сохранять двигательную активность на фоне $CdCl_2$. Однако этого мы не наблюдали. По-видимому, $CdCl_2$ в наших опытах блокировал и циклонуклеотид-зависимые каналы. Это может быть связано с тем, что кадмий является двухвалентным катионом, а особенностью CNG-каналов является то, что они блокируются вне- и внутриклеточными двухвалентными катионами [2,8]. Например, при 2 мМ $CaCl_2$ проводимость через каналы, открываемые циклонуклеотидами, падает почти на 60% [4].

При помещении обонятельной выстилки лягушки в раствор $CaCl_2$ (50 мМ) ОЖ останавливались. Прекращение двигательной активности жгутиков обуславливается блокадой CNG-каналов ионами кальция. Следовательно, локомоторная реакция в этом случае требует активации CNG-каналов, которые могут блокироваться хлоридом кадмия вместе с потенциал-чувствительными каналами, что приводит к остановке ОЖ.

В связи с этими данными возникла необходимость получить прямое доказательство участия циклонуклеотид-зависимых Ca^{2+} -каналов в движениях жгутиков обонятельных клеток. Для этого воздействовали на обонятельный эпителий дильтиаземом (50 мкМ), блокатором потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов ($n = 10$). Мы ожидали, что в этом случае CNG-каналы не должны блокироваться, так как дильтиазем не является двухвалентным катионом, и ОЖ сохранят свою подвижность. Визуальный анализ видеоизображения подтвердил наше ожидание: в 100% случаев жгутики сохраняли свою под-

вижность при блокаде потенциал-зависимых каналов дильтиаземом.

Необходимо отметить еще один факт, выявленный в этой серии экспериментов – обонятельные жгутики не только сохраняли свою подвижность, но заметно увеличивали частоту своих колебаний под действием дильтиазема. Возможно, что функционирование потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов в отсутствие одорантов притормаживает локомоторную активность ОЖ лягушки, влияя на CNG-каналы.

Такую реакцию мы наблюдали в наших опытах, когда пытались восстановить движения остановленных хлористым кадмием (1 мМ, $n = 5$) обонятельных жгутиков посредством воздействия на них кофеином (200 мкМ). Результаты визуального анализа показали, что ингибирование фосфодиэстеразы инициировало локомоцию остановленных жгутиков, причем восстановление движений сопровождалось значительным ускорением частоты колебаний жгутиков обонятельных клеток. Вероятно, вклад в это ускорение вносят CNG-каналы, открываемые цАМФ, образующимся в цитозоле при ингибировании фосфодиэстеразы.

Еще одним подтверждением участия CNG-каналов в локомоции обонятельных жгутиков стали опыты с использованием 50 мМ CaCl_2 ($n = 8$). Мы предположили, что при воздействии на препарат обонятельной выстилки раствора CaCl_2 на фоне дильтиазема жгутики должны остановиться, поскольку CNG-каналы будут блокироваться двухвалентными катионами кальция. Как показали результаты визуального анализа видеоизображения, при всех воздействиях жгутики останавливались. Следовательно, Ca^{2+} -каналы, открываемые цАМФ, действительно необходимы для осуществления двигательной активности жгутиков обонятельных клеток лягушек, и поток кальция через них является одним из компонентов электромеханического сопряжения. Вместе с тем активность этих каналов связана с функционированием потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, локализованных в обонятельных жгутиках.

Как было установлено в наших исследованиях ранее [13], движения обонятельных жгутиков совершаются с участием механочувствительных Ca^{2+} -каналов семейства TRP. Необходимы также потенциал-зависимые кальциевые и CNG-каналы. Хлорид кадмия блокирует именно их, оставляя открытыми каналы семейства TRP. Однако функционирования каналов только этого типа недостаточно для обеспечения электромеханического сопряжения.

Как уже говорилось, вне действия раздражителей в ОЖ активна аденилатциклаза III. Мы решили проверить, влияет ли ее активность

на способность жгутиков к движениям. Для этого обрабатывали препарат обонятельного эпителия лягушки аденилатциклазным ингибитором SQ 22.536 (50 мкМ) ($n = 10$). Наблюдалась двухфазная реакция на этот агент. Жгутики сначала значительно ускоряли свои движения, а затем замедляли их вплоть до остановки. Следовательно, выключение функционирования аденилатциклазы прекращает двигательную активность обонятельных жгутиков.

Таким образом, из анализа полученных результатов следует, что в «покое», т.е. в отсутствие одорантов, обонятельные жгутики лягушек двигаются. Движения совершаются с участием механочувствительных, CNG- и потенциал-зависимых Ca-каналов, открытых в отсутствие одорантов. Эта локомоторная активность управляется по механизму электромеханического сопряжения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что как в мышечных, так и в немышечных тканях ключевая роль в электромеханическом сопряжении принадлежит ионам кальция. С кальцием связаны изменения характера цилиарных движений. Он обеспечивает скольжение динеиновых ручек по тубулиновым микротрубочкам [24]. В отсутствие одорантов Ca^{2+} проникает в цитозоль ОЖ несколькими путями.

Во-первых, это механочувствительные каналы. Вероятно, за счет них концентрация Ca^{2+} в ОЖ достигает 30–80 нМ [3]. Однако эта фракция кальция, по-видимому, выполняет триггерную роль в цилиарном электромеханическом сопряжении, не обеспечивая непосредственно движения обонятельных жгутиков. Это доказывается тем, что при блокировании потенциал-зависимых и CNG-каналов, но при открытых механочувствительных каналах жгутики в наших опытах останавливались. Роль триггера может сводиться к следующему.

При низкой концентрации ионов Ca^{2+} (меньше 100 нМ) во многих случаях активируются аденилатциклазы [25]. Аденилатциклаза III может активироваться также самими движениями ОЖ, поскольку она чувствительна к механической стимуляции, возникающей в процессе изгиба мембраны подвижного жгутика. По-видимому, этим можно объяснить базальную активность аденилатциклазы III, которая приводит к увеличению концентрации цАМФ до 0,1–0,3 мкМ и открытому состоянию каналов, регулируемых циклонуклеотидами.

Активация аденилатциклазы приводит к повышению уровня цилиарного цАМФ и открытию CNG-зависимых каналов. Не инициируе-

мого одорантами входа кальция через эти каналы уже достаточно, чтобы обеспечить локомоторную активность ОЖ в отсутствие запахов.

Вместе с тем результаты наших экспериментов выявили зависимость двигательной активности от уровня мембранного потенциала. Из визуального анализа видеоизображения следует, что при концентрации КСl в 15 мМ характер двигательной активности ОЖ не менялся. Такую реакцию, вероятно, можно объяснить тем, что мы исследовали обонятельные жгутики в обонятельных клетках, находящихся в составе обонятельного эпителия. Показано, что в этих условиях препарат долго сохраняет свои функциональные способности, высокую чувствительность к одорантам и локомоторную цилиарную активность [8]. Обонятельные жгутики находятся в окружении обонятельной слизи, секретлируемой опорными клетками обонятельного эпителия, для которой у лягушек характерно высокое содержание КСl: от 10 мМ [8] до 69 ± 10 мМ [2].

Калиевая проводимость обеспечивает обонятельным клеткам чувствительность к концентрации ионов K^+ в слизи. Эта концентрация может изменяться благодаря секреторной активности обонятельной выстилки и электрической активности апикальных мембран рецепторных клеток. Правда, часть этого калия находится в связанном состоянии, но какая именно часть, неизвестно [3].

Кроме того, было показано, что перфузия эпителиальных ресничек деполяризующим внеклеточным калием в концентрации 20 мМ сдвигает мембранный потенциал с -87 ± 3 мВ до $-48 \pm 0,7$ мВ [26]. Вероятно, при концентрации КСl 15 мМ в наших опытах нам не удалось создать деполяризацию, достаточную для изменения двигательной активности обонятельных жгутиков.

Повышение концентрации внеклеточного калия увеличивает степень деполяризации. Так, увеличение содержания калия до 40 мМ сдвигало потенциал покоя в ресничках эпителии с -87 ± 3 мВ до -31 ± 1 мВ [26]. Повышение степени деполяризации цилиарной мембраны при перфузии обонятельной выстилки хлористым калием в концентрации 50 мМ инициировало учащение локомоторной активности жгутиков. По нашим данным, это связано со входом ионов кальция через потенциал-зависимые каналы, открытые при деполяризации. Наш вывод подтверждается работами других авторов, которые утверждают, что в ресничках и жгутиках эукариот Ca^{2+} входит через потенциал-зависимые каналы [23,26].

Учащение локомоторных движений обонятельных жгутиков можно объяснить, исходя из данных, полученных на ресничках мерцательного эпителия млекопитающих, поскольку строение аксонемы, ее белковый состав консервативен и сохранился в процессе эволюции от простейших до человека [27].

С точки зрения современных представлений основная роль в регуляции частоты принадлежит наружным динеиновым ручкам. К одному из механизмов регуляции частоты биения ресничек относят прямое действие на активность аксонемальных белков ионов кальция [24]. В контроле частоты биений ресничек роль этих ионов особенно интересна, так как кальций участвует в реакциях ресничек и жгутиков не только на химические, но и на механические стимулы. Кроме того, за счет Ca^{2+} инициируется быстрое изменение частоты колебаний. Показано, что у парамеции латентный период занимает около 80 мс [24].

Другой механизм учащения цилиарных движений при деполяризации включает участие цАМФ. Показано, что в результате мембранной деполяризации и последующего входа Ca^{2+} увеличиваются уровни цАМФ [28]. Можно предположить, что электромеханическое сопряжение в жгутиках обонятельных клеток осуществляется следующим образом: при деполяризации, вызванной 50 мМ КСl, кальций входит через потенциал-зависимые каналы. В результате в цитозоле ОЖ повышается содержание цАМФ, участвующего в процессах фосфорилирования. Основными мишенями цАМФ-зависимого фосфорилирования являются регуляторная субъединица протеинкиназы А типа II, аксокинин. цАМФ регулирует частоту биения ресничек млекопитающих через активацию аксонемальной протеинкиназы А, которая фосфорилирует легкую цепь динеина наружных ручек. Это приводит к переключению с медленного на быстрый цикл работы динеина и таким образом увеличивает частоту цилиарных движений. Подобный механизм активации моторных белков показан в ресничках мерцательного эпителия [24].

Еще больший деполяризующий сдвиг мембранного потенциала при 200 мМ КСl приводит к прекращению локомоции обонятельных жгутиков. Следовательно, более высокая степень деполяризации вызывает не активацию, а прекращение механической цилиарной активности. Какой же механизм лежит в основе нарушения электромеханического сопряжения при такой деполяризации мембраны ОЖ?

Показано, что под действием КСl в концентрации 140 мМ мембранный потенциал в эпителиальных ресничках сдвигается до $-1,7$ мВ,

при этом сильно увеличивается концентрация цилиарного кальция [26]. Например, деполяризация, вызываемая в нейронах передней доли гипофиза 100 мМ КСl, повышает содержание цитозольного Ca^{2+} до 450 нМ [21]. Реснички жабер мидии способны спонтанно останавливаться при деполяризации их мембраны. Эта остановка наступает при повышении внутрицилиарной концентрации ионов кальция за счет входа Ca^{2+} через потенциал-зависимые каналы [23].

Возможно, что при деполяризации обонятельных жгутиков посредством 200 мМ КСl через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы входит столько этих ионов, что резко повышается внутрижгутиковая концентрация Ca^{2+} . Это может быть обусловлено геометрией ОЖ, при которой часть его небольшого объема занята аксонемой. Поэтому остающийся свободный объем, заполненный цитозолем, доступным для свободной диффузии, составляет около 30–60% общего объема обонятельного жгутика. В этом объеме ионы кальция, проникающие через CNG-каналы, будут сильно увеличивать свою локальную концентрацию вплоть до миллимолярных уровней, активировать Ca^{2+} -АТФазу и особенно усилить Na^+/Ca^{2+} -обмен в обонятельных жгутиках. Но даже при этом концентрация кальция в проксимальных отделах ОЖ остается высокой [3].

Вероятно, концентрация ионов кальция становится достаточной, чтобы ингибировать аденилатциклазу III, являющуюся Ca^{2+} -зависимой. Во многих случаях аденилатциклазы ингибируются при уровнях внутриклеточного кальция >100 нМ [25], а в обонятельных жгутиках в отсутствие одорантов в цитозоле содержание ионов Ca^{2+} составляет уже от 40 до 80 нМ [2,7]. Следовательно, при действии сильной деполяризации в мембране ОЖ ингибируется аденилатциклаза III, что приводит к уменьшению синтеза цАМФ. О недостатке цАМФ при высокой деполяризации свидетельствуют полученные нами данные по восстановлению движений жгутиков при подаче кофеина (200 мкМ) к препарату, находящемуся в растворе с высоким содержанием КСl. Увеличение содержания цАМФ в цитозоле в этих условиях восстанавливало локомоторную активность жгутиков рецепторных клеток.

Снижение концентрации циклонуклеотида под влиянием 200 мМ КСl вызывает уменьшение или прекращение входа ионов Ca^{2+} в жгутики через ионные каналы, открываемые цАМФ, что вызывает их остановку. Следовательно, активность CNG-каналов в ОЖ регулируется мембранным потенциалом посред-

вом ионов Ca^{2+} , входящих через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы.

Таким образом, мембранный потенциал в зависимости от степени деполяризации может изменять двигательную цилиарную активность обонятельных клеток, как увеличивая, так и уменьшая частоту колебаний вплоть до остановки ОЖ. Однако и прекращение движений ингибирует аденилатциклазу III, так как она обладает чувствительностью к локомоторным процессам. В результате за счет прекращения механической активности ОЖ концентрация внутриклеточного цАМФ также уменьшается, меньше поступает внеклеточного Ca^{2+} , вызывая длительную остановку ОЖ.

Можно предположить, что в обонятельных жгутиках нестимулируемых обонятельных клеток лягушек аденилатциклаза III и цАМФ-зависимая фосфодиэстераза находятся в активном состоянии. Активность, по-видимому, обусловлена биомеханическими свойствами обонятельных жгутиков, которые обладают подвижностью в отсутствие одорантов. В клетках происходит координированная регуляция активности аденилатциклазы и фосфодиэстеразы, осуществляемая различной концентрацией внутриклеточного кальция [25]. Такая регуляция способна модулировать концентрацию цАМФ в очень узкой области.

Концентрация цилиарного цАМФ в условиях «покоя» составляет от 0,1 до 0,3 мкМ [4]. Чтобы открыть один CNG-канал, необходимо, чтобы с ним связались две молекулы цАМФ. Показано, что связывание со второй молекулой максимально увеличивает вероятность открытого состояния этого канала [2]. Обонятельные клетки, содержащие 0,1–0,3 мкМ цАМФ в покое, обладают более высокой чувствительностью. Полагают, что при таком содержании цАМФ в обонятельном жгутике может возникать достаточно большая деполяризация в ответ на очень небольшой обонятельный стимул [4]. По мнению авторов, при такой концентрации цАМФ значительно увеличивается рецепторный ток, генерируемый в результате увеличения этой концентрации.

Возможно, двигательная активность ОЖ способствует превращению АТФ в цАМФ посредством активации аденилатциклазы III, чувствительной к механическому воздействию, что, в свою очередь, повышает чувствительность к слабому обонятельному стимулу.

Движения обонятельных жгутиков увеличивают вероятность встречи молекулы пахучего стимула с мембранным рецептором, локализованным в цилиарной мембране, также повышая чувствительность обонятельного анализатора.

Таким образом, как показали результаты наших исследований, локомоция жгутиков обонятельных нейронов регулируется мембранным потенциалом. Это означает, что мембранный потенциал в условиях «покоя» может влиять на остроту обоняния и способность воспринимать слабые обонятельные стимулы. Важный вклад в необычайно высокую чувствительность обонятельного восприятия вносят молекулярные механизмы электромеханического и электрохимического сопряжений в обонятельной рецепции, которые могут служить фундаментом развития интегративной физиологии обоняния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Zelano and N. Sobel, *Neuron* **48** (3), 431 (2005)
2. S. J. Kleene, *Chem. Senses* **33**, 839 (2008)
3. B. Lindemann, *Biophys. J.* **80**, 1712 (2001).
4. R. Y. K. Pun and S. J. Kleene, *Biophys. J.* **84**, 3425 (2003).
5. R. Y. K. Pun and S. J. Kleene, *J. Physiol.* **559** (2), 535 (2004).
6. T. Miyamoto, D. Restrepo, and J. H. Teeter, *J. Gen. Physiol.* **99**, 505 (1992).
7. R. Delgado, M. V. Saavedra, O. Schmachtenberg, et al., *J. Neurophysiol.* **90**, 2022 (2003).
8. S. Frings, S. Benz, and B. Lindemann, *J. Gen. Physiol.* **97** (4), 725 (1991).
9. J. S. Kleene, R. C. Gestel, S. H. Bryant, *J. Exp. Biol.* **195**, 307 (1994).
10. A. Tomaru and T. Kurahashi, *J. Neurophysiol.* **93**, 1880 (2005).
11. P. Duchamp-Viret, A. Duchamp, and M. A. Chaput, *J. Neurosci.* **20**, 2383 (2000).
12. А. А. Бронштейн, *Обонятельные рецепторы позвоночных* (Наука, Л., 1977).
13. Е. В. Бигдай, В. О. Самойлов, С. А. Панов и др., *Цитология* **54** (9), 666 (2012).
14. R. C. Challis, H. Tian, W. Yin, et al., *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0150638 (2016).
15. P. A. Watson, *J. Biol. Chem.* **265** (12), 6569 (1990).
16. A. E. Dubin and V. E. Dionne, *J. Gen. Physiol.* **103** (2), 181 (1994).
17. Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».
18. J. Reisert, P. J. Bauer, K.-W. Yau, et al., *J. Gen. Physiol.* **122**, 349 (2003).
19. Д. А. Евстигнеев, Автореферат дис. ... канд. биол. наук (Ульяновск. 2003).
20. S. Takahashi, M. Shibata, Y. Fukuuchi, *Brain Res. Dev. Brain Res.* **104** (1–2), 111 (1997).
21. K. Meier, W. Knepel, and C. Schuffl, *Endocrinology* **122** (6), 2764 (1988).
22. K. Hasegawa, Y. Tsukahara, M. Shimamoto, et al., *J. Comp. Physiol. A* **181**, 41 (1997).
23. A. Darszon, P. Labarka, T. Nishigaki, et al., *Physiol. Rev.* **79** (2), 481 (1999).
24. K. Inaba, *Cilia* **4**, 6 (2015).
25. M. Salathe and R. J. Bookman, *J. Cell Sci.* **108**, 431 (1995).
26. V. T. Piascik, M. Babich, K. L. Jacobson, et al., *Am. J. Physiol.* **250** (4), 642 (1986).
27. J. Derher, M. Delling, and D. E. Clapham, *eLife* **4**, e11066 (2015).
28. E. E. Davis, M. Brueckner, and N. Katsanis, *Dev. Cell* **11**, 9 (2006).
29. D. M. F. Cooper, M. J. Schell, P. Thorn, et al., *J. Biol. Chem.* **273** (42), 27703 (1998).

Mechanisms of Electromechanical and Electrochemical Coupling in Frog (*Rana temporaria*) Olfactory Cilia

E.V. Bigdaj*, D.K. Fufachev**, P.R. Petrov**, and V.O. Samojlov*

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

**Kirov Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia

The mechanisms of electrochemical and electromechanical coupling in the olfactory cilia of the frog (*Rana temporaria*) were studied. By a high-resolution intravital television microscopy method using pharmacological analysis it was shown that locomotor activity of the olfactory cilia in the absence of odorants is determined by Ca²⁺ ions entry via three groups of ion channels: mechanosensory, cyclonucleotide-dependent and voltage-dependent channels. We have shown that olfactory adenylate cyclase in the absence of odor is stimulated by ciliary motions and the motion itself is controlled by the membrane potential. Consequently, the membrane potential in the absence of an adequate stimulus may affect the sharpness of smell and the ability to perceive weak olfactory stimuli.

Key words: electrochemical conjugation, electromechanical pairing, the CNG-channels, voltage-activated channels, adenylate cyclase III