

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И.П. Павлова

На правах рукописи

ПАНОВ

Станислав Александрович

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ**

Специальность: 03.03.01 – физиология

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук
профессор Е. В. Бигдай

Санкт-Петербург 2014

Оглавление

1.	ВВЕДЕНИЕ	4
	АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.....	4
	ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....	5
	ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ. ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:	6
	НАУЧНАЯ НОВИЗНА:	6
	ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ	7
	АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.....	8
	ПУБЛИКАЦИИ.....	9
	СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ	12
	БЛАГОДАРНОСТИ.....	12
1.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1.	МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ.....	17
1.2.	ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ	20
1.3.	МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ПОДВИЖНОСТИ	24
2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1.	ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1.1.	<i>Приготовление препарата обонятельной выстилки лягушки</i>	<i>35</i>
2.1.2.	<i>Приготовление препарата обонятельной выстилки крысы</i>	<i>36</i>
2.1.3.	<i>Приготовление препарата обонятельного эпителия у кроликов.....</i>	<i>38</i>
2.1.4.	<i>Приготовление препарата обонятельного эпителия у человека.....</i>	<i>38</i>
2.2.	МЕТОДЫ ПРИЖИЗНЕННОЙ ТЕЛЕВИЗИОННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	39
2.3.	МЕТОДИКА СТИМУЛЯЦИИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ.....	40
2.4.	ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	41
2.5.	МЕТОДЫ ОБРАБОТКИ ВИДЕОСИГНАЛА	42
2.5.1.	<i>Первичная обработка видеоизображений</i>	<i>43</i>
2.5.2.	<i>Снятие первичных данных</i>	<i>44</i>
2.5.3.	<i>Спектральный анализ Фурье</i>	<i>44</i>
2.5.4.	<i>Вычисление энтропии</i>	<i>48</i>
2.5.5.	<i>Построение траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной этому движению (на подобие фигур Лиссажу)</i>	<i>49</i>
2.5.6.	<i>Преобразование движения обонятельных жгутиков в звуки</i>	<i>51</i>
2.6.	СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	53
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	54
3.1.	ИССЛЕДОВАНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ ВНЕ ДЕЙСТВИЯ ОДОРАНТОВ	54
3.2.	ИССЛЕДОВАНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОДОРАНТОВ	55
3.2.1.	<i>Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек, белых лабораторных крыс и кролика под действием амилowego спирта</i>	<i>55</i>
3.2.2.	<i>Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек под действием ванилина 62</i>	
3.2.3.	<i>Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек и белых лабораторных крыс под действием камфоры</i>	<i>65</i>
3.2.4.	<i>Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек и крысы под действием цинеола</i>	<i>69</i>
3.2.5.	<i>Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушки под действием сероводорода.....</i>	<i>73</i>
3.2.6.	<i>Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушки под действием аммиака 76</i>	

3.3.	ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ ВНЕ И ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОДОРАНТОВ	79
3.3.1.	<i>Исследование актин-миозиновой молекулярной системы биологической подвижности обонятельных жгутиков лягушки вне и под действием одорантов</i>	<i>79</i>
3.3.2.	<i>Исследование тубулин-динеиновой молекулярной системы биологической подвижности обонятельных жгутиков лягушки вне и под действием одорантов</i>	<i>86</i>
3.3.3.	<i>Исследование роли взаимодействия актин-миозиновой и тубулин-динеиновой молекулярных систем биологической подвижности обонятельных жгутиков лягушки вне и под действием одорантов</i>	<i>92</i>
4.	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	94
4.1.	ПОДВИЖНОСТЬ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ ВНЕ ДЕЙСТВИЯ СТИМУЛА	94
4.1.1.	<i>Тубулин-динеиновая молекулярная система биологической подвижности обонятельных жгутиков</i>	<i>95</i>
4.1.2.	<i>Актин-миозиновая молекулярная система биологической подвижности обонятельных жгутиков</i>	<i>100</i>
4.2.	ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ ЖГУТИКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОДОРАНТОВ.....	103
4.2.1.	<i>Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием амилового спирта и ванилина 106</i>	
4.2.2.	<i>Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием камфоры</i>	<i>108</i>
4.2.3.	<i>Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием цинеола</i>	<i>112</i>
4.2.4.	<i>Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков под действием сероводорода.....</i>	<i>114</i>
4.2.5.	<i>Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием аммиака</i>	<i>116</i>
5.	ВЫВОДЫ	121
6.	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	122
7.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	123

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Большой интерес современной науки к исследованиям обонятельной рецепции связан не только с изучением физиологических проблем обоняния, его роли в поведении и адаптации, как животных, так и человека, но также с возможностью решения ряда сложных технических задач и актуальных медицинских проблем.

Важность исследований обонятельной рецепции в области медицины основана на возможности создания сравнительно недорогих методов экспресс-диагностики ряда заболеваний, связанных с цилиопатиями и нейродегенеративными процессами. Так, например, ранняя диагностика таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона даёт возможность эффективно лечить, достигать стойкой ремиссии и благодаря этому повышать качество жизни пациентов.

Вместе с тем перед учёными и инженерами стоит проблема создания и повышения чувствительности искусственных химических анализаторов, которые смогут найти применение в различных областях науки и техники. И это тоже требует глубокого проникновения в механизмы обонятельной рецепции, включая двигательную активность обонятельных жгутиков. Заметим, что эти выросты цитоплазмы рецепторных клеток являются хорошей моделью для исследования обонятельной сенсорной системы.

Из-за своеобразных, сложных по траектории движений обонятельных жгутиков не представляется возможным описать их аналогично описанию движений ресничек. Поэтому, основываясь на данных, полученных Е.В. Бигдай [2004], Я.Н. Руденко [2007], В.В. Бекусовой [2010], при исследованиях периферического отдела обонятельного анализатора, мы описали локомоторные изменения обонятельных жгутиков в свете теории гетерогенности хеморецепции, сформулированной в 1970-х годах В. О.

Самойловым. Где, под гетерогенностью хемосенсорных систем понимается неоднородность их происхождения, структуры и функции.

Изучая гетерогенность локомоторных процессов в обонятельных жгутиках, мы предприняли попытку понять участие их двигательной активности в обонятельной рецепции.

Цели и задачи

Цель работы: исследование гетерогенности локомоторных реакций обонятельных жгутиков (ОЖ) некоторых представителей позвоночных на стимуляцию их различными одорантами.

Для достижения цели решались следующие **задачи**:

- 1) проанализировать двигательную активность обонятельных жгутиков в ответ на воздействие пахучими веществами, обладающими различными запахами: прогорклым (амиловый спирт), цветочным (ванилин), камфорным (d-камфора), эвкалиптовым (цинеол), гнилостным (β -меркаптоэтанол), едким (аммиак);
- 2) методами прижизненной телевизионной микроскопии высокого разрешения с применением фармакологического анализа изучить роль актин-миозиновой и тубулин-динеиновой молекулярных систем биологической подвижности;
- 3) посредством математических методов оценить локомоторные реакции обонятельных жгутиков на одоранты;
- 4) исследовать взаимодействие тубулин-динеиновой и актин-миозиновой систем в осуществлении движений обонятельных жгутиков с позиции теории гетерогенности хемосенсорных систем.

Основные положения. выносимые на защиту:

- 1) в отсутствие одорантов обонятельным жгутикам присуща неупорядоченная двигательная активность в режиме рыскания, которая обеспечивается тубулин-динеиновой молекулярной системой биологической подвижности;
- 2) кратковременное упорядочение движений обонятельных жгутиков вне действия пахучих веществ происходит благодаря непродолжительной спонтанной полимеризации актина в дистальном отделе обонятельных жгутиков;
- 3) процесс рецепции одорантов сопровождается стойким упорядочением двигательной активности обонятельных жгутиков, вследствие образования актиновых филаментов в их дистальных отделах;
- 4) взаимодействие неупорядоченных и упорядоченных движений жгутиков обонятельных клеток создаёт условия для эффективного влияния подвижности на обонятельную чувствительность;
- 5) характер изменений подвижности обонятельных жгутиков в процессе обоняния одорантов у лягушек, крыс, кроликов и человека аналогичен.

Научная новизна:

Впервые методом прижизненной телевизионной микроскопии с использованием математических методов объективного анализа было показано, что неупорядоченная двигательная активность обонятельных жгутиков осуществляется за счёт тубулин-динеиновой молекулярной системы биологической подвижности, а процесс упорядочения движения — посредством актин-миозиновой молекулярной системы подвижности. Доказана гетерогенность локомоторной реакции обонятельных жгутиков, что

дополняет представления о гетерогенности обонятельной рецепции. Разработана функциональная модель для прижизненного изучения молекулярных механизмов немышечной подвижности. Установлена возможность применения колхицина для прижизненных исследований двигательной активности немышечных клеток.

Теоретическая и практическая значимость

Работа имеет важное теоретическое и практическое значение для развития физиологии и биофизики хемосенсорных систем. Она расширяет представление об их гетерогенности. Кроме имеющихся в литературе доказательств гетерогенности рецепторных процессов, гетерогенность обоняния проявляется также в разнообразном двигательном ответе обонятельных жгутиков на воздействие различных одорантов.

Разработаны и использованы прижизненные методы изучения немышечных систем подвижности, на основании которых были сделаны выводы о роли молекулярных систем биологической подвижности в двигательной активности обонятельных жгутиков.

Механизмы локомоторных реакций обонятельных жгутиков на одоранты аналогичны механизмам реорганизации цитоскелета у мигрирующих клеток в градиенте концентрации хемоаттрактанта при хемотаксисе.

Показано, что обонятельные жгутики могут использоваться в качестве модели для изучения механизмов немышечной подвижности и имеют ряд преимуществ перед аналогичными моделями.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах физиологии в высших учебных заведениях медицинского и биологического профиля, а также в научном обосновании технического моделирования обоняния (создании «электронного носа»).

На основе полученных в нашей работе данных о двигательной активности обонятельных жгутиков под действием одорантов и вне их воздействия могут быть разработаны новые медицинские технологии для диагностики и лечения заболеваний, которые проявляются в нарушениях подвижности обонятельных жгутиков.

Апробация работы

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на научно-практических конференциях: итоговые заседания военно-научного общества курсантов и слушателей ВМА им. С.М. Кирова (СПб, 2009, 2011, 2012 гг.); научно-практические конференции с международным участием «НЕДЕЛЯ НАУКИ СПбГПУ» (СПб, 2009, 2010, 2011 гг.); V международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (СПб, 2009), VII Всероссийская конференция с международным участием, посвящённая 160-летию со дня рождения И.П. Павлова «Механизмы функционирования висцеральных систем» (СПб, 2009 г.), IV международный конгресс «Нейробиотелеком-2010» (СПб, 2010г.), XXI съезд физиологов (Калуга, 2010 г.), Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды» (СПб, 2010 г.), Международная научная конференция «Измерительные и информационные технологии в охране здоровья МетроМед» 2011 (СПб, 2011 г.), V международный конгресс «Нейробиотелеком-2012» (СПб, 2012 г.).

Результаты работы внедрены в практику работы лаборатории физиологии и биофизики клетки, научного отдела физиологии сенсорных систем Института физиологии им. И.П. Павлова Российской Академии Наук в качестве методических рекомендаций для исследования обонятельных жгутиков млекопитающих.

Полученные данные использованы в курсе лекций по нормальной физиологии в ВМА им. С.М. Кирова и по биофизике в СПбГПУ и СПбГМУ им. И.И. Мечникова.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 6 статей из них 4, рецензируемые ВАК, 11 тезисов в которых нашли отражение теоретические принципы и результаты работы.

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Панов С.А., Участие тубулин-динеиновой молекулярной системы в двигательной активности обонятельных жгутиков. / С.А. Панов, Е.В. Бигдай, Б.А. Дудич, В.О. Самойлов // Вестник Военно-медицинской академии. – 2013. – том 3, вып. 43. – с. 130-134.

2. Бигдай Е.В., Объективные критерии оценки перехода неупорядоченной двигательной активности обонятельных жгутиков в упорядоченную. / Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов, В.В. Бекусова, Э.В. Крыжановский, Б.А. Дудич, С.А. Панов // Биофизика. – 2010. – том 55, вып. 5. – с. 886-891.

3. БигдайЕ.В., Опорно-двигательный аппарат обонятельных клеток. / Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов, С.А. Панов, Б.А. Дудич, // Цитология. – 2012. – том 54, вып. 9. – с. 666–667.

4. Самойлов В.О., Молекулярные машины опорно-двигательных аппаратов респираторных ресничек и обонятельных жгутиков. /В.О. Самойлов, Е.В. Бигдай, Э.В. Крыжановский, Б.А. Дудич, С.А. Панов, Д.Д. Смирнов, А.С. Нестеров // Биофизика. – 2013. – Т.58, вып.2. – с. 269-275.

Работы, опубликованные в материалах конференций

5. Самойлов В.О., Молекулярные и субклеточные механизмы биологической подвижности в висцеральных и сенсорных системах. / В.О. Самойлов, Е.В. Бигдай, В.В. Шабалин, С.А. Захарова, С.А. Панов, В.В. Бекусова // Механизмы функционирования висцеральных систем: VII Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 160-летию со дня рождения И.П.Павлова. Тезисы докладов. – СПб. – 2009. – с. 386-387.

6. Бигдай Е.В., Сверхслабые взаимодействия в обонянии. / Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов, С.А. Панов // В кн.: V международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения биологии и медицине». Тезисы. – 2009. – с.23.

7. Самойлов В.О., Двигательная активность обонятельных жгутиков и хемотаксис. / В.О. Самойлов, Е.В. Бигдай, В.В. Бекусова, Э.В. Крыжановский, Б.А. Дудич, С.А. Панов // Материалы конференции Нейробиотелеком-2010. – СПб. – 2010. – с. 190-194.

8. Бигдай Е. В., Взаимодействие актин-миозиновой и динеин-тубулиновой систем подвижности обонятельных жгутиков в рецепции пахучих веществ. / Е. В. Бигдай, В. О. Самойлов, Э. В. Крыжановский, С. А. Панов, Б. А. Дудич // Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды». – СПб. – 2010. – с. 104.

9. Крыжановский Э.В., Методы и алгоритмы анализа двигательной активности обонятельных жгутиков. / Э.В. Крыжановский, В.О. Самойлов, Е.В. Бигдай, В.В. Бекусова, Б.А. Дудич, С.А. Панов // Материалы конференции Нейробиотелеком-2010. – СПб. – 2010. – с. 289.

10. Бигдай Е.В., Метрологические аспекты исследования двигательной активности немышечных клеток. / Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов, Б.А. Дудич, С.А. Панов // Международная научная конференция Измерительные и

информационные технологии в охране здоровья МетроМед 2011. Сборник научных трудов. – СПб. – 2011. – с. 62-64.

11. Панов С.А. Упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков под действием амилового спирта/ С.А. Панов// // Тезисы докладов XXXVIII Международной научно-практической конференции «НЕДЕЛЯ НАУКИ СПбГПУ». – СПб, 2009. – с. 23

12. Панов С.А. Влияние одорантов на двигательную активность обонятельных жгутиков земноводных и млекопитающих. / С.А. Панов // Тезисы докл. апрельской конф. ВНОКС. – СПб., ВМедА – 2009. – с. 38-39.

13. Панов С.А., Роль актин-миозиновой системы в изменении подвижности обонятельных жгутиков млекопитающих. / С.А. Панов // Тезисы докладов XXXIX Международной научно-практической конференции «НЕДЕЛЯ НАУКИ СПбГПУ». – СПб. – 2010. – с. 425-426.

14. Панов С.А., Упорядочение подвижности обонятельных жгутиков млекопитающих под действием одорантов. / С.А. Панов // Тезисы докладов XL Международной научно-практической конференции «НЕДЕЛЯ НАУКИ СПбГПУ». – СПб. – 2011. – с. 440-442.

15. Панов С.А., Упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков под действием пахучих веществ. / С.А. Панов // Тезисы докл. апрельской конф. ВНОКС. – СПб., ВМедА. –2011. – с. 168-169.

16. Панов С.А., роль тубулин-динеиновой системы подвижности в подвижности обонятельных жгутиков. / С.А. Панов. // Тезисы докл. апрельской конф. ВНОКС. – СПб., ВМедА. –2012. – с. 63-64.

17. Панов С.А., Гетерогенность двигательной активности обонятельных жгутиков. / С.А. Панов // Сборник научных трудов «Нейробиотелеком-2012». – СПб. – 2012. – с. 125-128.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Полный объем диссертации составляет 134 страниц, в том числе 41 рисунок и 1 таблица. Список литературы содержит 115 наименований из них 31 на русском и 84 – на иностранных языках.

Благодарности

За помощь в осуществлении столь важного для науки дела, как исследование неизведанного хочу поблагодарить:

Научных руководителей за помощь, направление и опеку, особенно за то, что научили мыслить по-новому заведующего лабораторией физиологии и биофизики клетки, профессора, доктора медицинских наук, член-корр. РАН Самойлова Владимира Олеговича, профессора, доктора биологических наук Бигдай Елену Владимировну.

За помощь в создании программ для обработки полученного видеоматериала руководителя НИЛ телеметрии и биомедицинских технологий СПбГТ им. Бонч-Бруевича, доктора технических наук Крыжановского Эдварда Владимировича, сотрудника НИЛ телеметрии и биомедицинских технологий СПбГТ им. Бонч-Бруевича Григорян Армена Гарегиновича.

За создание программ, с помощью которых мы осуществили все вычисления – аспиранта 1-го года обучения СПбГПУ, биофизика Дудича Бориса Александровича.

За предоставление возможности работать и проводить исследования с использованием конфокальной микроскопии руководителя группы

конфокальной микроскопии и анализа изображений в клеточной биологии Института цитологии РАН, к.б.н., ведущего сотрудника Штейна Григория Израилевича.

За предоставление образцов тканей человека – доктора медицинских наук, ведущего научного сотрудника отдела разработки и внедрения высокотехнологичных методов лечения СПб НИИ уха, горла, носа и речи, д.м.н. Захарову Галину Парфирьевну.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Жгутики и реснички представляют собой выросты цитоплазмы. В отечественной литературе их принято разделять.

Жгутик – цитоплазматические выросты клетки, свойственные всем жгутиковым, многим бактериям, зооспорам, сперматозоидам [БСЭ, 1972].

Реснички – тонкие ните- или щетинковидные выросты поверхности клеток, способные совершать ритмичные движения [БСЭ, 1972].

В зарубежной литературе нередко их объединяют термином «цилия».

Реснички традиционно подразделяют на неподвижные и подвижные.

Неподвижные реснички, присутствующие в хрящевых клетках – хондроцитах, участвуют в формировании нормальных костей конечностей. С помощью неподвижных ресничек остециты ощущают изменения окружающей среды и получают сигналы об активации ремоделирования костей.

Подвижные реснички, благодаря ритмичным движениям в маточных трубах, создают ток жидкости, обеспечивающий захват и передвижение яйцеклетки. Согласованное биение ресничек респираторного эпителия, создавая восходящий ток слизи, очищает внутреннюю поверхность бронхов и трахеи.

Жгутики так же бывают подвижными и неподвижными.

Неподвижные жгутики, часто видоизменённые, найдены в фоторецепторных клетках позвоночных животных и моллюсков, в слуховых клетках позвоночных и насекомых, в клетках органов равновесия позвоночных, ракообразных и моллюсков [Винников Я.А., 1971].

Подвижными жгутиками снабжены аурикулярные клетки планарий – *Dugesia tigrina*, а также фоторецепторные клетки глазков иглокожих (морских звёзд) [Винников Я.А., 1971]. Дендрит обонятельных клеток на апикальном конце образует булаву, от которой отходят подвижные обонятельные жгутики

в количестве от одного до нескольких десятков в зависимости от вида животных. Обонятельным жгутикам присуща локомоторная и рецепторная функции, причём подвижность способствует высокой чувствительности к химическим веществам [Бронштейн А.А., 1977, Винников Я.А. 1971, Самойлов В.О. 2002, Бигдай Е.В., 2004, Руденко Я.Н., 2007, Бекусова В.В., 2010].

Таким образом, жгутикам и ресничкам присуща подвижность.

Нарушение нормального функционирования ресничек и жгутиков, приводящие к патологическим процессам и дисфункциям в разных органах человека, называются цилиопатиями.

При синдроме Барде-Бидля (цилиопатии) в сочетании с умственной отсталостью, ожирением, слепотой, поликистозом почек, также наблюдается гипо- или аносмия [Jenkins P.M. et al., 2009]. Некоторые авторы [Kulaga H.M. et al., 2004] считают, что нарушения восприятия запахов связаны с дефектом развития и нарушением структуры обонятельных жгутиков.

Пациенты, страдающие муковисцидозом, уже к 28 годам практически полностью теряют способность ощущать запахи. Опыты на мышах, больных муковисцидозом, показали, что на фоне полиморфологических нарушений отсутствуют и обонятельные жгутики в обонятельном эпителии (ОЭ), что вызывает нарушение функции восприятия запахов [Леднева В.С., 2013].

Синдром Лебера или врождённый амовроз – это заболевание проявляется в основном у молодых мужчин в виде врождённой дистрофии сетчатки, причиной которой является мутация генов, кодирующих протеины, обеспечивающие метаболизм и фототрансдукцию в сетчатке. Вместе с основными симптомами у данных пациентов отмечается ослабление обоняния. Это связано с нарушением положения G_{olf} белка в мембране обонятельных жгутиков [Jenkins P.M. et al., 2009].

Симптомами синдрома Ушера – являются слепота, глухота, уменьшение активности сперматозоидов, аномалии ресничек респираторного эпителия, а также снижение остроты обоняния [Jenkins P.M. et. al., 2009].

Дефицит обоняния является ранним, а иногда и единственным диагностическим признаком некоторых нейродегенеративных заболеваний.

К раннему диагностическому признаку болезни Альцгеймера относится повышение обонятельных порогов и неспособность различать запахи [Devanad D.P. et al., 2000]. Этот признак характерен именно для болезни Альцгеймера, так как не встречается при других нейродегенеративных заболеваниях, например, при болезни Хаттингтона, а также при депрессии.

Болезни Паркинсона и амниотропный латеральный склероз также сопровождаются дефицитом обоняния.

Таким образом, изучение периферического отдела органа обоняния является перспективным направлением для создания методик экспресс-скрининга нейродегенеративных заболеваний и цилиопатий.

1.1. Морфофункциональная характеристика обонятельного эпителия

Обонятельный эпителий включает 4 типа клеток: обонятельные, опорные, базальные, микровиллярные [Шепелева В.К., 1971; Elsaesser R., Pausan J., 2005; 2007].

Микровиллярные клетки встречаются у большинства позвоночных. Их особенностью является наличие микровилл на апикальной поверхности клетки. Функция этих клеток пока остаётся не ясной. Известно, что они не дегенерируют после разрушения обонятельной луковицы, что доказывает их не нейрональное происхождение. Следовательно, их участие в восприятии запахов маловероятно.

Существует предположение [Elsaesser R., Pausan J., 2007], что этот тип клеток экспрессирует нейропептид γ , который является регулятором регенерации обонятельных клеток, осуществляя местную регуляцию этого процесса в обонятельном эпителии.

Рецепция запахов осуществляется обонятельными рецепторными клетками, относящимися к первичночувствующим (нейросенсорным) биполярным нейронам. Тела их имеют веретенообразную форму с поперечным диаметром 5-8 мкм. От апикального полюса тела обонятельной клетки отходит периферический отросток длиной 20-30 мкм и диаметром 0,8-4,0 мкм, который на поверхности эпителия заканчивается утолщением – обонятельной булавой, увенчанной обонятельными жгутиками. От базального полюса тела клетки начинается тонкий аксон толщиной 0,1-0,3 мкм, который объединяется с другими аксонами, тянется в обонятельную луковицу переднего мозга, образует обонятельный нерв, осуществляя связь обонятельных рецепторных клеток с первичными обонятельными центрами [Бронштейн А.А., 1971].

Опорные клетки имеют форму рюмки, а их апикальная поверхность покрыта микровиллами длиной 1,5-2 мкм. Эти клетки полифункциональны: являются физической опорой обонятельным клеткам, выполняют

трофическую функцию, осуществляя транспорт веществ к рецепторным клеткам, участвуют в удалении погибших клеток.

Между мембранами дендритов обонятельных клеток и мембранами опорных клеток образуются плотные контакты в виде пояса, создавая диффузный барьер между наружной средой и межклеточным пространством [Zhang C., 2010]. С окружающей средой контактирует только малая часть обонятельной клетки, представленной участком обонятельной булавки и обонятельными жгутиками (ОЖ).

Методами *in situ* гибридизации и иммуногистохимии между опорными и рецепторными клетками обонятельного эпителия мышей и амфибий обнаружены щелевые контакты, образованные коннексином 43 [Zhang C. et al., 2000]. В обонятельных клетках они выполняют координирующую функцию и участвуют в передаче ионов и метаболитов в процессе роста, дифференцировки клеток и первичной обработки сигнала. С их участием происходит изменение чувствительности обонятельных клеток, в следствие тока ионов через щелевые контакты, и обмен информацией между соседними клетками. Благодаря этому опорные клетки обеспечивают периферическую обработку информации и участвуют в усилении сигнала. Это также подтверждается тем фактом, что снижение количества щелевых контактов приводит к ослаблению чувствительности обонятельного анализатора [Zhang C., 2010].

Обонятельные клетки живут около 35 дней и отмирают. Отмершие клетки обонятельного эпителия заменяются новыми за счёт пула базальных клеток. Они располагаются в базальном слое обонятельной выстилки и относятся к нейрональным стволовым мультипотентным клеткам. Их подразделяют на горизонтальные, прилежащие к базальной мембране и глобулярные базальные клетки, расположенные над горизонтальными. Над слоем базальных клеток располагается слой не зрелых обонятельных клеток и самый верхний слой состоит из зрелых обонятельных клеток [Hahn C.G. et al.,

2005]. Дифференцировка и специализация обонятельных клеток происходят параллельно с их миграцией от базальной мембраны к апикальной поверхности эпителия. Эти процессы обеспечивают обновление клеточного состава обонятельного эпителия каждые 3–4 недели [Schwob J.E., 2002]. процесс регенерации обонятельных клеток и их созревание сопровождаются цилиогенезом [Mair R.G., 1982]. Созревшая рецепторная клетка должна иметь обонятельные жгутики определённой длины, в мембрану которой встроены белки, обеспечивающие механизмы обонятельной трансдукции. Заканчивается процесс регенерации проращением аксономы новых клеток в сохранившиеся оболочки Швановских клеток, окружающих пучки старых волокон, и появлением синоптических связей в гломерулах обонятельной луковицы. На этом этапе происходит восстановление обонятельной функции [Овчинников Ю.М. и др., 1999].

Клетки обонятельного эпителия отделены от окружающей среды слоем слизи, которая секретируется частично опорными клетками, частично Боуменовыми железами. Обонятельная слизь выполняет ряд важных функций. Во-первых, она обеспечивает физическую и химическую защиту клеток ОЭ от внешних повреждающих воздействий [Grubb B.R. et al., 2007]. Во-вторых, благодаря таким свойствам, как вязкость, эластичность и проницаемость, слизь способна экранировать эпителий от некоторых веществ, придавая процессам переноса молекул через неё селективный характер. В-третьих, не маловажная функция слизи – это транспорт кислорода. Было показано, что обонятельная выстилка большую часть кислорода получает из окружающего воздуха в процессе акта дыхания [Гладышева О.С., 1982]. В-четвертых, поддержание постоянного рН среды.

Регуляция уровня рН слизи осуществляется за счёт работы $V H^+$ -АТФазы [Paunescu T.G. et al, 2008]. $V H^+$ -АТФаза отвечает за подкисление внутриклеточных органелл и регулирования рН внеклеточных отделов. Она была обнаружена в клетках Боуменовых желёз, в субапикальной области

опорных клеток, а также в микровиллах опорных клеток и латеральной мембране определённых подгрупп обонятельных клеток, которые содержат также карбангидразу типа IV. Таким образом, этот фермент участвует в секреции H^+ в обонятельном эпителии и выполняет важную роль по поддержанию pH в обонятельной слизи и детекции CO_2 . Предложена гипотеза, согласно которой продукция H^+ и $H_2CO_3^-$, катализируемая КАГ, является посредником для открытия цГМФ-чувствительных ионных каналов в определённой популяции обонятельных клеток. Поэтому pH слизи обонятельного эпителия влияет на чувствительность к запахам.

1.2. Гетерогенность обонятельных жгутиков

В слое обонятельной слизи расположены разнонаправленно двигающиеся выросты плазмолеммы обонятельной булавки – обонятельные жгутики. [Бронштейн А.А., 1971]. Количество и размеры обонятельных жгутиков на одной рецепторной клетке варьируют у животных разных видов. Так, обонятельные клетки мышей имеют 9-16 обонятельных жгутиков длиной 250 мкм [Grubb V.R. et al., 2007]. Они лежат в слое обонятельной слизи параллельно обонятельному эпителию, образуя плотный слой, толщиной примерно 3,3 мкм. При исследовании обонятельной выстилки быка методом высоковольтной трансмиссионной электронной микроскопии с криоультрамикроскопией [Menco V.P.M. et al., 1978] было выявлено, что обонятельные жгутики имеют длину 50–60 мкм и суживаются в области дистального сегмента, при этом располагаются параллельно поверхности обонятельного эпителия. При фазовоконтрастной микроскопии обонятельного эпителия зелёных лягушек было установлено, что каждая клетка имеет, как правило, 6–9 обонятельных жгутиков длиной 20–30 мкм, но некоторые из них достигают в длину 100 мкм [Бронштейн А.А., 1977].

По мнению Menco V.P.M. [1992] роль обонятельных жгутиков заключается в увеличении площади рецепторной поверхности. Так, например, на обонятельном эпителии быка площадью 1 см^2 рецепторная поверхность в

сумме составляет примерно 20 см². При этом обонятельные жгутики выдаются на большое расстояние от булавы, перекрывая обонятельные жгутики других клеток. Этот «переплетающийся ковёр» обеспечивает значительное увеличение обонятельной поверхности, вследствие чего повышается чувствительность обоняния. У гиперосматиков количество жгутиков больше, и они длиннее, чем обонятельные жгутики других животных.

Бронштейн А.А. [1977] в своих работах показал, что обонятельные жгутики всех позвоночных подвижны (методом фазово-контрастной прижизненной микроскопии). Короткие тонкие и толстые обонятельные жгутики колеблются неупорядоченно с разной частотой: от 20 до 40–50 колебаний в минуту – первые, от 15 до 30 колебаний в минуту – вторые, а частота колебаний длинных обонятельных жгутиков составляет 10–15 колебаний в минуту [Firestein S. et al., 1990; Frings S., Lindeman B., 1991, Rhein L.D. et al., 1980].

При изучении обонятельного эпителия методом прижизненной микроскопии Mair R.G. [1982] наблюдал подвижные обонятельные жгутики лягушек. Среди обонятельных жгутиков он выявил подвижные – короткие, и неподвижные – длинные. Подвижные обонятельные жгутики он разделил на 2 группы. Одну называл «stokers» (взмах, удар), в неё входили обонятельные жгутики длиной 10 - 50 мкм, движущиеся медленно и хлыстообразно. Другую группу автор называл «wiggles» (извивание). Они короче обонятельных жгутиков первой группы (10 - 20 мкм в длину) и движутся быстрее по более сложной траектории. Все эти типы обонятельных жгутиков по-разному распределены по всей поверхности обонятельного эпителия, у разных лягушек данного вида.

Длинные неподвижные жгутики у лягушек в ходе созревания обонятельных клеток начинают появляться через 27 дней, а к 45 дню достигают максимальной своей длины примерно 140 мкм [Mair R.G., 1982]. Вместе с тем известно, что срок жизни обонятельных клеток лягушек

составляет 60 дней. Следовательно, длинные и неподвижные обонятельные жгутики появляются к концу жизни обонятельной клетки, то есть характерны для стареющих клеток.

Попытка изучения двигательной реакции обонятельных жгутиков лягушек на различные стимулы, в частности, на уменьшение концентрации Ca^{2+} и Mg^{2+} показала, что подвижность обонятельных жгутиков уменьшалась. В присутствии 2 мМ ЭГТА (в безкальциевом растворе) обонятельные жгутики останавливались.

При исследовании влияния паров одорантов (амилацетат, d-лимонен, пиридин) на поведение обонятельных жгутиков различий в движении обнаружено не было. Вероятно, применение пахучих веществ в высокой концентрации не позволило выявить особенности двигательной реакции обонятельных жгутиков на различные вещества.

Обонятельные жгутики имеют сложный и не однородный белковый состав. Так, дистальные и проксимальные сегменты обонятельных жгутиков различаются по содержанию белков. В зрелом возрасте в дистальном отделе обонятельных жгутиков локализуются такие белки, как аденилатциклаза III, G_{olf} , CNG-каналы, которые являются компонентами внутриклеточных сигнальных систем. В дистальном отделе обонятельных жгутиков сосредоточены молекулярные механизмы ольфакторной трансдукции. В свою очередь, расположение сигнальных молекул в зоне, на которую действуют пахучие молекулы, может повышать эффективность обонятельной рецепции [Jenkins P.M. et al., 2009].

В мембране обонятельного жгутика располагаются обонятельные рецепторы. В одной обонятельной клетке обычно экспрессируется мембранный рецептор для одного одоранта, хотя бывают случаи, когда могут экспрессироваться несколько видов обонятельных рецепторов [Rawson N.E., 2000]. Это единственный участок мембраны всего обонятельного анализатора, в которую встроены рецепторные белки.

Молекулярные комплексы, реагирующие на одоранты, были впервые идентифицированы [Strotmann J. et al., 1992] у нематод и крыс. Обонятельные рецепторы представляют собой семидоменную молекулу, сопряжённую с G-белком. Он активирует либо аденилатциклазный, либо фосфоинозитидный каскад реакций с открытием кальциевых каналов. Ток Ca^{2+} внутрь клетки вызывает открытие Ca^{2+} -зависимых Cl^- -каналов, что в итоге приводит к деполяризации мембраны и генерации импульса.

Помимо этого, восприятие различных одорантов обеспечивается разными внутриклеточными сигнальными системами, локализованными в рецепторных клетках [Бигдай Е.В., 2004]. Взаимодействие обонятельных рецепторов с такими одорантами, как амиловый спирт, амилацетат и цинеол инициирует активацию сигнальной системы цАМФ в обонятельных жгутиках клеток, экспрессирующих рецепторы к этим веществам. Причём, если амиловый спирт и амилоацетат реагируют с 7-доменными рецепторами, то цинеол в активацию АЦ III вовлекает тирозинкиназу. В обонятельную трансдукцию камфоры и ванилина вовлекается фосфоинозитидный путь, причём фосфолипаза С активируется ванилином через G-белок, а камфорой – через тирозинкиназу.

Камфора и цинеол, являющиеся монотерпенами, но обладающие разными запахами, вначале включают одинаковый механизм преобразования сигналов – активируют тирозинкиназу, тогда как последующие звенья трансдукции для них различны: для камфоры – фосфолипаза С, а для цинеола – аденилатциклаза [Бигдай Е.В., 2004].

Амиловый спирт, камфора, цинеол, амилацетат и ванилин активируют в обонятельных клетках дыхательную цепь митохондрий [Бигдай Е.В., 2004, Руденко Я.Н., 2007].

Аммиак и сероводород ингибируют в обонятельных рецепторах дыхательную цепь митохондрий без участия внутриклеточных сигнальных систем, но механизмы их прямого влияния на митохондриальные

окислительно-восстановительные процессы различны: аммиак ингибирует ферментативный комплекс I, а сероводород блокирует транспорт электронов во всех комплексах дыхательной цепи [Бигдай Е.В., 2004].

1.3. Молекулярные системы обонятельной подвижности

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, и 2 синглетные микротрубочки в центре) и управляемый динеиновыми ручками (рис. 1). Однако изучение роли аксонемы в подвижности обонятельных жгутиков и в рецепции запахов не проводилось.

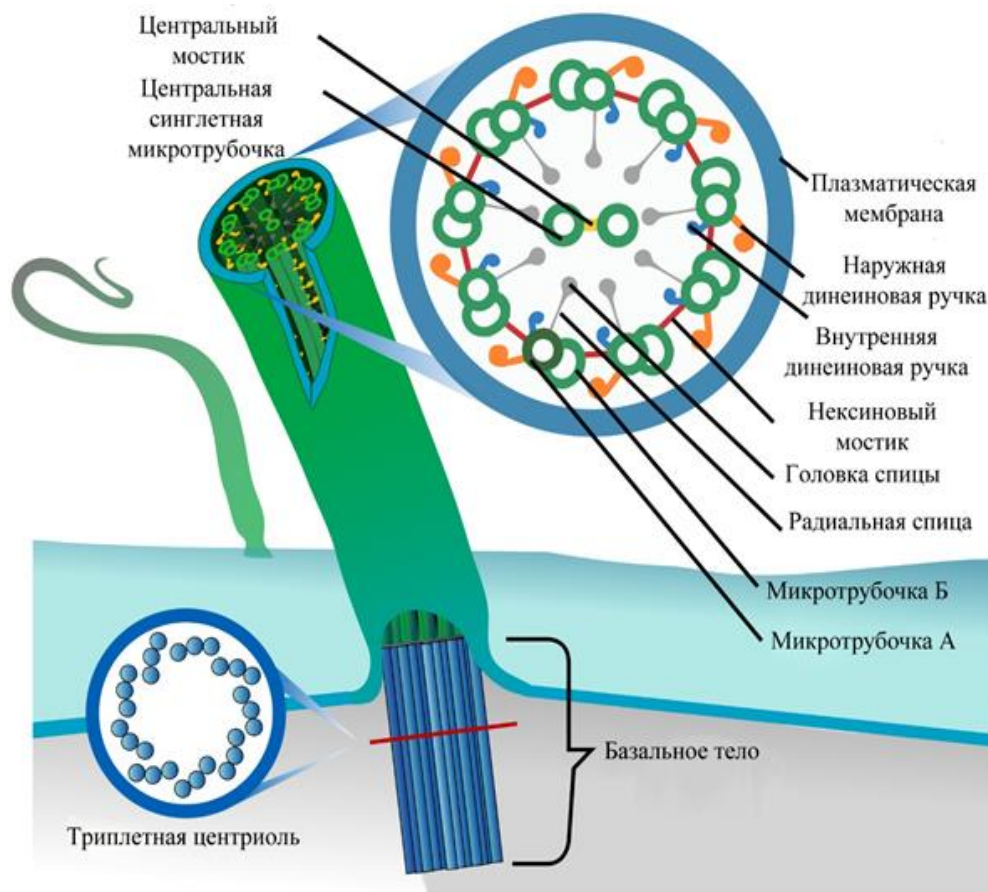


Рис. 1. Схема ультраструктурной организации реснички

Основание аксонемы расположено в цитоплазме и вместе с

прилегающими к нему структурами получило название базального тельца жгутика или блефаропласта, дистальная часть аксонемы находится внутри самого жгутика. Помимо микротрубочек в состав аксонемы входит большое количество элементов, обеспечивающих подвижность периферических дублетов относительно друг друга: динеиновые ручки, нексиновые мостики и аппарат центральной пары образованный радиальными спицами, двумя синглетными микротрубочками и центральной капсулой. К настоящему времени в составе аксонемы и примыкающих к ней структур идентифицировано уже более 250 различных белков [Dutcher, S. K., 1995]

Радиальные спицы, отходящие от периферических микротрубочек к центральной паре, представляют собой Т-образные структуры, крепящиеся к А-микротрубочкам периферических дублетов и обращённые расширенным концом к центру аксонемы. Строение и функции радиальных спиц изучены недостаточно. Известно, что они состоят из многих белков. Состав радиальных спиц высококонсервативен: для 12 из 18 белков радиальных спиц аксонемы жгутиков хламидомонад найдены гомологи в аксонемах жгутиковых структур человека [Yang P., 2006].

Мостики, связывающие между собой периферические дублеты, и капсула вокруг центральной пары микротрубочек образованы белками, получившими название нексины.

Особенность ОЖ состоит в том, что полноценная аксонема обнаруживается не на всем протяжении жгутика, а только в проксимальном отделе [Бронштейн, А.А., 1977, Reese T.S., 1965]. 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, в ОЖ лягушек проксимальный участок с полноценной аксонемой составляет всего от 4 до 40 мкм при общей длине жгутика от 20 до 200 мкм — соответственно [Бронштейн А.А., 1974]. У млекопитающих, обладающих ОЖ длиной

примерно 50 – 60 мкм, проксимальный отдел занимает всего 2–3 мкм [Менсо В.Р.М., 1992]. 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.

Каждый из 9 периферических дуплетов аксонемы построен из полной микротрубочки (субфибриллы А), образованной 13 тубулиновыми протофиламентами, и неполной (субфибриллы В), составленной из 10 тубулиновых протофиламентов. Полная и неполная микротрубочки соединяются между собой таким образом, что 3 “лишних” протофиламента трубочки А становятся общими для субфибрилл А и В. Кроме того, субфибрилла А одного дублета взаимодействует с неполной микротрубочкой (В) соседнего дублета посредством пары тангенциально ориентированных боковых ручек, образованных динеином. Динеиновые ручки работают как “цитомышцы” на “цитокостях” (микротрубочке). Обычно “цитокости” и “цитомышцы” объединяют термином “цитоскелет”. Тандем тубулина с динеином лучше называть опорно-двигательным аппаратом клетки, образованным цитоскелетом (“цитокостями”) и мотором (“цитомышцами”) [Самойлов В.О. и др, 2013].

Гомологичность 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 могут быть аналогичны таковым в ОЖ.

В свою очередь, при электронной микроскопии, произведённой Kerjaschki D. [1976], не было выявлено динеиновых ручек в дистальных отделах обонятельных жгутиков мышей. На основании этого автор сделал вывод, что дистальные участки обонятельных жгутиков не способны к

самостоятельной подвижности. Однако, эти выводы были сделаны при морфологических исследованиях фиксированных препаратов.

Группа учёных [Breipohl W. et al., 1980] показала существование динеиновых ручек в обонятельных жгутиках цыплят, и на основании своих данных о молекулярной структуре обонятельных жгутиков сделала вывод, подтверждающий существование у них активной подвижности.

Динеин – моторный белок, с молекулярной массой 1000-2000 кДа, способный перемещаться по поверхности микротрубочек цитоскелета, и трансформировать химическую энергию, содержащуюся в АТФ, в механическую энергию движения. Аксонемальный динеин существует в нескольких формах, содержащих 1, 2 или 3 тяжёлые цепи (головки) (в зависимости от вида и расположения в ресничке). Каждая тяжёлая цепь является глобулярным двигателем (напоминающим «стебель»), связанным с микротрубочкой. От «стебля» отходят динеиновые ручки (похожие на «хвосты»), которые крепятся к соседним микротрубочкам той же аксонемы. Каждая молекула динеина образует мост между двумя соседними микротрубочками цилиарной аксонемы. Присоединение АТФ к двигателю приводит к конформационным изменениям, которые вызывают сдвиг динеиновых ручек. В результате одна микротрубочка скользит относительно другой [Karr G., 2005]. Это скольжение приводит к изгибу реснички или жгутика.

Динеиновые ручки разделяются на внутренние и наружные. Внутренние динеиновые ручки регулируют амплитуду изгибов, испытываемых ресничкой в фазу эффективного замаха, а параметры изгибов реснички влияют на форму ее биений. В конце изгиба пара наружных дублетов сдвигается друг относительно друга на кончике сгибающейся реснички не более чем на 0,1 мкм. За одиночный удар одна динеиновая ручка способна сдвинуть микротрубочки на 4–16 нм. Следовательно, необходим от 12 до 50

последовательных движений динеиновых ручек, чтобы обеспечить одиночный удар реснички [Salate M., 2007, Bui K.N. et al., 2009].

Наружные динеиновые ручки контролируют общую координацию (синхронизацию), частоту и амплитуду колебаний ресничек. Это происходит посредством изменения скорости скольжения дуплетов в аксонеме, что определяется скоростью, с которой динеиновые ручки отцепляются от микротрубочек после эффективного удара.

Одиночная наружная динеиновая ручка генерирует силу в 1–5 пН, а для преодоления сопротивления в двигательной системе реснички необходимо усилие приблизительно в 20 пН. Следовательно, биение реснички обеспечивается работой от 4 до 20 динеиновых ручек, что составляет 1% всех таких молекулярных структур, присутствующих в аксонеме. Если учесть диссипацию энергии, то оказывается, что в одном цилиарном биении участвует примерно 1000 активных динеиновых ручек [Lindeman C.B., 2003]. Все динеины, сосредоточенные на участке в 1 мкм (около 200 динеиновых головок) могут создавать тянущее усилие приблизительно в 990 пН – примерно в 1 нН [Lindemann C.B., 2003, 2010].

Модель взаимного скольжения [Hollwil M.E.J. et al, 1990] была сформулирована после появления гипотезы скользящих нитей (миозина и актина) в миоците. В обеих молекулярных системах биологической подвижности: актин-миозиновой и тубулин-динеиновой – происходит скользящее перемещение “цитокостей” относительно “цитомышц” за счет их натяжения.

Боковые ручки, расположенные в плоскости сгибания, которая перпендикулярна плоскости центральной пары микротрубочек, обеспечивают ресничке возвратно-поступательное движение. При эффективном ударе расстояния между ручками, расположенными на внутренней стороне изгиба, максимально укорачиваются, а на противоположной стороне изгиба – удлиняются. При замахе наблюдается противоположная картина. Механизм

переключения обусловлен механическим эффектом, поскольку сгибание изменяет взаимоотношения между динеиновыми ручками и микротрубочками. Ручки, лежащие в плоскости, перпендикулярной плоскости сгибания, остаются пассивными. Три крайних варианта взаимодействия динеиновых ручек упрощённо характеризуют механические процессы, происходящие в микротрубочке [Salate M., 2007]. Подобных исследований взаимодействия тубулина с динеином в обонятельных жгутиках не существует, но основываясь на консерватизме тубулин-динеиновой системы подвижности мы считаем, что аналогично взаимодействует динеин-тубулиновая система и в обонятельных жгутиках.

Группа молекул динеина, ответственная за изгиб в противоположном направлении, вероятно, работает на скоординированной основе с другими динеинами, что позволяет ресничкам и жгутикам двигаться вперёд и назад. В качестве координатора работы и регулятора активности динеинов был предложен комплекс, состоящий из центральной пары и радиальных спиц [Salate M., 2007].

При движении ресничек центральная пара совершает вращение, причём только она способна к ротации внутри аксономы. Локальный сигнал с микротрубочек центральной пары передаётся на радиальные спицы, которые, в свою очередь, активируют определённую группу внутренних динеиновых ручек. В ресничках ориентация эффективного удара фиксирована, а центральная пара подстраивается под неё, оставаясь в плоскости перпендикулярной направлению удара. При отсутствии центральной пары в аксонеме движение ресничек становится вращательным [Salate M., 2007]. Таким образом, этот комплекс, вращаясь, переключает динеины, прикрепленные к различным микротрубочкам, и регулирует скорость скольжения динеиновых ручек по микротрубочкам.

Согласно наблюдениям Kerjaschki D. [1976 г.], при прямом микроскопическом наблюдении за движениями обонятельных жгутиков

лягушки проксимальные толстые сегменты бьются нескоординировано и очень энергично, особенно после устранения дистальных сегментов. Дистальные сегменты, по-видимому, двигаются пассивно и притормаживают движения проксимальных частей. При исследовании препаратов обонятельной выстилки, кроме динеинов и тубулинов, в ОЖ лягушки-быка методом иммуноблотинга были обнаружены актин с молекулярной массой 46 кДа [Anholt R., 1993] и миозин VIIa [Wolfrum U. et al., 1998].

При исследовании фиксированных препаратов обонятельной выстилки лягушек с использованием конфокальной микроскопии [Бигдай Е.В., 2004] было установлено, что под действием пахучих веществ в дистальных отделах ОЖ из глобулярного актина образуется фибриллярный. Следовательно, в дистальной части ОЖ, лишённой тубулинового цитоскелета, под действием одоранта формируется актиновый цитоскелет. В отсутствие одорантов актиновые нити (F-актин) деполимеризуются. Благодаря этим фактам можно предположить наличие в дистальном отделе обонятельных жгутиков ещё одной молекулярной системы подвижности – актин-миозиновой.

К изучению этой системы, участвующей в движении ресничек и жгутиков, только подбираются. Тем не менее, обнаружены некоторые данные, которые указывают на то, что она играет определённую роль в этом процессе. Во-первых, миозин типа VII является общим компонентом подвижных ресничек и жгутиков. В большинстве клеток он сосредоточен в более высокой концентрации в проксимальной области или переходной зоне ресничек [Wolfrum U. et al., 1998].

Миозин VIIa в ресничках представляется необычным миозином. Его локализация в ресничках пока не понятна, так как в состав ресничек входят в первую очередь микротрубочки, а не актиновые филаменты. Реснички, в которых найден миозин VIIa, также содержат и актиновые филаменты. У подвижных ресничек актиновые филаменты обнаружены в аксонемах флагеллы – *Chlamidomonas*.

Актиновый цитоскелет постоянно реструктурируется, переходя из одной структуры актина в другую. Это жизненно необходимо клетке, так как позволяет не только быстро изменять свои механические свойства, но и совершать перемещение в пространстве, если эта клетка подвижна. Отдельные актиновые нити группируются в пучки, которые либо тянутся через всю цитоплазму, либо образуют осевые стержни, поддерживающие поверхностные выросты клетки (включая псевдоподии и филоподии), либо переплетаются в виде паутины, укрепляя плазмолемму. Актиновые микрофиламенты построены молекулами G-актина. В состав первичной структуры глобулярного актина входит 374 аминокислотных остатка.

В немышечных клетках поддерживается высокая концентрация неполимеризованного актина. В некоторых клетках содержание мономерного актина достигает около 100 мкМ. Клетки выработали механизм поддержания обширного пула G-актина, в котором большая роль у позвоночных животных, принадлежит тимозину - $\beta 4$ и профилину [Paulussen M., et al., 2009].

При концентрации 100 мкМ в физиологических условиях G-актин полимеризуется за несколько секунд. После полимеризации в цитозоле остается только 0,1 мкМ мономеров. Это весьма динамичная структура. Этот динамизм даёт возможность быстро ремоделировать структуру в ответ на клеточную стимуляцию, локальную реакцию на внешний стимул или региональные события внутри клетки.

Актиновые филаменты поляризованы. Это означает, что они имеют два различающихся конца: медленно растущий и быстро растущий, называемые минус- и плюс-концами, соответственно. Со стороны минус-конца концентрация актиновых мономеров в 6 раз выше, чем у плюс-конца (около 0,6 мкМ и около 0,1 мкМ, соответственно). Они отличаются по структуре и динамике полимеризации-деполимеризации: момеры G-актина связываются с АТФ и добавляются к тупому концу существующего актинового филамента. После полимеризации АТФ быстро гидролизуются.

У актинового филамента, один конец (тупой) состоит из мономеров, связанных с АТФ, а другой конец (острый) – состоит из мономеров, связанных с АДФ, из которых высвободился фосфат. Затем новые мономеры, связанные с АТФ, добавляются к тупому концу, а “старые” мономеры высвобождаются из острого конца. Это приводит к росту филамента в направлении тупого конца. Скорость удлинения тупого конца в разбавленном буфере исключительно высокая. Она достигает около 100–1000 субъединиц в секунду, то есть около $0,3 - 3,0 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$. В цитозоле скорость может быть ниже, но незначительно. Таким образом, при концентрации актиновых мономеров, равной 30 мкМ (концентрация, сходная с таковой во многих типах клеток), филаменты удлинятся приблизительно на 350 субъединиц в секунду, что почти эквивалентно увеличению длины полимера на 1 микрон в секунду.

В отличие от относительной эффективности полимеризации на тупом конце, начальное образование (нуклеация) актинового филамента – очень неэффективный процесс. Для нуклеации необходимо наличие актиновых мономеров, чтобы последовательно образовывать сначала димеры, а затем тримеры. Эти промежуточные продукты полимеризации крайне нестабильны и редко достигают достаточной длины, чтобы образовать ядро для сборки актинового филамента.

Концентрация мономеров актина на плюс- и минус-концах филамента различна, что позволяет актиновым филаментам расти асимметрично. При определённой критической концентрации удлиняется только плюс-конец, а минус-конец укорачивается. В этом случае длина филамента остаётся почти постоянной, и асимметричная полимеризация плюс-конца создаёт движущую силу актинового филамента, направленную вперёд. Такой процесс получил название бегущая дорожка (treadmilling). Таким образом, за счёт самого процесса полимеризации актиновые филаменты могут генерировать механическую силу (энергию).

Полимеризация актина может осуществляться спонтанно (без действия стимулов), но это происходит гораздо медленнее. Сборка актиновых филаментов значительно увеличивается под действием Arp (actin-related protein) комплекса, который широко распространён во всех типах клеток от дрожжей до человека.

Миозины — семейство белков, являющихся моторами опорно-двигательного аппарата клетки. Миозины состоят из тяжёлых цепей (H) и лёгких (L) в разном количестве в зависимости от типа миозина. H-цепь имеет 2 участка — «головку» и «хвостик». Головка тяжёлой цепи миозина имеет сайт связывания с актином и сайт связывания АТФ. По количеству «головок» миозины делятся на «традиционные» (convention myosin) — 2 головки, и нетрадиционные (unconvention myosin) — одна «головка». Традиционные миозины могут связываться между собой в протофибриллы, а нетрадиционные — не могут.

На электронных микрофотографиях молекулы миозина имеют вид палочек с двумя глобулярными образованиями на одном из концов. Полагают, что 2 полипептидные цепи, образующие миозин, скручены в спираль. Белки, аналогичные миозину, обнаружены в жгутиках, ресничках и других двигательных структурах у многих простейших и бактерий, сперматозоидов животных и некоторых растений [Поглазов Б.Ф., 1982].

Взаимодействие актиновых филаментов с микротрубочками происходит за счёт того, что миозин VII может прикрепляться не только к актиновым филаментам, но также и к тубулину. Головка миозина прикрепляется к актину, а хвосты миозина к тубулину, что создаёт не только каркас для дальнейшей сборки актиновых филаментов, но ещё и соединяет две системы подвижности.

Для работы актин-миозинового и тубулин-динеинового моторов требуется энергия. Этой энергией является АТФ, которая транспортируется из митохондрий, располагающихся у основания жгутика в булаве обонятельной рецепторной клетки [Поглазов Б.Ф., 1982]. Булава весьма богата

митохондриями. Особенностью распределения этих органоидов в клетках является их транспорт в область с высоким потреблением энергии, который совершается вдоль микротрубочек, локализующихся в обонятельных клетках главным образом в периферических отростках, и вдоль актиновых филаментов [Wagner O.L. et al, 2003]. Известно, что пространственное распределение митохондрий очень важно для функционирования, и его нарушение приводит к гибели клеток. Поскольку подвижность митохондрий и метаболическая функция скоординированы, вероятно, именно митохондрии с высокой метаболической активностью скапливаются в области булав, обеспечивая энергией процессы обонятельной рецепции.

Показано что двигательная активность обонятельных жгутиков обеспечивается ионами кальция, которые входят в цитозоль через механо-чувствительные каналы семейства TRP [Бигдай Е.В., 2011].

Однако представления о молекулярных механизмах цилиарной подвижности в основном сформированы на основе исследований ресничек различных типов клеток и животных. Поэтому мы можем только предполагать аналогичные механизмы.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Заявление об этике

Все эксперименты проводились в соответствии с рекомендациями, содержащимися в «Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» [Н.Н.Каркищенко и др., 2010] и в приказе министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»

2.1. Объекты исследования

Работа выполнена на изолированной обонятельной выстилке земноводных (самцах осенне-зимних лягушек (*Rana temporaria*)), млекопитающих (самцах белых лабораторных крыс линии Vistar, кроликах). Впервые были произведены исследования подвижности обонятельных жгутиков на биоптате живой обонятельной выстилки человека.

Анализ литературы показал, что исследование обонятельных клеток в составе выстилки обеспечивает поддержание постоянства среды рецепторных клеток. В составе выстилки живые обонятельные клетки не повреждаются энзимами, а также инвазивными регистрирующими процедурами и имеют более высокую чувствительность к одорантам, чем изолированные [Frings S. et al., 1991, Reisert J. et al., 2003].

2.1.1. Приготовление препарата обонятельной выстилки лягушки

Обонятельный эпителий по цвету отличается от окружающей ткани, имея оранжево-жёлтую, а не розовую окраску и легко отличимую глазом от окружающего респираторного эпителия слизистой выстилки носа. Препарат изолированной выстилки готовили следующим образом. Животному разрушали спинной и головной мозг, отрезали верхнюю челюсть на уровне глаз и снимали кожу с костей носовой части черепа. Затем браншу ножниц заводили в носовой мешок вдоль срединной перегородки, чтобы не повредить

обонятельный эпителий, и срезали крышу носового мешка, обнажая обонятельный бугорок. Далее изолировали обонятельную выстилку с подлежащей хрящевой тканью бугорка и помещали на предметное стекло в каплю раствора Рингера для холоднокровных (пойкилотермных) животных. После этого аккуратно с помощью инъекционных игл и лезвия отделяли обонятельную выстилку от хрящевой основы. Для того чтобы выстилка не была повреждена этими инструментами и не переворачивалась на апикальную поверхность, так как это приводило к обламыванию обонятельных жгутиков и невозможности дальнейшего проведения опытов, препаровку осуществляли под визуальным контролем с помощью бинокулярного препаровочного микроскопа Микмед-2 с общим увеличением в 100 раз. Затем изолированную обонятельную выстилку, находящуюся в растворе Рингера, нарезали на тонкие срезы. Необходимо было добиться, чтобы ширина срезов была меньше толщины обонятельной выстилки. Это позволяло нам укладывать срез на бок, и давало возможность наблюдать за подвижностью обонятельных жгутиков в ходе прижизненной микроскопии. После нарезания обонятельного эпителия срезы с помощью пипетки переносились в чашку Петри с раствором Рингера.

2.1.2. Приготовление препарата обонятельной выстилки крысы

У крыс обонятельный эпителий располагается в дорзальном носовом ходу в задней части раковин и прилежащей перегородке носа обонятельной области. Обонятельная выстилка крысы, легко отличимая от окружающих тканей, аналогична обонятельному эпителию земноводных. При работе с млекопитающими возникли трудности, связанные с тем, что несоблюдение строгих правил содержания, рациона питания и освящения, у подопытных животных приводили к тому, что обонятельные клетки лишались жгутиков, и проведение опытов было невозможно. Поэтому в виварий мы брали крысят в возрасте 2 недель и выращивали их, создавая особые условия содержания животных. Животные получали необходимое дневное освещение, разнообразный и сбалансированный рацион с добавлением витаминов.

Для получения изолированной обонятельной выстилки животному проводилась декапитация. Чтобы исключить стрессовые реакции при декапитации, применялся вводный эфирный наркоз. Для этого крысы помещались в специальную камеру с ватой, смоченной эфиром. Предварительные исследования показали, что применение эфирного наркоза не влияло на характер движения обонятельных жгутиков крысы. Через 15 минут животному, находившемуся под эфирным наркозом, в плевральную полость вводили 10 см³ воздуха, чтобы быстро вызвать газовую эмболию. После прекращения сердцебиений, проводили венесекцию яремных вен для обескровливания животного. Такой подход позволил защитить обонятельную выстилку от инородных тел, прежде всего – от крови которая, действуя снаружи, нарушает функционирование обонятельных клеток [Бигдай Е.В. и др, 2007].

После этого декапитировали животное, снимали с головы кожу, удаляли нижнюю челюсть, и отсекали верхние резцы. Далее производили сагиттальный разрез головы строго по срединной линии, чтобы не повредить обонятельную выстилку животного. Сагиттальный распил головы животного закрепляли в специально сконструированном фиксационном устройстве. Это устройство располагали под объективом бинокулярного микроскопа. На сагиттальном разрезе обонятельный эпителий отпрепаровывали от решетчатой кости. Для этого под контролем зрения на раковинах решетчатой кости глазным скальпелем или лезвием безопасной бритвы по контуру раковины проводили надрез обонятельной выстилки и аккуратно иглой перемещали на предметное стекло в каплю раствора Локка для гомойотермных животных (рН=7.4). При препарировании и перемещении выстилки следили, чтобы препарат не был поврежден и не перевернулся. В противном случае обонятельные жгутики отрывались от обонятельной булавы и проведение экспериментов было невозможно.

Для лучшей визуализации обонятельных жгутиков препарат окрашивали слабым раствором метиленового синего в течение 10 минут (метиленовый синий не влияет на подвижность обонятельных жгутиков). Температура окружающей среды и растворов должна быть не ниже 25° С, при более низкой температуре обонятельные жгутики прекращали двигаться. На предметном стекле из обонятельной выстилки крысы делали тонкие срезы, которые с помощью пипетки переносили с предметного стекла в чашку Петри с раствором Локка для гомеотермных животных. Обонятельные жгутики млекопитающих тоньше, в отличие от обонятельных жгутиков земноводных, и слабо различимы.

2.1.3. Приготовление препарата обонятельного эпителия у кроликов

У кроликов обонятельная область располагается в задне-верхнем участке носовой полости и примыкает сзади к решетчатой кости. В ней находятся костные завитки различной величины, вдающихся в носовую полость со стороны решетчатой кости и направленных к носовой перегородке. Все завитки покрыты обонятельной слизистой оболочкой желтовато-бурого цвета, большей толщиной, чем респираторный эпителий.

Декапитация кролика производилась аналогично крысе. Из-за особенностей строения черепа и толстых костей голову фиксировали в тисках и делали сагиттальный распил головы ампутационной пилой строго по сагиттальной линии. Выделение обонятельного эпителия и приготовление препарата выполняли по вышеописанной методике.

2.1.4. Приготовление препарата обонятельного эпителия у человека

У человека обонятельная область располагается на верхней раковине и в верхней части перегородки решетчатой кости. Обонятельные жгутики у человека изучались на биоптатах обонятельного эпителия. В заборе материала нам оказала помощь опытный оториноларинголог, доктор медицинских наук, Г.П. Захарова в Санкт-Петербургском Государственном Институте уха, горла,

носа и речи при операциях по поводу искривления носовой перегородки у здоровых не курящих людей в возрасте 20 – 25 лет.

Выстилку отделяли щёткой для биопсии, помещали в раствор Локка для гомойотермных животных и через 2 часа доставляли в лабораторию для исследования. Выстилку размещали на предметном стекле и делали её срезы. Каждый срез перемещали пипеткой на новое предметное стекло и накрывали сверху покровным стеклом.

Во всех опытах покровное стекло фиксировали на четырёх пластилиновых столбиках. Толщина зазора между предметным и покровным стёклами равнялась толщине среза. Это позволяло зафиксировать срез так, чтобы он не смещался при перфузии током жидкости.

2.2. Методы прижизненной телевизионной микроскопии

Двигательную активность обонятельных жгутиков мы исследовали методом прижизненной телевизионной микроскопии. Этот метод позволяет в реальном времени изучать движение обонятельных жгутиков. Для этого препарат обонятельной выстилки в растворе Рингера для холоднокровных и в растворе Локка для пойкилотермных животных размещали на предметном столике микроскопа МИКМЕД-2 ОАО «ЛОМО» с фазово-контрастным конденсором. В качестве источника освещения в микроскопе использовали галогеновую лампу (6В, 25 Вт). Использование обычной световой микроскопии не давало достаточной визуализации жгутиков, поэтому использовали фазово-контрастную микроскопию, которая контрастирует обонятельные жгутики.

Оптическая система установки образована объективом 90х/1,25 (масляная иммерсия), окуляром 15х, фотонасадкой 14х, цветной видеокамерой ProGres 4S, смонтированной на выдвижном тубусе VA-V20 тринокулярной насадки МИФ-БЛ1, которая работала в режиме максимальной чувствительности 2×10^{-4} лк. Изображение объекта регистрировали цифровой

видеокамерой ProgRes CT-3 фирмы Jenoptic (Германия), которая имеет максимальное разрешение 2048x1536 пикселей. Минимальная освещённость на препарате составляла 0,1 люкс. Кроме того, в данной видеокамере предусмотрены автоматический баланс белого, позволяющий получать чёткое изображение микрообъекта, и функция компенсации засветки, которая повышает верность воспроизведения изображения, особенно в случае, если источник света расположен напротив видеокамеры, что имело место в данной установке. Это позволяло рассмотреть отдельные обонятельные жгутики на тонких срезах обонятельной выстилки и наблюдать их движения.

Регистрацию цилиарной двигательной активности у обонятельных клеток проводили с помощью описанной цифровой видеокамеры через плату ввода видеоизображения на жёсткий диск персонального компьютера с процессором Intel® Core™2 Duo. Записанные на жёсткий диск компьютера видеоизображения обрабатывали на программе Virtual Dub 1.6 для конвертации к стандартному формату Windows AVI (*.avi).

2.3. Методика стимуляции обонятельной выстилки

Перед началом опытов выстилку отмывали от слизи раствором Рингера или раствором Локка (в зависимости от препарата). С помощью пипетки с одного края покровного стекла подводился раствор, а с противоположной стороны устанавливалась фильтровальная бумага, которая оттягивала на себя жидкость. Препарат промывали в течение одной минуты и затем выдерживали 10 минут, чтобы исключить механическое влияние тока жидкости на подвижность обонятельных жгутиков. Объем жидкости под предметным стеклом составлял 25 мкл, что учитывалось при расчёте концентрации добавляемых одорантов.

В качестве одоранта с прогорклым запахом мы использовали амиловый спирт («Реахим») – одноатомный предельный алифатический спирт. Камфорный запах принадлежал в наших опытах природной тёртой d-камфоре («Реахим»), а аромат душистого эвкалипта – цинеолу («Molecular Probes»). Оба

эти вещества являются представителями терпеновых углеводов. Камфора и цинеол являются монотерпенами. Терпены – самая большая группа вторичных продуктов, содержащихся в высших растениях, смоле хвойных деревьев, в соке каучуковых. Терпеновые группировки входят в структуру таких витаминов, как Д, Е, К, А. Одорантом с цветочным запахом был ванилин. Кроме того, было изучено воздействие едкого и гнилостного запахов на подвижность обонятельных жгутиков на примере аммиака («Реахим») и β-меркамтоэтанола («Sigma») соответственно. Их особенностью является воздействие не на сами обонятельные рецепторы, а на дыхательные цепи митохондрий.

Концентрации раздражителей мы подбирали по изменению двигательной активности обонятельных жгутиков, которая считается показателем функционального состояния препарата, и оценивали посредством прижизненной телевизионной микроскопии. Для всех одорантов использовалась концентрация в 10^{-5} М. Для стимуляции обонятельной выстилки исследуемый одорант в небольшом объеме подводили к краю покровного стекла, откуда он диффундировал к обонятельным жгутикам.

В процессе опыта сначала регистрировали двигательную активность обонятельных жгутиков до воздействия в течение 30–45 секунд, потом создавали ток жидкости и фиксировали ответную реакцию жгутиков на этот стимул. Через 10 минут записывали фоновые движения жгутиков до воздействия одорантом, момент воздействия и после воздействия вели запись в течение 1 минуты.

2.4. Фармакологический анализ

Изменения жгутиковых движений под действием одорантов связаны с реорганизацией актинового компонента цитоскелета, которая обнаруживается во всех клетках, включая простейшие. В ОЖ лягушки-быка, *Rana catesbiana*, посредством биохимического анализа PAGE in SDS показано наличие около 30 протеиновых полос в геле, среди которых такие цитоскелетные молекулы, как

актин с молекулярной массой 46 кДа и α - и β -тубулины с молекулярными массами 55 и 53 кДа, соответственно, которые идентифицировали с помощью иммуноблотинга [Anholt R.H. et al. 1986]. Чтобы оценить вклад молекул актина в немышечную подвижность обонятельных жгутиков, мы обрабатывали препарат обонятельной выстилки цитохалазином в концентрации 4 мкг/мл. Он блокирует полимеризацию G-актина. Если окажется, что воздействие одорантов на фоне цитохалазина не инициирует упорядочения двигательной активности обонятельных жгутиков, то это будет свидетельствовать о том, что оно обуславливается полимеризацией G-актина.

Для доказательства участия тубулин-динеиновой молекулярной системы подвижности в двигательной активности ОЖ обрабатывали обонятельную выстилку колхицином («Sigma»). Известно, что он связывается с α -, β -тубулиновыми гетеродимерами около ГТФ-связывающего сайта α -тубулина. При высокой концентрации этот агент вызывает деполимеризацию микротрубочек посредством ингибирования боковых связей между протофиламентами [Risinger A.L. et al., 2009]. Показано [Bhattacharyya B., 1974], что колхицин, нефлуоресцирующий в водной среде или органических растворителях, приобретает способность светиться при связывании с тубулиновыми гетеродимерами, на которые распадаются микротрубочки при деполимеризации. Поэтому флуоресценция связывающегося с ними колхицина может свидетельствовать о деполимеризации тубулинов под действием колхицина.

2.5. Методы обработки видеосигнала

В соответствии с поставленными задачами был разработан метод обработки видеосигнала [Дудич Б.А., 2012], который содержит в себе пять основных стадий:

- 1) *первичную обработку видеоизображений;*
- 2) *получение первичных данных;*

- 3) *проведение спектрального анализа Фурье;*
- 4) *вычисление информационной энтропии;*
- 5) *определение и отображение пространственной локализации обонятельного жгутика – построение траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости перпендикулярной этому движению (на подобие фигур Лиссажу).*

2.5.1. Первичная обработка видеоизображений

Регистрацию изображения объекта исследования проводили цифровой камерой в черно-белом режиме с использованием функции автоматического баланса белого. Собственно, регистрацию видеоизображения и запись файлов на жёсткий диск персонального компьютера осуществляли при помощи программного обеспечения, поставляемого производителем вместе с камерой. Формат сохранённых видеоизображений подвергали предварительной конвертации.

Конвертацию проводили утилитой для захвата, видеомонтажа и редактирования видеопотока VirtualDub v1.6 (разработчик Avery Lee) к формату AVI (Audio Video Interleave), разработанному компанией Microsoft и входящему в состав пакета Video For Windows. Поскольку одним из главных требований, предъявленных к разработке программы обработки, была максимальная независимость, данный видеоформат был выбран для работы, поскольку он поддерживается всеми версиями операционной системы Windows и не требует установки дополнительных компонентов для воспроизведения видеоизображений. Затем для определения различий в двигательной активности обонятельных жгутиков из видеозаписи эксперимента извлекали два участка. Первый – длительностью от 30 до 45 секунд, соответствующий времени до введения одоранта, и второй – длительностью 1 мин. сразу после введения одоранта. Компьютерному

анализу подвергались эти два участка, сохранённые в соответствующие файлы.

2.5.2. Снятие первичных данных

Изображение, получаемое с камеры, было черно-белым, а контрастность между средой и самим жгутиком, как правило, невелика. Поэтому невозможно было создать алгоритм для автоматического отслеживания движения дистального конца одиночного обонятельного жгутика и получить характеристики его движений в автоматическом режиме. Поэтому движения дистального конца жгутика мы с помощью программы Jgut, созданной Крыжановским Э.В. и Григоряном А.А. в Санкт-Петербургском государственном университете телекоммуникаций им. проф. М.А. Бонч-Бруевича, отслеживали в ручном режиме и покадрово. В связи с этим в качестве первичных данных снимали координаты траектории дистального конца жгутика в системе отсчёта, связанной с видеокадром и единичным отрезком, равным одному пикселю, и подвергали дальнейшей обработке.

2.5.3. Спектральный анализ Фурье

Обонятельные жгутики обладают сложными колебаниями которые изменяются под действием пахучих стимулов [Бигдай Е.В., 2010]. Поэтому в соответствии с теорией Фурье им может быть присущ определённый гармонический спектр, отличающийся при действии и без воздействия одорантов. Чтобы проанализировать спектр частот, характерных для локомоторной жгутиковой активности до или после стимуляции, в разработанную программу DataProcessor был заложен алгоритм преобразования Фурье для спектрального анализа полученных частот.



Рис.2. Зависимость Y координаты одиночного обонятельного жгутика лягушки под воздействием цинеола от времени.

X, пикс	Y, пикс
1	2
57	35
1	2
56	36
1	2
50	40
1	2
48	41
1	2
39	43
1	2
34	44
1	2
30	45
1	2
28	46

	1	2
06		46
	1	2
06		44

Таблица 1. Фрагмент таблицы координатного ряда одиночного обонятельного жгутика, полученного с помощью разработанной программы.

В качестве исследуемого сигнала в наших исследованиях выступает координатный ряд (рис. 2, табл. 1), который в дальнейшем будем называть координатным сигналом.

Как видно из рисунка (рис. 3), сигнал удовлетворяет условиям Дирихле на измеряемом интервале, а именно:

- 1) имеет конечное число точек разрыва первого рода;
- 2) кусочно-монотонен на рассматриваемом отрезке;

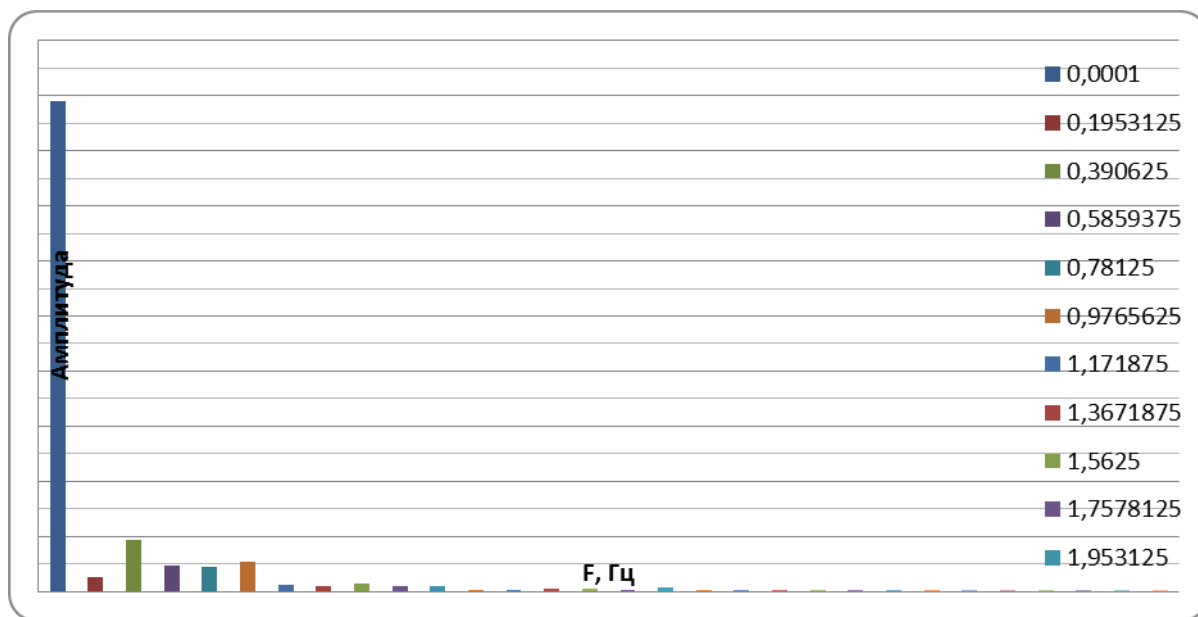


Рис. 3. Спектр координатного сигнала обонятельного жгутика лягушки до воздействия камфорой.

В соответствии с условиями Дирихле, по теореме о достаточном условии разложения функции в ряд Фурье, спектр координатного сигнала $F(\omega)$ по определению может быть получен через интеграл Фурье:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt$$

где $f(t)$ – исходный сигнал.

Из формулы видно, что спектр Фурье представляет собой комплексную функцию, даже если сигнал действительный.

Поскольку исходный сигнал дискретный, так как задан набором точек в видеозаписи, то для определения его спектра использовалось дискретное преобразование Фурье. Такое преобразование представляет собой разновидность преобразования Фурье – в виде:

$$\left\{ \begin{array}{l} F(t) = A_0 + \sum_{k=1}^N [B_k \sin(k\omega t) + C_k \cos(k\omega t)] \\ A_0 = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \\ B_k = \frac{2}{T} \int_0^T F(t) \sin(k\omega t) dt \\ C_k = \frac{2}{T} \int_0^T F(t) \cos(k\omega t) dt \end{array} \right.$$

где B_k и C_k – коэффициенты Фурье.

Для выявления характерных частот колебаний жгутика и их анализа до и после воздействия на него одорантом в разработанную программу был заложен быстрый алгоритм вычисления дискретного преобразования Фурье, называемый быстрым преобразованием Фурье. Изменение частотного спектра объективно оценивает рабочую гипотезу о переходе под действием одоранта неупорядоченного движения обонятельного жгутика в упорядоченное.

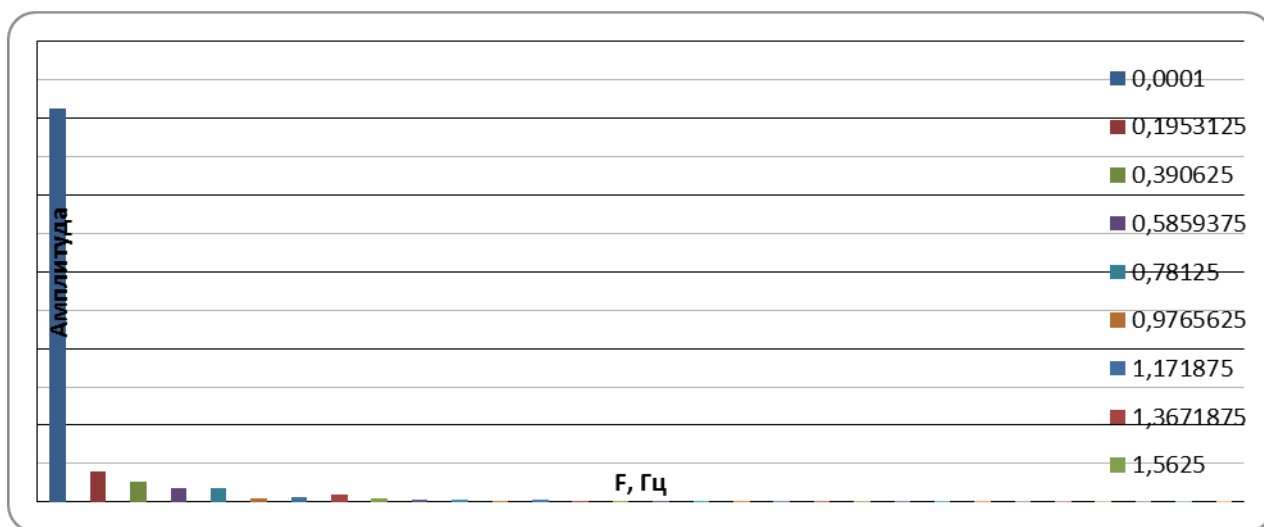


Рис. 4. Спектр координатного сигнала обонятельного жгутика лягушки после воздействия камфорой.

Как видно из графиков (рис. 3, рис. 4), по частотному спектру можно определить частоту основной гармоники, высших гармоник, а также изменения амплитуды этих гармоник под действием пахучих молекул. Такое изменение характеризует изменение подвижности обонятельных жгутиков под действием пахучих веществ.

2.5.4. Вычисление энтропии

Одним из важных объективных критериев, по которому можно судить о переходе к упорядочению двигательной активности обонятельных жгутиков под воздействием одорантов, является энтропия [Дудич Б.А., 2012].

Положение дистального конца обонятельного жгутика во время его движения может быть описано с позиций теории вероятностей. На исследуемом дискретном ряду координат для каждой из координат вероятность может быть определена как частота повторений Z_i координатной пары $[x_i; y_i]$ в дискретном ряду длиной N по формуле:

$$p_i = \frac{Z_i}{N}$$

Информационная энтропия является мерой неупорядоченности информации. В нашей работе в силу неразрывности точки за единицу информации, или пользуясь шенноновской терминологией, за символ первичного алфавита, мы приняли координатную пару $[x_i; y_i]$ (рис. 3). Такой подход позволил нам избавиться от необходимости вычисления энтропии для каждого координатного ряда в отдельности. Поскольку для оценки берётся дискретный ряд координат и каждая координатная пара обладает своей частотой встречаемости – вероятностью, то для определения информационной энтропии справедлива формула Шеннона [Shannon C.E., 1948]:

$$H = -K \sum_{i=1}^N p_i \log_2(p_i)$$

где K – положительная константа, в нашем случае равная 1, и N – количество элементов в сообщении, то есть длина ряда.

Основываясь на данной теории, в программу мы заложили алгоритм вычисления информационной энтропии. Это позволило определить и сравнить меру упорядоченности и неупорядоченности двигательной активности одиночного обонятельного жгутика. При этом повышение информационной энтропии под действием одорантов свидетельствует о повышении степени неупорядоченности, а понижение – о повышении степени упорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков.

2.5.5. Построение траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной этому движению (на подобие фигур Лиссажу)

На одном из этапов наших исследований при анализе координатно-временных зависимостей движений жгутика (рис. 3) встала задача определить направленное движение дистального конца движущегося жгутика под действием одоранта. Поскольку колебания вдоль осей X и Y взаимно

перпендикулярны, данные колебания были сложены и на основе их суммы были построены траектории (рис. 5). Они соответствуют траектории движения дистального конца обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной его движению, и визуально похожи на фигуры Лиссажу. Как показывают результаты обработки экспериментальных данных (рис. 5, 6), данный метод позволяет визуализировать области колебаний жгутика до и после воздействия, границы этих областей, а также направление смещения колебаний жгутика под действием стимула. Поскольку под упорядоченным движением понимается направленное движение в градиенте концентрации хемоаттрактанта, то наличие сужения области построенной траектории движения является критерием упорядоченного движения под действием стимула, а смещение данной области – о направленности движения в сторону одоранта.

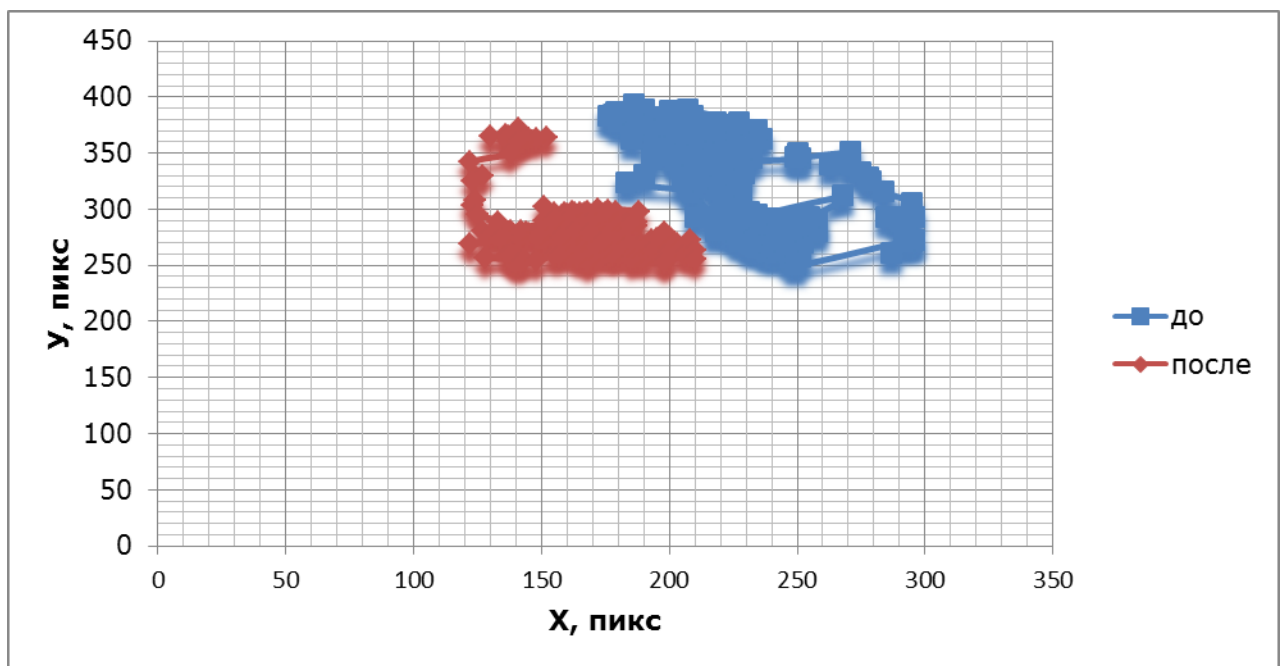


Рис. 5. Траектории движения дистального конца обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной его движению, на подобии фигур Лиссажу.

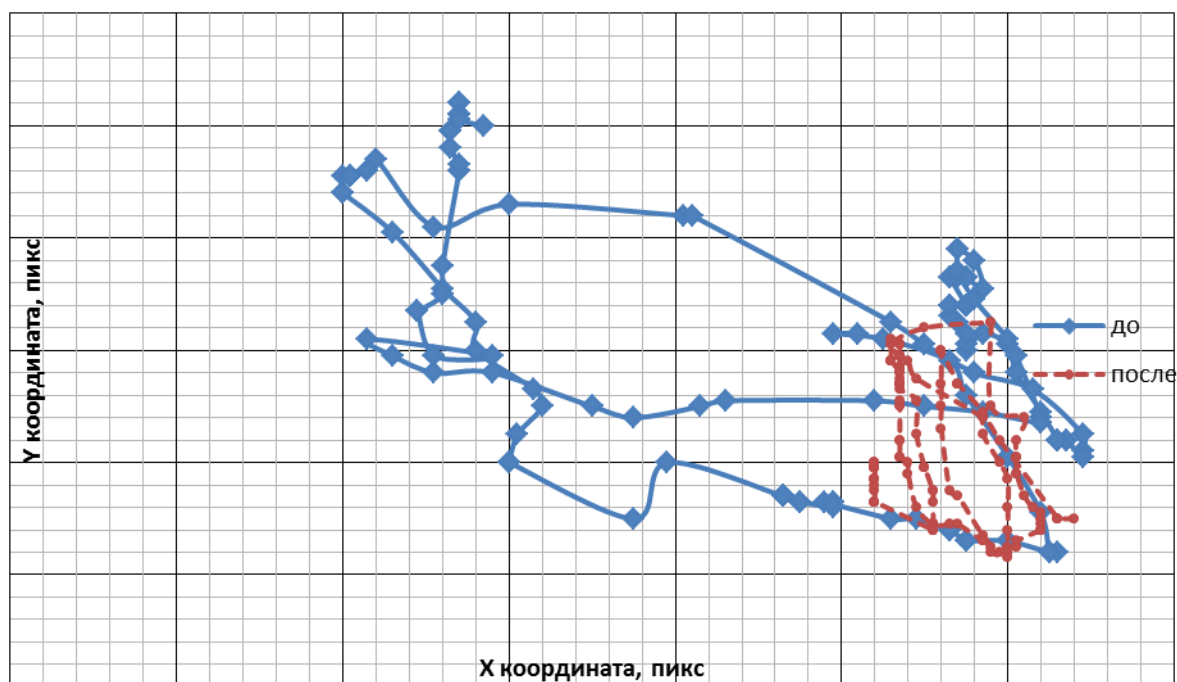


Рис. 6. Траектории движения кончика обонятельного жгутика лягушки на подобию фигур Лиссажу до и после воздействия ванилином.

2.5.6. Преобразование движения обонятельных жгутиков в звуки

Обнаружив изменения гармонического спектра двигательной активности жгутиков под действием различных одорантов, мы преобразовали их движения в звуки (в музыкальные композиции) [Бигдай Е.В., 2012]. На этом пути решались три задачи:

- 1) преобразование исходного wave-файла через аудиоконвертер в последовательность нот, записанных в midi-файл;
- 2) редактирование полученного midi-файла в студии-секвенсоре;
- 3) выбор инструмента для синтеза подходящего звука.

Для решения первой задачи был использован конвертер WIDI Recognition System компании Widisoft – программа, позволяющая работать с файлами форматов mp3, wave, CD-треками и многими другими, получая на выходе нотную запись. Полученные ноты сохранялись в формате MIDI (англ.

Musical Instrument Digital Interface – цифровой интерфейс музыкальных инструментов) – стандарте цифровой звукозаписи на формат обмена данными между электронными музыкальными инструментами.

Вторая и третья задача были решены с помощью программы FL Studio – редактора-секвенсора, выпускаемого компанией Image-Line Software. Музыка создавалась путем записи и сведения аудио- или MIDI-материалов. Готовая композиция была записана в формате mp3. FL Studio является дорожечным (паттерн) секвенсором, где создание музыки происходит в Piano Roll, Step Sequencer и затем осуществляется сборка в окне Playlist.

Главная составляющая проекта композиции – генератор (канал). Генератор синтезирует или воспроизводит звук. Звук каждого генератора может быть обработан при помощи множества подключаемых эффектов. Каждый генератор обладает своими настройками, уникальным звуком, имитирующим любой инструмент. Для генераторов программируются нотные партитуры, записываемые в Piano Roll, которые в данном случае содержатся в полученном MIDI-файле.

При необходимости возможно редактирование партитуры (транспонирование нот для изменения частоты звука, удаление полученных в результате неточной конвертации лишних нот, изменение громкости, подбор нужного темпа и т.д.). В качестве генератора мы использовали плагин Omnisphere фирмы Spectrasonics, который отличается качеством исполнения на встроенных инструментах, но при этом наиболее требователен к ресурсам компьютера. После настройки плагина и применения его к полученной нотной партии получили конечную музыкальную композицию, которую сохраняем в mp3-файле, воспроизводимся на большинстве проигрывателей. Теперь можно не только видеть, но и слышать, как ОЖ реагируют на одорант. Переход ОЖ от неупорядоченного движения (в режиме рысканья) к упорядоченному обедняет звучание. Они по-разному звучат до и после

появления запаха, а также при стимуляции различными одорантами [Бигдай Е.В., 2012].

2.6. Статистический анализ

Для анализа полученных данных и выявления достоверности использовали параметрический метод статистической оценки с вычислением коэффициента корреляции Пирсона.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков вне действия одорантов

Визуальный анализ видеоизображений, полученных посредством прижизненной телевизионной микроскопии обонятельной выстилки лягушек (*Rana temporaria*) (N =140), крыс (N =10), кроликов (N =3) и человека (N =2), показал, что их обонятельные жгутики подвижны. Их подвижность в отсутствие одорантов в окружающей среде сохранялась в течение нескольких часов, что свидетельствовало о хорошем функциональном состоянии препаратов. Обонятельные жгутики совершали неупорядоченные асинхронные, рыскающие движения. При этом их дистальный участок не способен двигаться самостоятельно. Он пассивно следует за проксимальным отделом и может закручиваться в петли. Это напоминает движения «хлыста в руках погонщика» – сила сосредоточена в его основании, а дистальный конец следует пассивно за ним.

Вместе с тем обонятельные жгутики в отсутствие одорантов наряду с неупорядоченными совершают эпизодические короткие (по амплитуде и кратковременности) упорядоченные движения, которые напоминают «пилотные» псевдоподии или филоподии у мигрирующих клеток. ОЖ как будто «принюхиваются» к окружающей среде. В этот момент обонятельный жгутик застывает на некоторое время в определённом направлении, вытягивается в струну, а после замирания возобновляет неупорядоченное движение.

Для объективной характеристики двигательной активности обонятельных жгутиков вне действия одорантами мы определяли их частотный спектр. На рис. 7 представлен гармонический спектр сложных колебаний обонятельного жгутика вне действия пахучего вещества. Видно, что движения обонятельного жгутика охватывают довольно широкий спектр от 0,10 до 3,18 Гц, но основные гармоники находятся в области низких частот: от

0,10 до 0,48 Гц. При этом средняя частота колебаний дистального отдела составляла $1,25 \pm 0,3$ Гц.

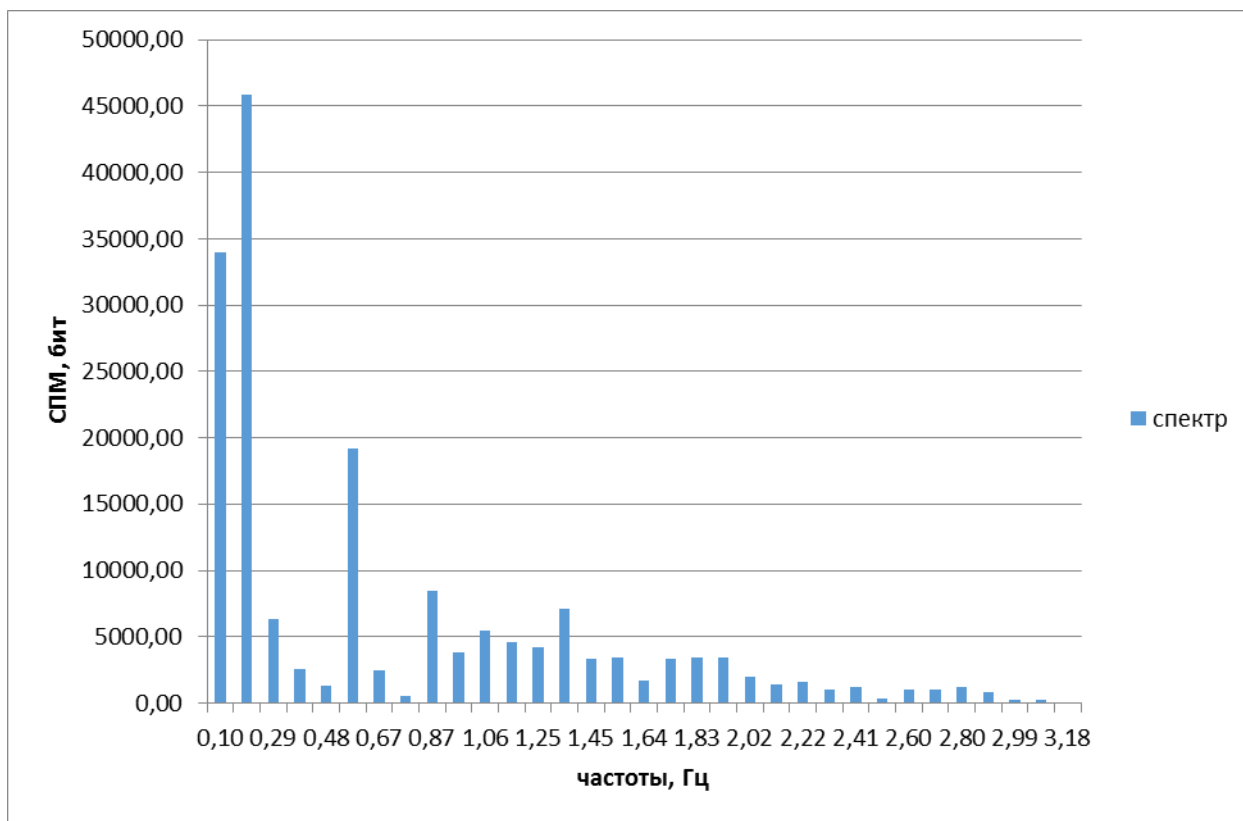


Рис. 7. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия одорантом

3.2. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков под действием одорантов

3.2.1. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек, белых лабораторных крыс и кролика под действием амилового спирта

При визуальном анализе видеоизображений оказалось, что под действием амилового спирта в 100% исследованных препаратов обонятельного эпителия лягушек (N=27), крыс (N=3) и кролика (N=1) дистальный конец жгутика начинал активно вытягиваться, приобретая определённое направление: обонятельный жгутик двигался в сторону

источника одоранта в градиенте его концентрации. Он застывал на длительное время в этом положении, затем возвращался в исходное состояние и снова вытягивался и останавливался, повторяя такой характер движения на протяжении действия одоранта. Таким образом, под действием амилового спирта движения обонятельного жгутика из неупорядоченных становились упорядоченными, направленными к одоранту в градиенте его концентрации.

Чтобы получить объективную оценку перехода из неупорядоченного состояния в упорядоченное, мы построили траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной направлению его движения (наподобие фигур Лиссажу), без действия и при стимуляции обонятельной выстилки амиловым спиртом (рис. 8).

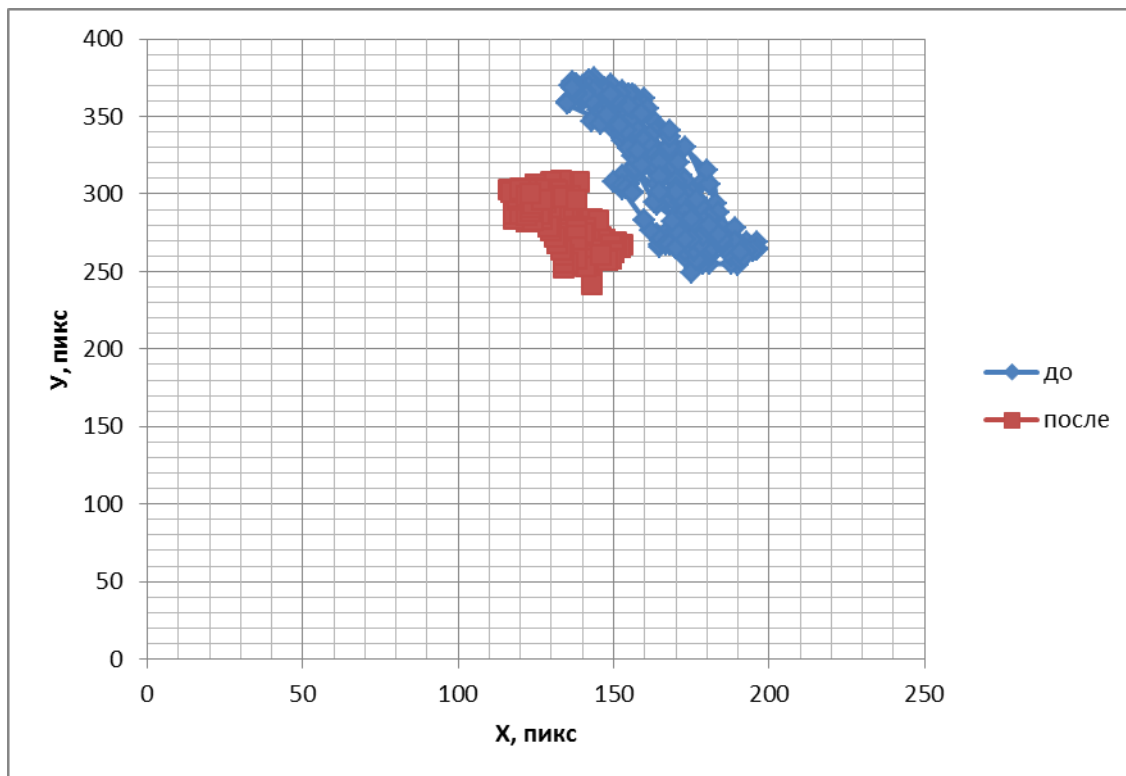


Рис.8. Траектории, наподобие фигур Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия амиловым спиртом

На Рис. 8 видно, что под действием прогорклого запаха (амилового спирта) дистальный отдел обонятельного жгутика лягушки двигается в другой

области пространства. Направление движения кончика жгутика соответствует градиенту концентрации одоранта. Кроме того, на рис. 9 видно, что траектория движения кончика обонятельного жгутика под действием амилового спирта занимает меньшую область пространства по сравнению с той, которую он охватывал до стимуляции обонятельной выстилки одорантом. Следовательно, под действием прогорклого запаха происходит не только смещение кончика обонятельного жгутика в пространстве, но и уменьшение области занимаемой этой траекторией. Эти данные также свидетельствуют об упорядочении двигательной активности обонятельных жгутиков.

Влияние амилового спирта на двигательную активность обонятельных жгутиков в наших опытах исследовалась также на препаратах обонятельной выстилки крыс ($n=3$) и кроликов ($n=1$). Полученные результаты показали, что под действием прогорклого запаха у этих млекопитающих, как и у лягушек, движения обонятельных жгутиков упорядочиваются (Рис. 9, 10).

При этом кончик обонятельного жгутика смещается в пространстве в направлении действующего одоранта, а площадь, занимаемая его траекторией, уменьшается. Необходимо отметить, что такое направленное упорядоченное движение дистального отдела обонятельного жгутика возникает только тогда, когда в окружающей среде появляется одорант. Следовательно, амиловый спирт инициирует переход от неупорядоченного движения к упорядоченному.

Построение гармонических спектров сложных колебаний обонятельного жгутика (рис. 11,12,13) выявило, что при стимуляции обонятельной выстилки одорантом увеличивается амплитуда основной гармоники, частота которой составляет 0,06 – 0,09 Гц, а среди высших гармоник наибольшую амплитуду имеют колебания с частотой 0,17 – 0,26 Гц. То есть под действие амилового спирта в гармоническом спектре значительно увеличивается доля низких частот.

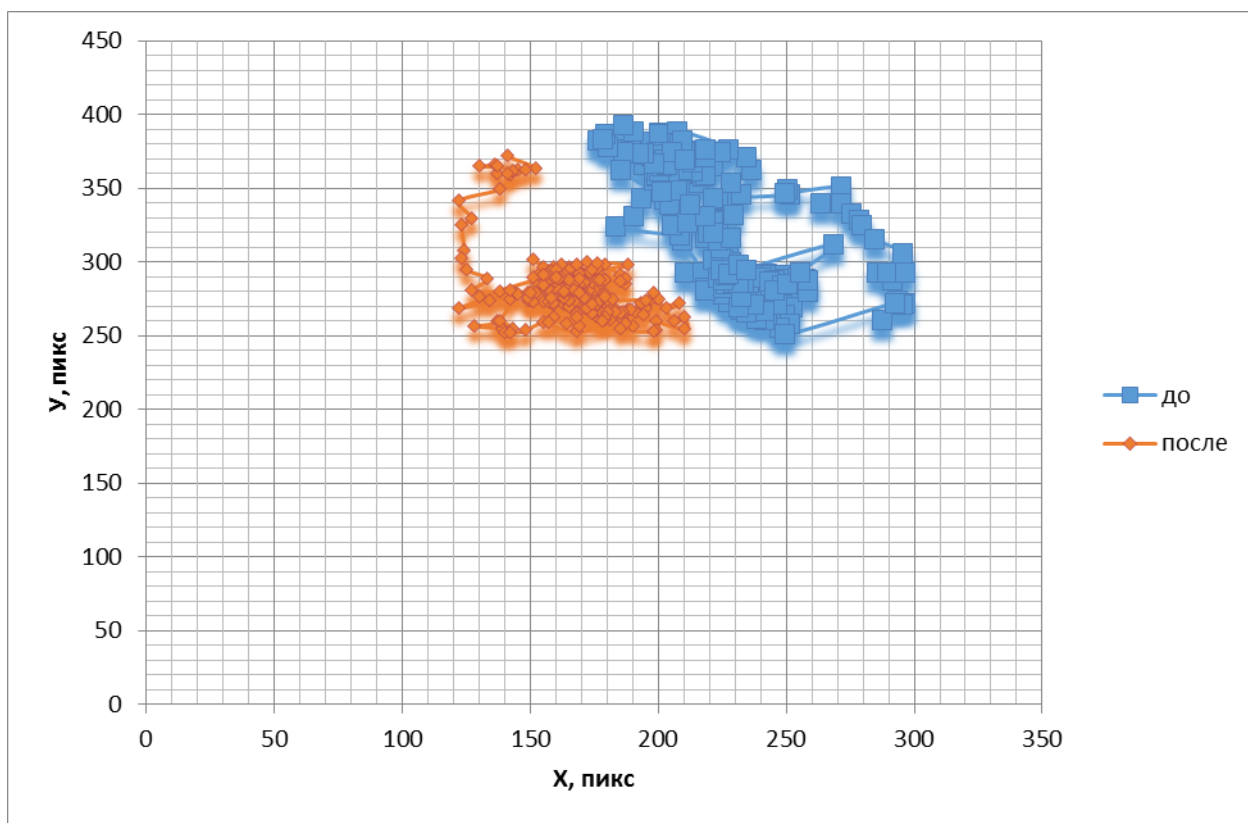


Рис. 9. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика крысы до воздействия и после воздействия амиловым спиртом

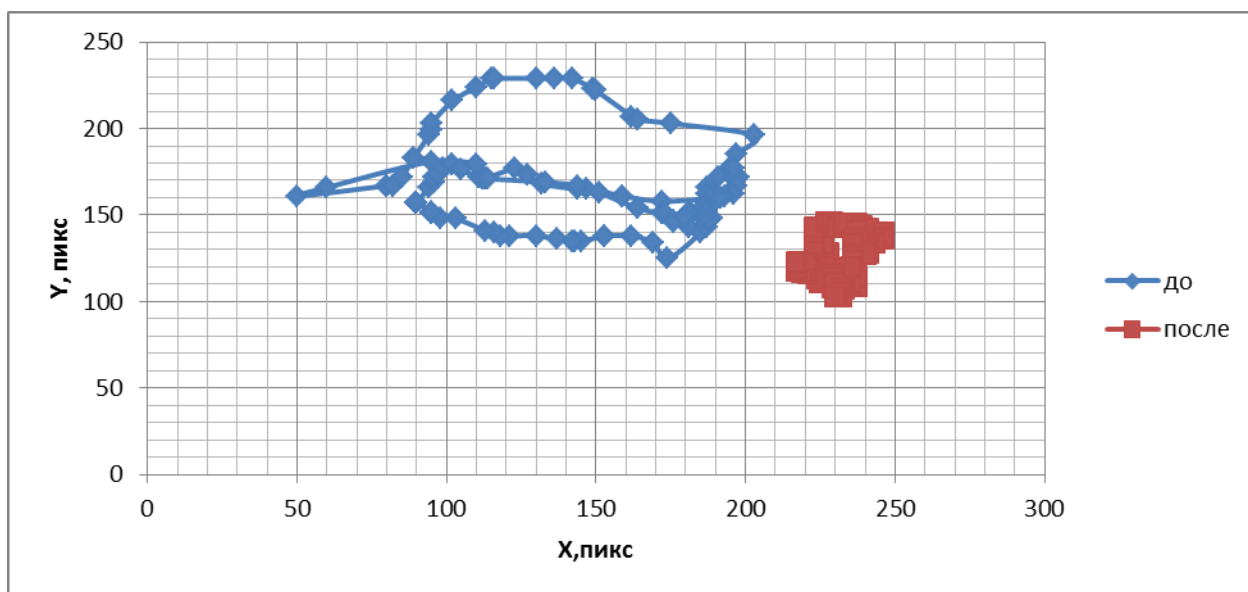


Рис. 10. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика кролика до воздействия и после воздействия амиловым спиртом

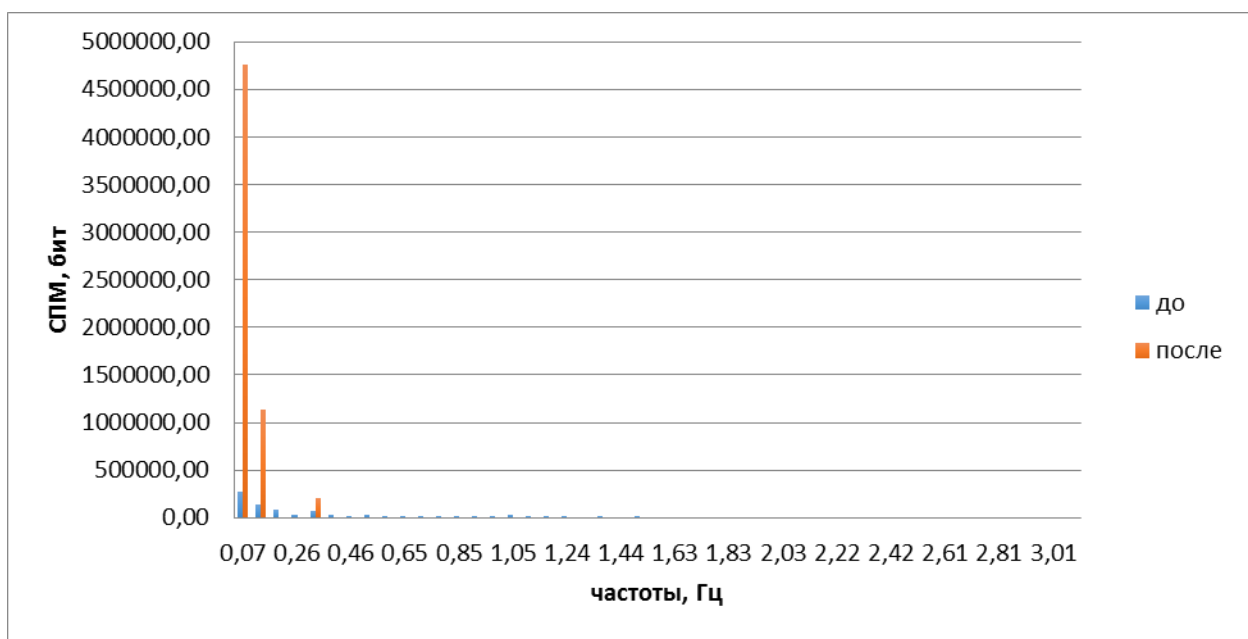


Рис. 11. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия амиловым спиртом на обонятельную выстилку лягушек

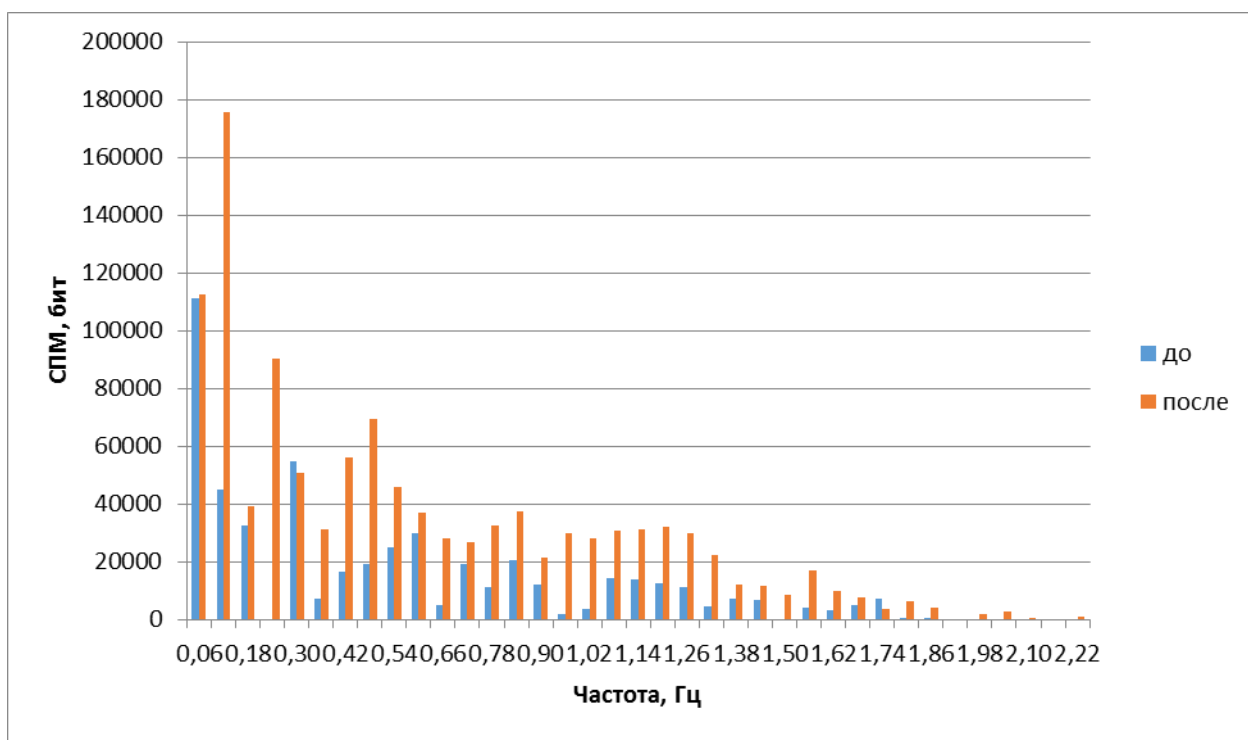


Рис. 12. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия амиловым спиртом на обонятельную выстилку крыс

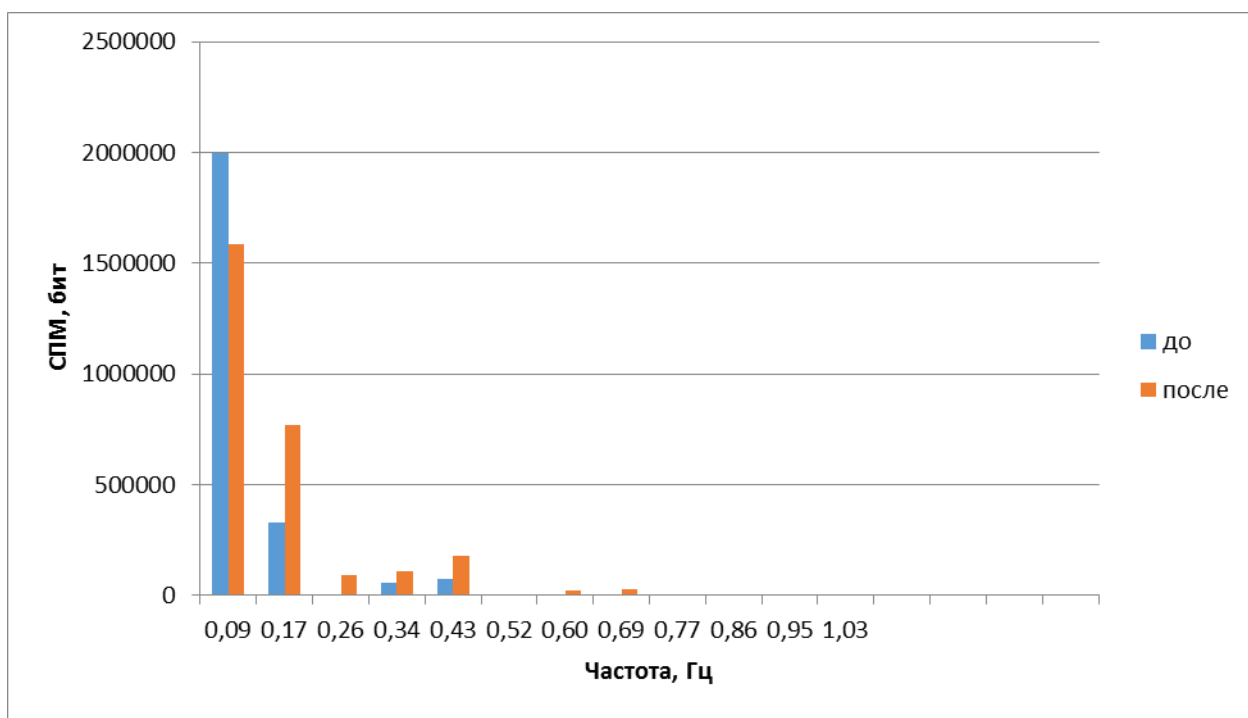


Рис. 13. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия амиловым спиртом на обонятельную выстилку кролика

Кроме того, под действием стимула гармонический спектр суживается: если до воздействия ширина спектра охватывала диапазон от 0,07 до 1,44 Гц (Рис. 11), то после воздействия амиловым спиртом весь диапазон частот умещался от 0,07 до 0,46 Гц. Такое изменение гармонического спектра свидетельствует об упорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков, инициируемое одорантом.

Затем мы определяли среднюю частоту двигательной активности обонятельных жгутиков. На обонятельной выстилке лягушек было установлено, что в 100% (n=31) опытов под действием амилового спирта частота колебаний жгутиков обонятельной выстилки лягушки достоверно снижалась на $28 \pm 3\%$ ($P < 0,05$). На обонятельной выстилке крыс в 100% опытов (n=3) средняя частота снижалась на $27 \pm 1\%$ ($P < 0,05$), а обонятельные жгутики кролика снижали частоту на 28%. Это обусловлено тем, что в период своего направленного движения в градиенте концентрации пахучего вещества обонятельных жгутик приостанавливался в новой области пространства,

«замирал» в ней, а затем возобновлял свои движения. Таким образом, не только сужение частотного спектра, но и снижение средней частоты свидетельствуют об упорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков, инициируемой прогорклым запахом.

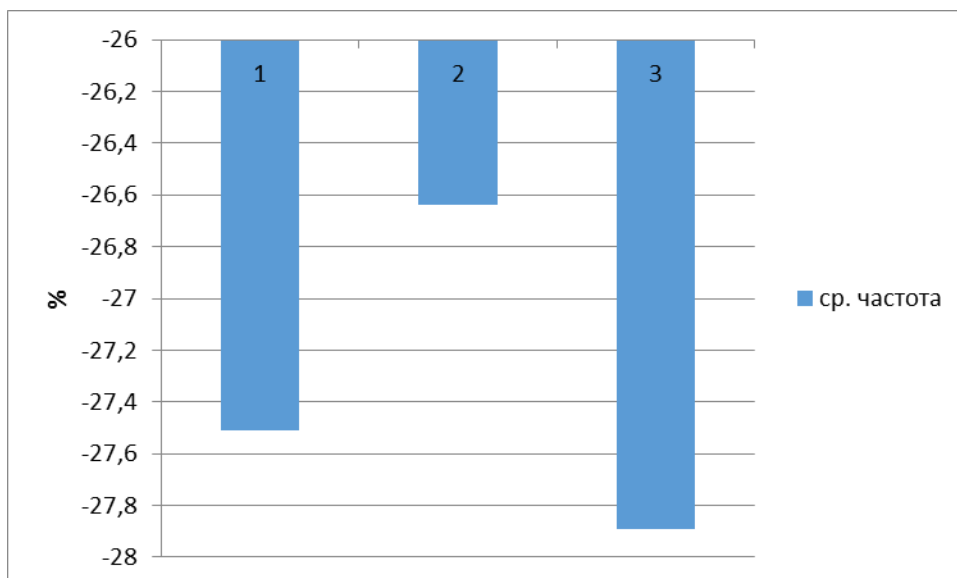


Рис. 14. Сравнение изменения средней частоты двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек (1), крыс (2) и кролика (3)

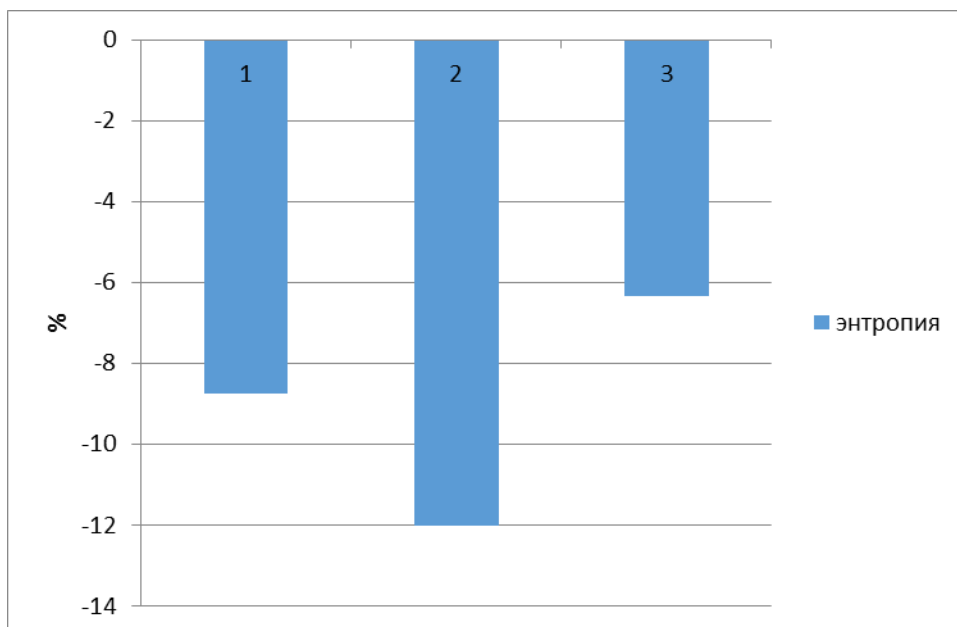


Рис. 15. Сравнение изменения энтропии двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек (1), крыс (2) и кролика (3)

Одним из критериев перехода из неупорядоченного движения обонятельных жгутиков в упорядоченное служила энтропия. Результаты

наших исследований показали, что под действием амилового спирта энтропия в 100% опытов на обонятельной выстилки лягушек достоверно уменьшалась на $9,5 \pm 6\%$ ($P < 0,04$). Опыты на обонятельной выстилке крыс показали также уменьшение энтропии на $12 \pm 4\%$ ($P < 0,05$), а на выстилке кролика на 6%. Уменьшение энтропии в системе также свидетельствует об упорядоченности в ней.

Необходимо отметить, что сходные данные получены при обработке видеоизображений двигательной активности обонятельных жгутиков крыс и кролика (рис. 14, 15).

Таким образом, объективные критерии подтверждают наши визуальные наблюдения двигательной активности обонятельных жгутиков. Следовательно, стимуляция обонятельной выстилки лягушки амиловым спиртом инициирует упорядочение двигательной активности их обонятельных жгутиков.

3.2.2. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек под действием ванилина

Исследование влияния ванилина на двигательную активность обонятельных жгутиков проводилось на лягушках ($n=15$).

Визуальный анализ видеоизображения показал, что под действием одоранта, обладающего цветочным ароматом, подвижность обонятельных жгутиков меняется. Они начинают двигаться медленнее, амплитуда движений изменяется, а хлыстообразный характер их движения переходит в колебательный (маятникообразный). Такие маятникообразные движения имели некоторые особенности: обонятельный жгутик отчётливо не направлял свой дистальный отдел к источнику запаха по сравнению с реакцией на амиловый спирт. Но вместе с тем было замечено, что при колебаниях он замирал в направлении градиента концентрации одоранта на некоторое время, затем возвращался в исходное состояние, но при этом не было характерного

для реакции на амиловый спирт направленного вытягивания в сторону одоранта.

Чтобы получить объективные данные по влиянию ванилина на двигательную активность обонятельного жгутика, мы построили траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной направлению движения жгутика (наподобие фигур Лиссажу) без действия и при стимуляции обонятельной выстилки ванилином (рис. 16). На рис. 16 видно, что под действием цветочного запаха траектория движения дистального отдела обонятельного жгутика лягушки смещалась в пространстве относительно исходного положения. Направление этого смещения коррелировало с градиентом концентрации одоранта.

Необходимо отметить, что под действием ванилина движения обонятельного жгутика занимает гораздо меньшую область по сравнению с той, которую он занимают до действия одоранта.

Результаты построения траектории, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до и после воздействия ванилином, свидетельствуют о том, что ванилин, как и амиловый спирт, инициирует упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков.

При определении средней частоты было установлено, что в 100% опытов ($n=15$) ванилин на $70 \pm 12\%$ достоверно ($P < 0,05$) снижал частоту движений обонятельных жгутиков. Вероятно, такое существенное уменьшение частоты жгутиковых колебаний обуславливается «замираниями» обонятельных жгутиков по направлению градиента концентрации одоранта, инициируемых ванилином, а это, в свою очередь, свидетельствует об упорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков, вызванной одорантом.

Расчёты энтропии показали, что в ответ на действие одоранта происходило достоверное ($P < 0,05$) ее понижение на $40 \pm 5\%$. Уменьшение энтропии в системе означает переход из неупорядоченного состояния в упорядоченное. Следовательно, при стимуляции обонятельной выстилки

лягушки цветочным запахом двигательная активность обонятельного жгутика упорядочивается.

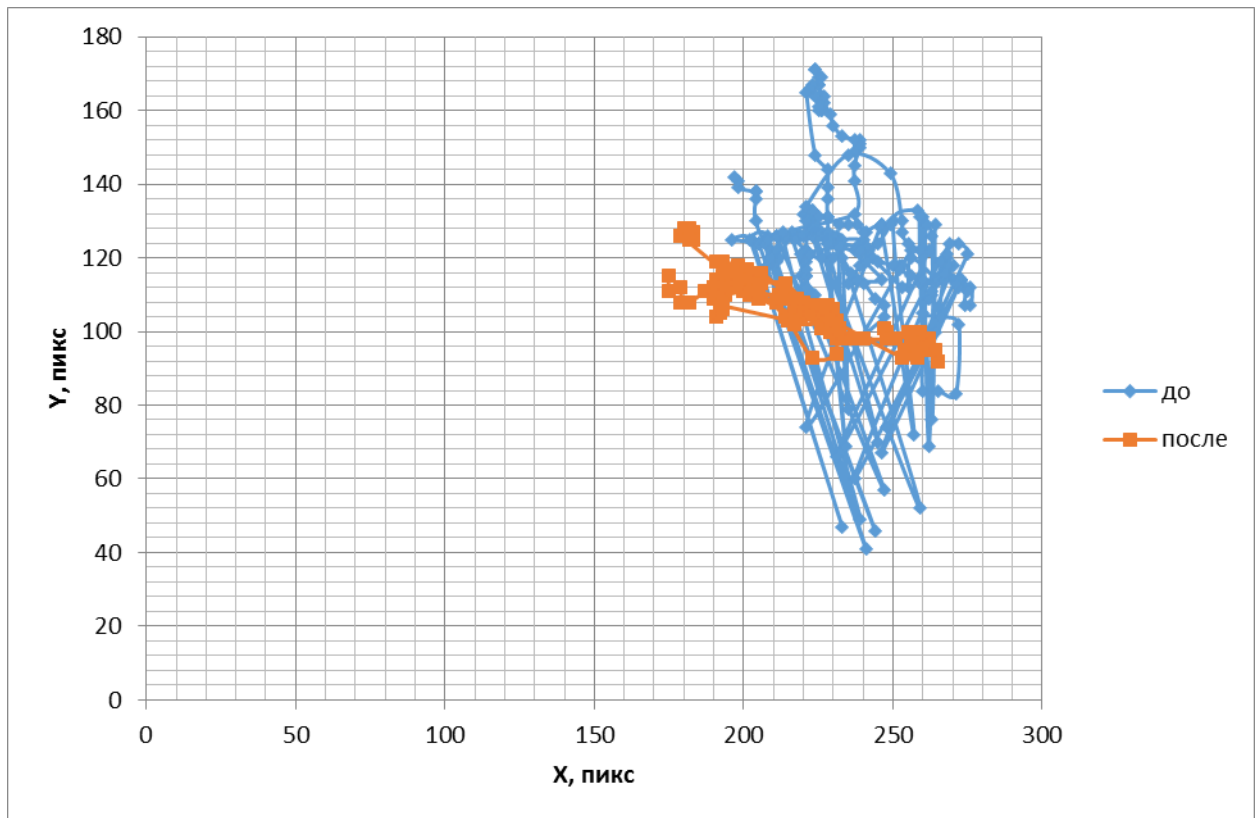


Рис. 16. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия ванилином

Одним из критериев упорядочения было построение гармонических спектров сложных колебаний обонятельного жгутика. На рис. 17 видно, что, при стимуляции обонятельной выстилки ванилином увеличивается амплитуда основной гармоники, имеющей частоту 0,11 Гц, что свидетельствует, о вкладе низких частот в двигательную активность обонятельных жгутиков. При этом спектр суживается, занимая диапазон от 0,11 Гц до 0,66 Гц по сравнению с 0,11 Гц до 1,97 Гц до воздействия. Это также является показателем упорядочения в системе.

Таким образом, объективная оценка перехода двигательной активности обонятельного жгутика лягушки из неупорядоченного в упорядоченное под действием ванилина подтверждает наши данные, полученные при визуальном анализе.

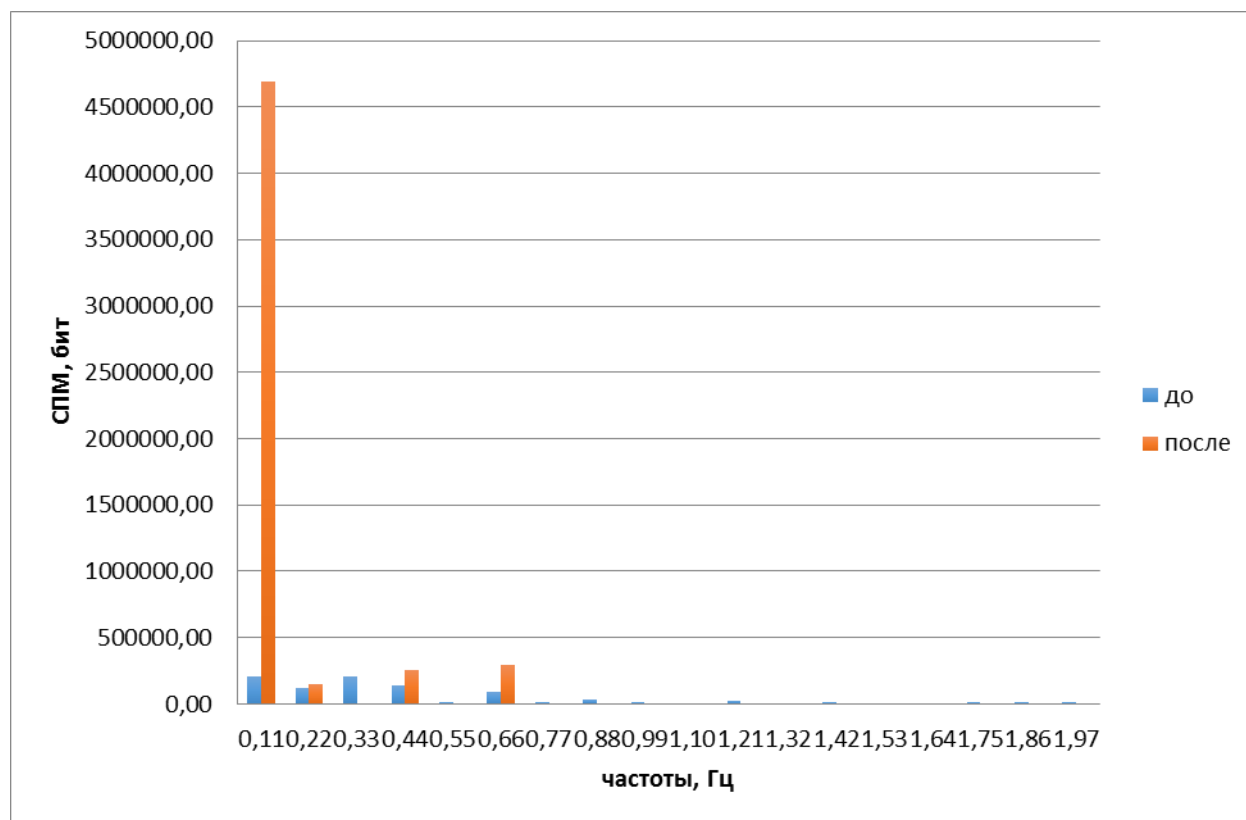


Рис. 17. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия ванилином

3.2.3. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек и белых лабораторных крыс под действием камфоры

Следующим одорантом для изучения изменения подвижности была камфора. Реакция обонятельного жгутика на камфору изучалась на лягушках (n=17) и белых лабораторных крысах (n=3).

В результате визуального анализа видеоизображений оказалось, что под действием камфоры жгутик обонятельной выстилки лягушки и крысы изменял

характер своего движения. Он становился более подвижным. Двигательная активность обонятельного жгутика под влиянием камфоры обладала интересными особенностями. На видеоизображении видно, что при появлении одоранта жгутик вытягивался по направлению к источнику запаха, замирал в этом положении, совершал резкий мах обратно и менял своё направление на противоположное, вытягиваясь против в градиенте концентрации камфоры. Такое направленное движение обонятельных жгутиков свидетельствует об упорядочении его двигательной активности.

Чтобы объективно оценить двигательную активность обонятельного жгутика, инициируемую одорантом, мы построили траектории движения кончика обонятельного жгутика лягушки в плоскости, перпендикулярной направлению движения жгутика (наподобие фигур Лиссажу), без действия и при стимуляции обонятельной выстилки камфорой (рис. 18).

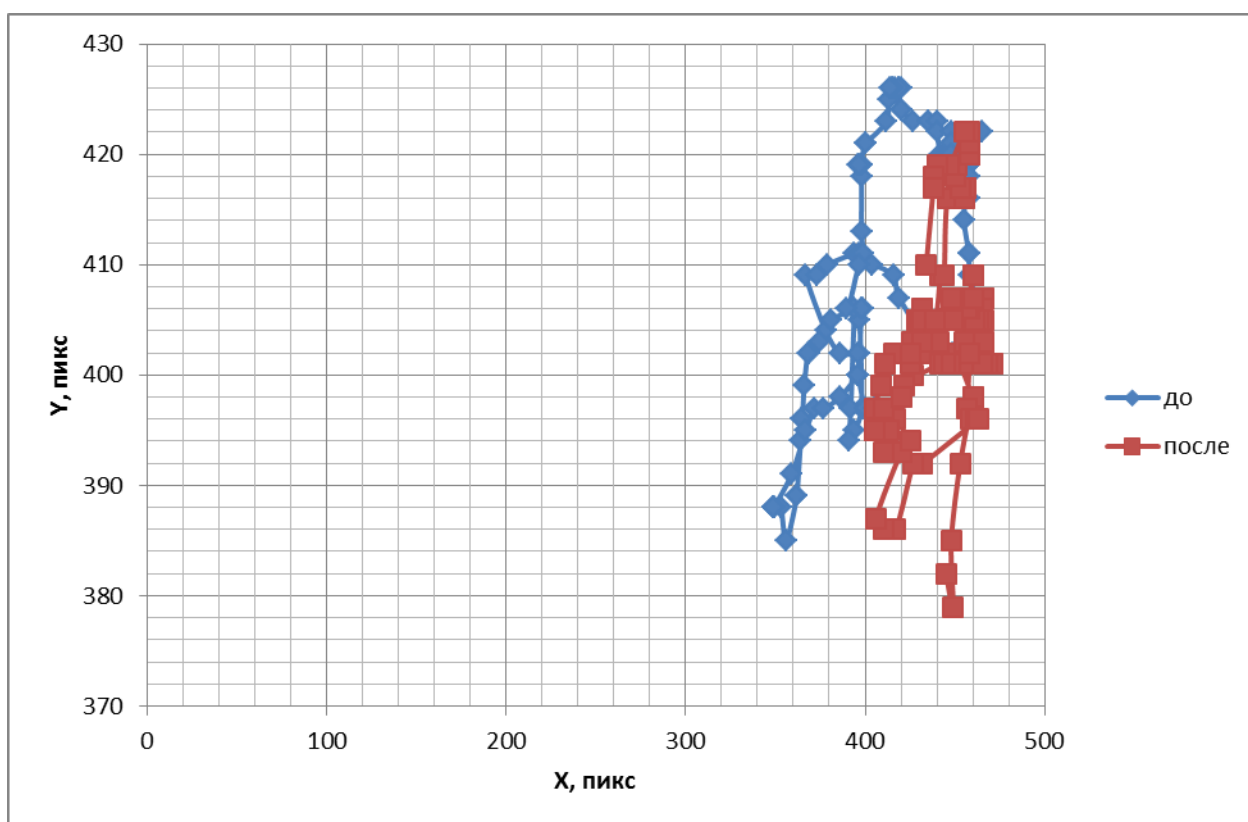


Рис. 18. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия камфорой

На рисунке видно, что под действием камфоры дистальный отдел обонятельного жгутика лягушки совершает свои движения в меньшей области пространства, по сравнению с той, которую он занимал до воздействия пахучим веществом. Эта разница особенно заметна при перемещении его по оси «Х». Кроме того, видно, что эта область смещена в сторону от источника запаха. Это означает, что при стимуляции обонятельной выстилки лягушки камфорой двигательная активность обонятельного жгутика упорядочивается.

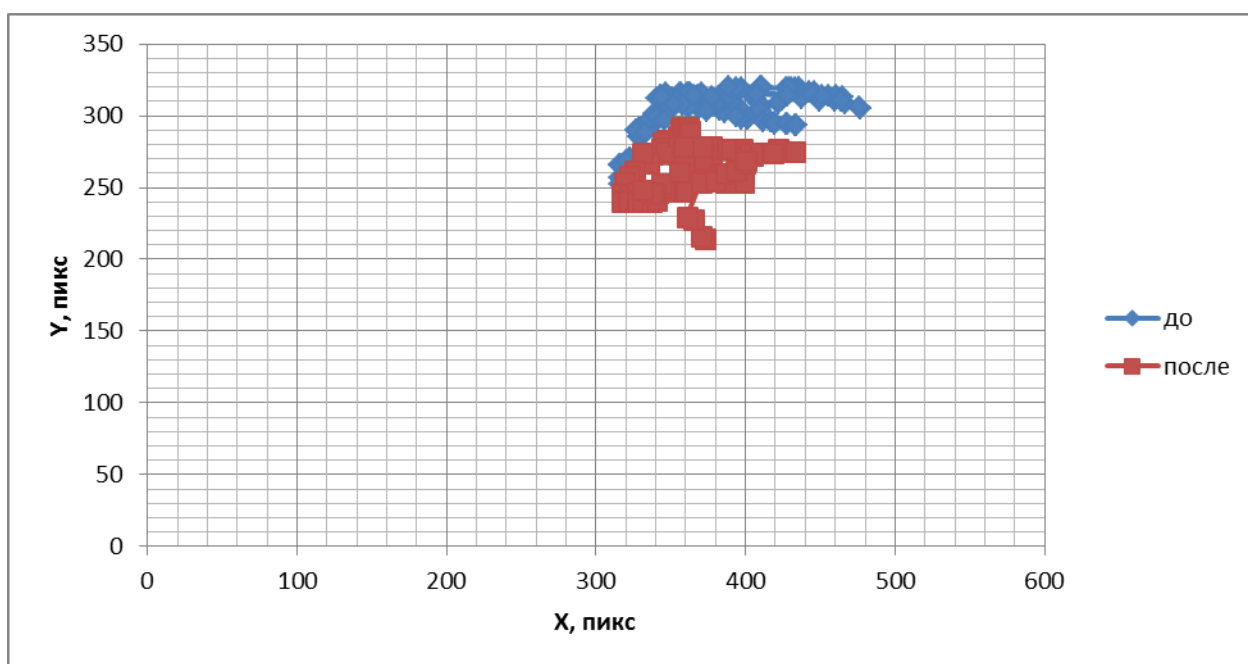


Рис. 19. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика крысы до воздействия и после воздействия камфорой

Как показали результаты наших исследований, обонятельные жгутики крыс под действием камфоры описывают траектории, подобные траекториям движений обонятельных жгутиков лягушек (рис.19).

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что камфора инициирует упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков не только у лягушек, но и у крыс.

При определении средних частот было установлено, что в 70% опытов как у лягушек (N=15) под действием камфоры происходило достоверное

($P < 0,05$) увеличение частоты на $65 \pm 8\%$. При этом в 30% случаев происходило снижение средней частоты движения обонятельного жгутика, однако это снижение было не достоверное ($P > 0,1$). У крыс ($N=3$) в 100% случаев происходило увеличение средней частоты движения на $46 \pm 12\%$.

При построении гармонических спектров сложных колебаний обонятельного жгутика лягушек и крыс мы обнаружили (рис. 20, 21), что в ответ на камфору в гармоническом спектре увеличивалась доля высоких частот, за счет которых спектр расширялся. Это означает, что под действием камфорного запаха движения обонятельных жгутиков не упорядочиваются.

При расчётах энтропии в ответ на действие одоранта на обонятельную выстилку лягушек происходило достоверное ($P < 0,05$) ее повышение на $40 \pm 5\%$, а при воздействии камфоры на обонятельную выстилку крыс происходило достоверное ($P < 0,05$) повышение энтропии на $16 \pm 4\%$. Увеличение энтропии указывает на увеличение неупорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек и крыс, инициируемых одорантом.

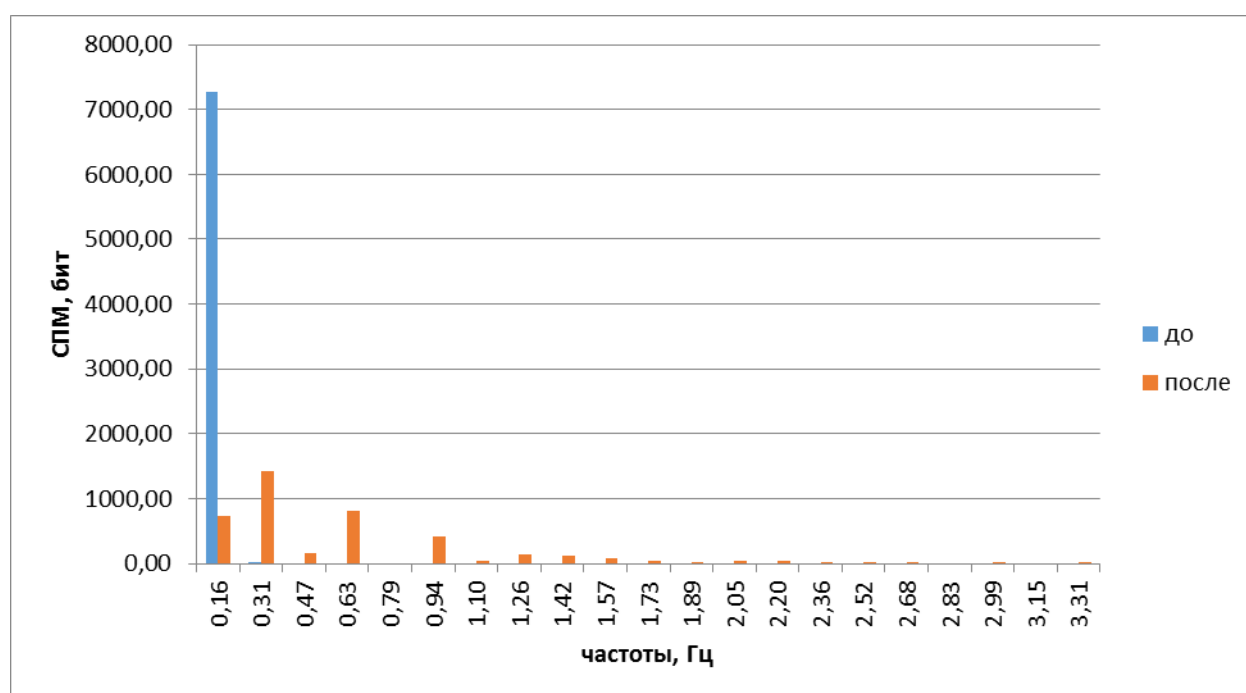


Рис. 20. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия камфорой

Таким образом, влияние камфоры на двигательную активность обонятельных жгутиков отличается от амилового спирта и ванилина. Если траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика, свидетельствуют об упорядочении движений, инициируемых этим одорантом, то направление изменения энтропии и частотного спектра противоречат этому как у лягушек, так и у крыс.

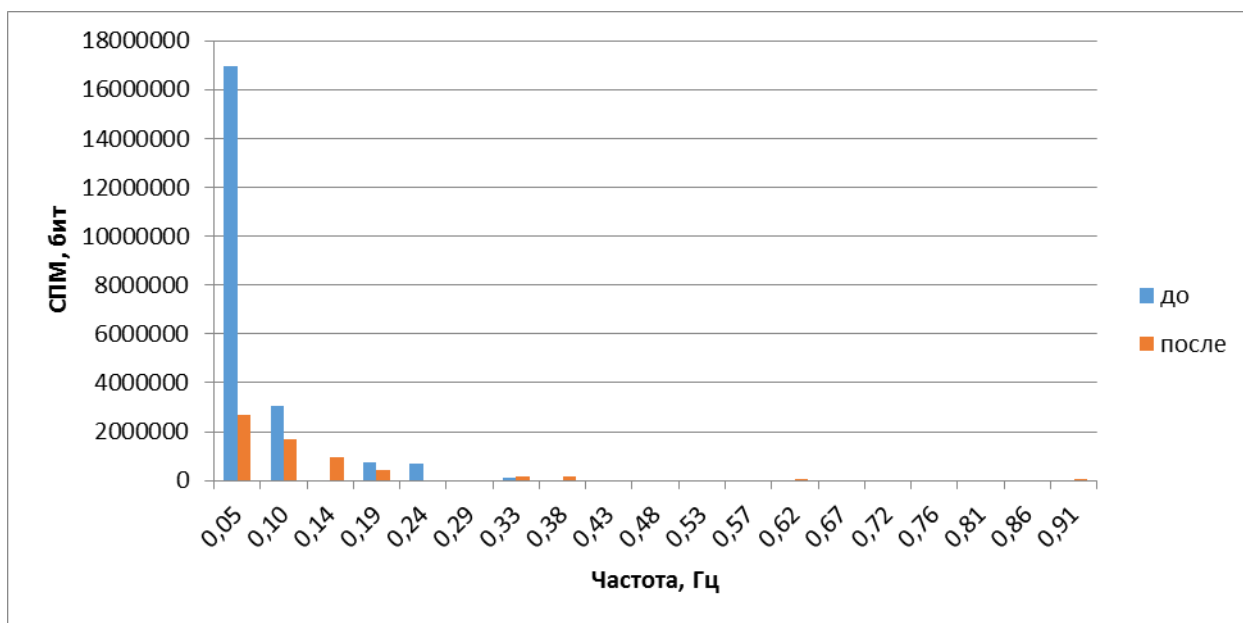


Рис. 21. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика крысы до воздействия и после воздействия камфорой

3.2.4. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушек и крысы под действием цинеола

В следующей серии экспериментов мы исследовали изменение двигательной активности обонятельных жгутиков земноводных (n=15) и крысы (n=1) под влиянием цинеола.

Визуальный анализ видеоизображений показал, что при стимуляции обонятельной выстилки, как лягушек, так и крысы, обонятельный жгутик начинал двигаться более активно. Траектория движения его кончика была достаточно сложной. Под действием одоранта он изгибался и вытягивался. При этом кончик периодически подгибался к проксимальной части и плавно

выпрямлялся, вытягиваясь в струну и замирая на короткий срок в этом положении. Таким образом, можно сказать что кончик обонятельного жгутика в процессе своего движения задерживался в новом пространстве на короткое время. Следовательно, результаты визуального анализа свидетельствуют о переходе двигательной активности обонятельного жгутика из неупорядоченного состояния в упорядоченное, но этот переход кратковременный.

Для объективной оценки изменения подвижности обонятельного жгутика мы построили траектории движения его кончика в плоскости перпендикулярной направлению движения (наподобие фигур Лиссажу), без действия и при стимуляции обонятельной выстилки цинеолом.

На рис. 22, 23 видно, что под действием цинеола кончик обонятельного жгутика смещался в пространстве в сторону источника одоранта в градиенте концентрации. При этом область, охватываемая движущимся кончиком обонятельного жгутика, уменьшалась. Направленное движение обонятельного жгутика в градиенте концентрации цинеола указывает на упорядоченность двигательной активности обонятельного жгутика, инициируемой одорантом, как у земноводных, так и крысы.

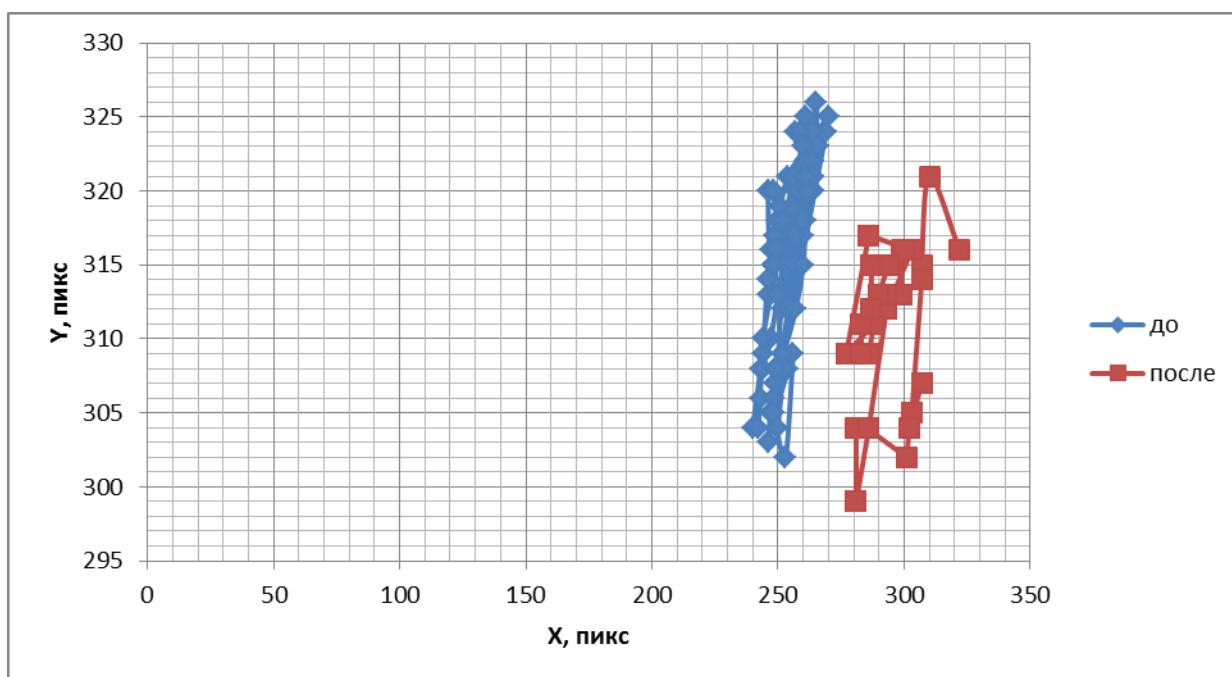


Рис. 22. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия цинеолом

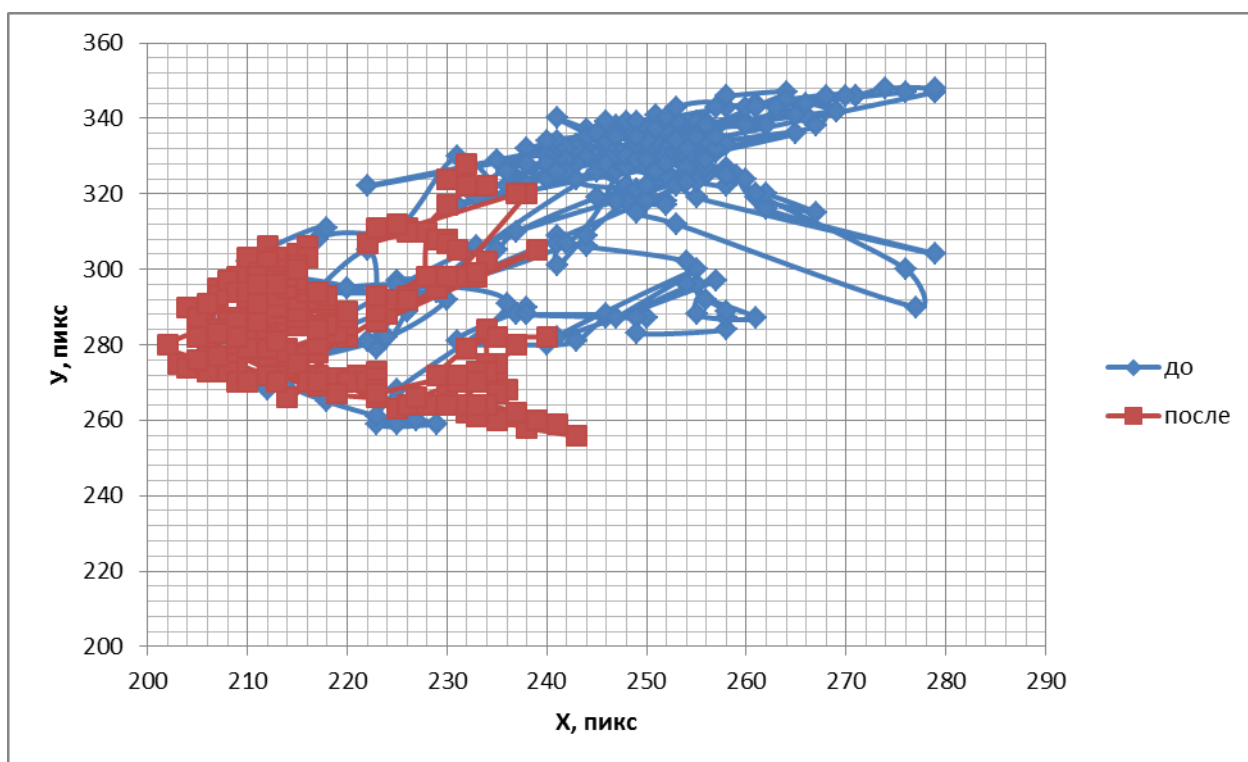


Рис. 23. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика крысы до воздействия и после воздействия цинеолом

При определении средних частот было установлено, что в 82% опытов под действием цинеола у лягушек ($N=15$) происходило достоверное ($P<0,05$) повышение частоты на $26\pm6\%$. В 18% случаев основная частота движения обонятельного жгутика понижалась, но это снижение было не достоверным ($P>0,1$). У крысы средняя частота колебания обонятельного жгутика повышалась на 25% относительно фоновой частоты.

При построении гармонических спектров сложных колебаний обонятельного жгутика на рис. 24, 25 видно, что под влиянием цинеола в гармоническом спектре появлялись высшие гармоники и происходило расширение спектра, при этом увеличивалась доля низких частот. Таким

образом, стимуляция обонятельных выстилок лягушек и крысы приводит к расширению гармонического спектра, что свидетельствует о неупорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков под действием запаха душистого эвкалипта.

Расчёты энтропии показали, что под влиянием одоранта у лягушек в 68% случаев происходило достоверное ($P < 0,05$) ее снижение в среднем на $9 \pm 1\%$. В 20% опытов энтропия повышалась, но повышение было недостоверным ($P > 0,1$). У крысы на фоне воздействия цинеолом энтропия снизилась на 11%. Уменьшение энтропии свидетельствует о переходе неупорядоченного движения жгутика, в упорядоченное.

Таким образом, исходя из данных визуального анализа, траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной его движению и расчётов энтропии, можно заключить, что так же, как амиловый спирт, ванилин и камфора, цинеол инициирует упорядоченность двигательной активности обонятельных жгутиков. И процесс упорядочения двигательной активности происходит, как у лягушек, так и у крыс.

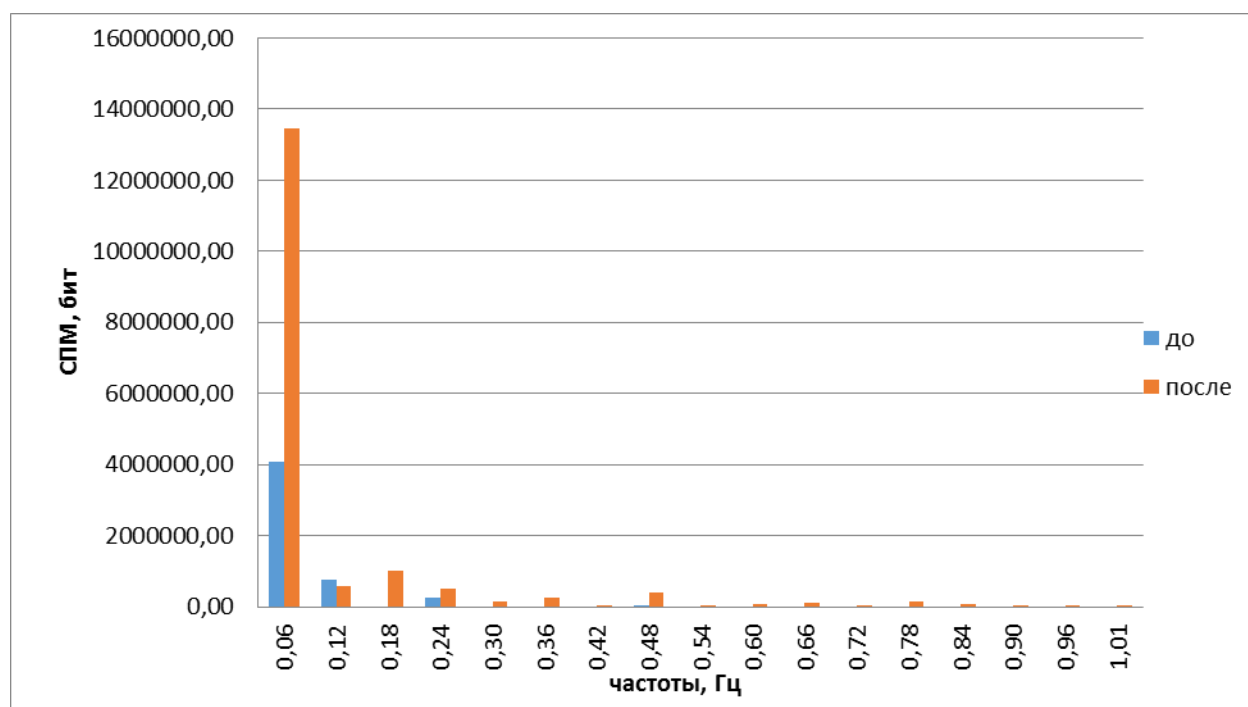


Рис. 24. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия цинеолом

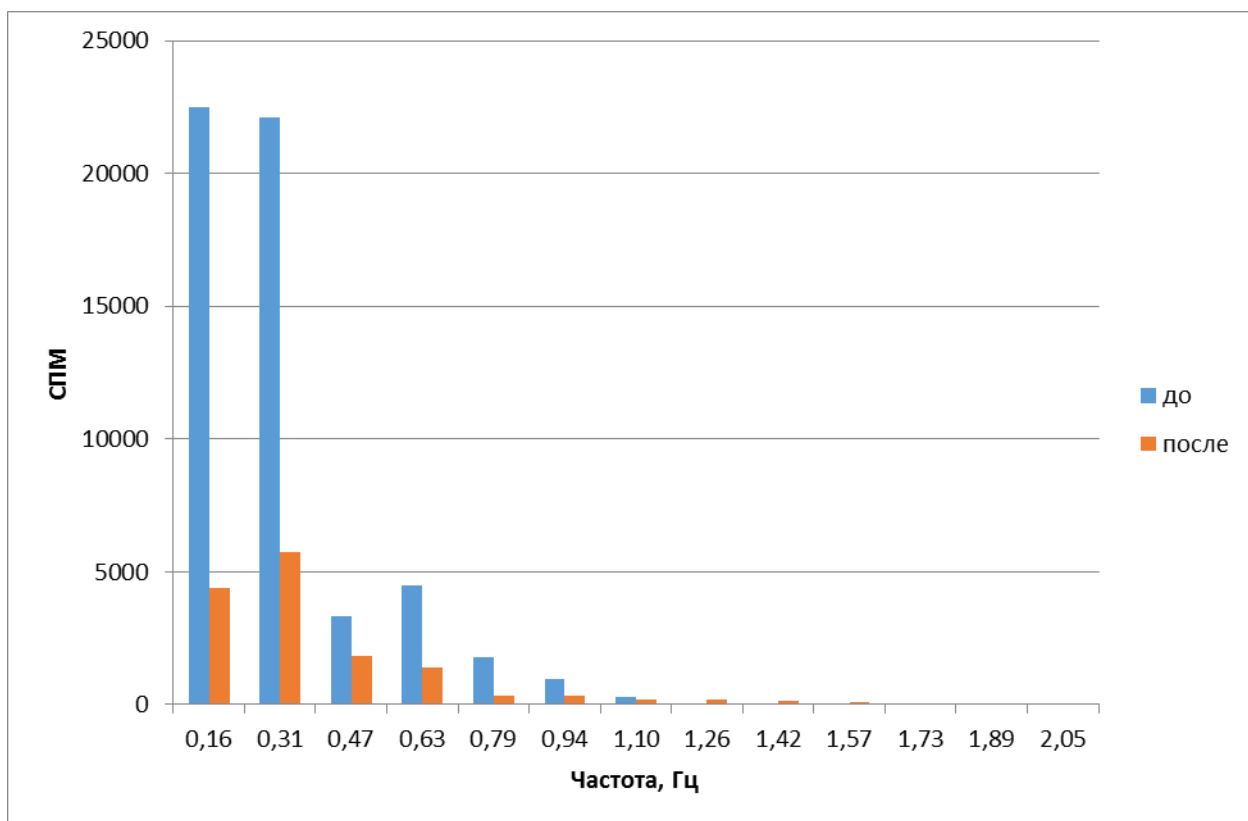


Рис. 25. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика крысы до воздействия и после воздействия цинеолом

3.2.5. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушки под действием сероводорода

Визуальный анализ двигательной активности обонятельных жгутиков лягушки (n=15) выявил, что под действием сероводорода обонятельный жгутик начинал двигаться более активно. Направленность его движений различить было трудно. При этом появлялись дрожательные и замирающие движения. Они сменялись восстановлением двигательной активности обонятельных жгутиков, но жгутики начинали двигаться значительно медленнее, а движения имели судорожный характер. В этот момент жгутики вытягивались в струну и на долгое время (около 15 сек) замирали в таком положении, немного подрагивая.

Построение траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной направлению движения жгутика (наподобие фигур Лиссажу), без действия и при стимуляции обонятельной выстилки сероводородом, показало (рис. 26), что кончик обонятельного жгутика смещается в пространстве, но эти смещения в градиенте концентрации одоранта незначительны. Однако следует отметить, что в отличие от реакции на другие исследуемые нами одоранты (амиловый спирт, ванилин, цинеол) под действием сероводорода кончик обонятельного жгутика лягушки смещался в противоположную сторону от действия стимула.

Другим объективным критерием оценки перехода к упорядоченному движению служили расчёты основных частот. В 75% опытов частота достоверно ($P < 0,05$) возрастала на $13 \pm 5\%$, однако в 25% случаев частота достоверно снижалась ($P < 0,05$) на $68 \pm 3\%$.

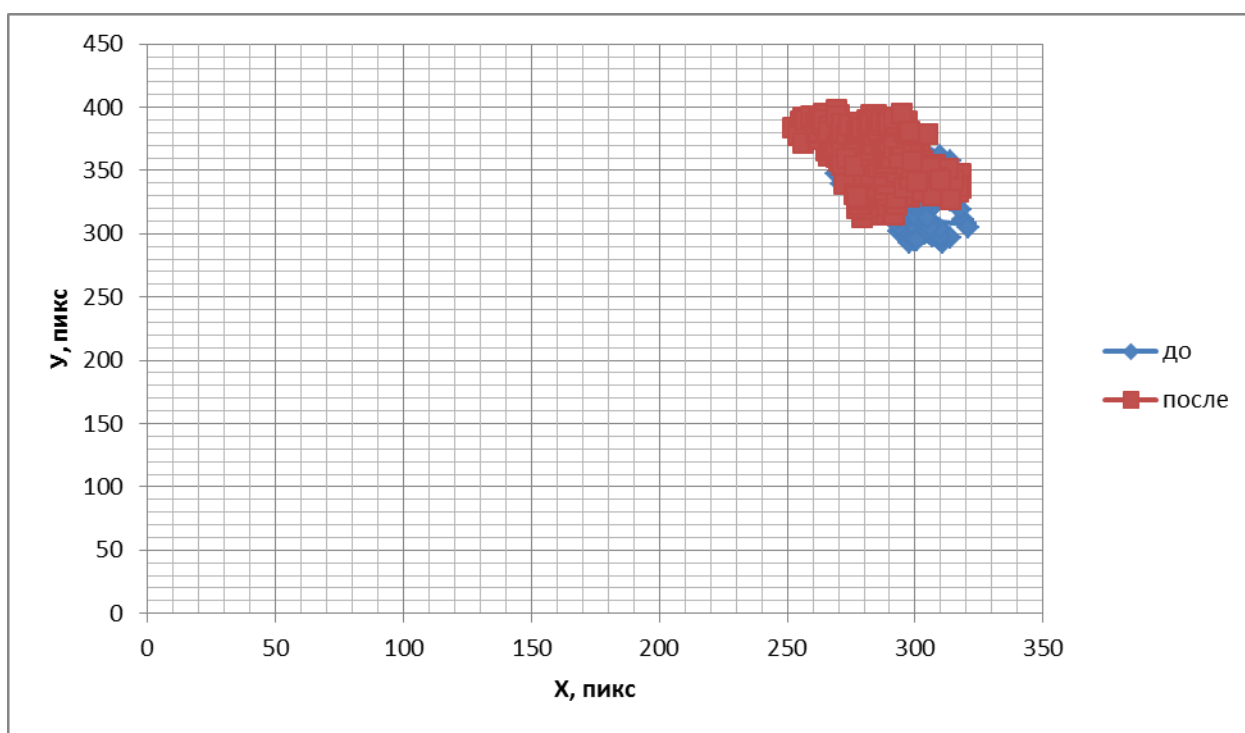


Рис. 26. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия сероводородом

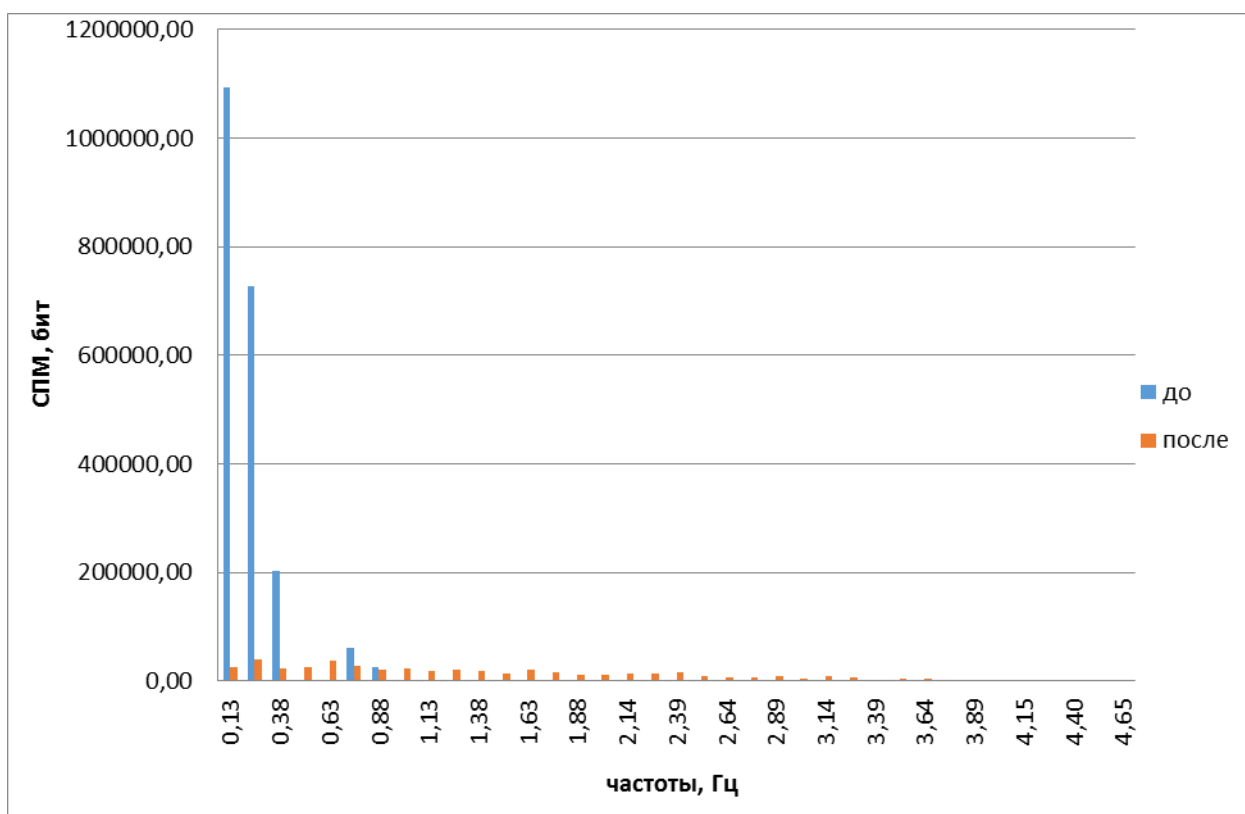


Рис. 27. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия сероводородом

Построение гармонических спектров сложных колебаний обонятельного жгутика показало, что до воздействия (рис. 27) преобладающую долю в спектр вносили низкие частоты (не выше 0,88 Гц). После воздействия сероводородом в спектре появлялись более высокие частоты, за счёт которых происходило расширение гармонического спектра. С одной стороны, результат такой обработки данных свидетельствует о неупорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков, вызванной сероводородом.

С другой стороны, сдвиг спектра в сторону высоких частот с резким уменьшением доли низких частот в нем, а также наблюдаемое значительное уменьшение амплитуды колебаний обонятельного жгутика (дрожание) со смещением их в градиенте концентрации одоранта могут свидетельствовать о переходе к упорядочению двигательной активности обонятельных жгутиков под действием сероводорода.

Эти предположения мы проверили расчётами энтропии. Оказалось, что энтропия достоверно ($P < 0,05$) понижалась на $25\% \pm 1\%$, когда обонятельную выстилку лягушки стимулировали сероводородом. Уменьшение энтропии свидетельствует об упорядочении двигательной активности обонятельных жгутиков.

Таким образом, как визуальный анализ, так и объективные критерии свидетельствуют об упорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков, инициируемой сероводородом. Вместе с тем изменения движений кончика обонятельного жгутика лягушки, вызванные сероводородом, отличаются от амилового спирта, ванилина и цинеола, поскольку направление его движения противоположно направлению действующего стимула.

3.2.6. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков лягушки под действием аммиака

При визуальном анализе под действием аммиака обонятельные жгутики начинали двигаться быстрее и хаотичнее. При этом, если до стимуляции дистальная часть обонятельного жгутика двигалась пассивно, за проксимальной частью, то на фоне одоранта жгутик по всей своей длине начинал змееподобно извиваться. Обонятельный жгутик двигался заметно чаще, и эта частота увеличивалась на протяжении действия стимула. Затем жгутик переставал колебаться, он вытягивался и начинал дрожать. Смещения направления его движения в пространстве в градиенте концентрации аммиака визуальный анализ не выявил.

Для того, чтобы объективно оценить визуальные наблюдения, мы построили траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной направлению движения жгутика (наподобие фигур Лиссажу) без действия и при стимуляции обонятельной выстилки аммиаком.

На рис. 28 мы видим, что действительно смещения области движения жгутика не происходило, за исключением двух небольших участков

траектории, которая выходила далеко за пределы площади, занимаемой траекторией движениями кончика обонятельного жгутика под действием острого запаха.

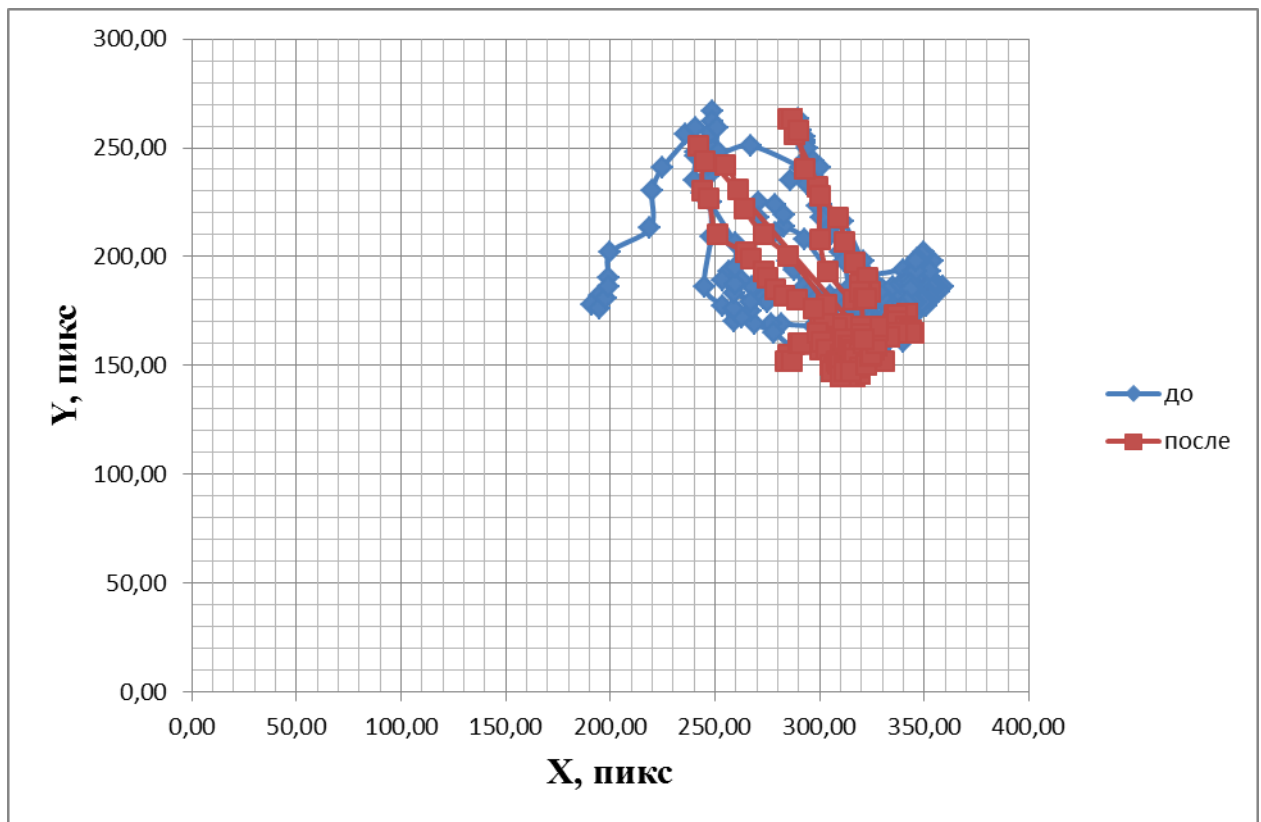


Рис. 28. траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия аммиаком

Таким образом, вероятно, вытягивание обонятельного жгутика обуславливается направлением его движения в градиенте концентрации аммиака, и, по-видимому, свидетельствует о кратковременном упорядочении двигательной активности обонятельных жгутиков лягушки, инициируемых одорантом.

При определении основных гармоник было установлено, что в 100% опытов ($N=15$) под действием аммиака происходило достоверное ($P<0,05$) возрастание частоты с 0,9 Гц до 1,4 Гц (то есть на $35\%\pm 3\%$).

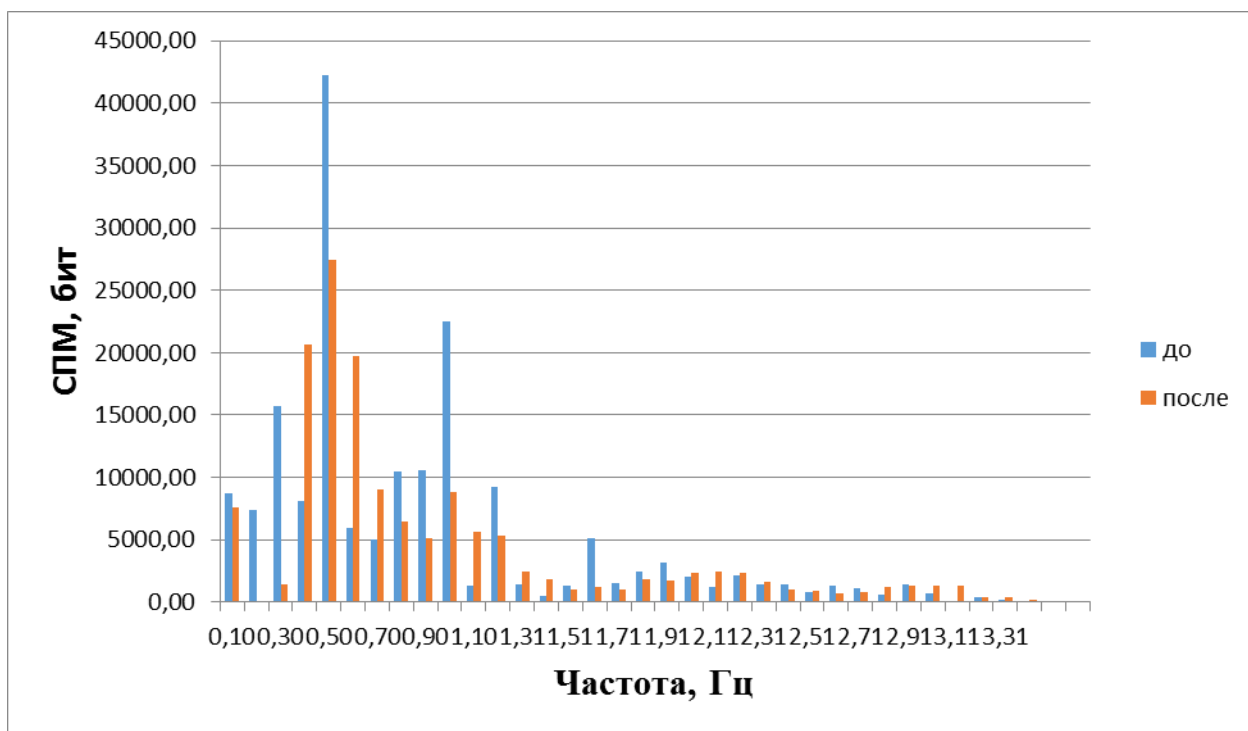


Рис. 29. гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия аммиаком

Сравнивая гармонические спектры колебаний обонятельных жгутиков до и после воздействия (рис. 29) видно, что в присутствии аммиака он смещался в область более высоких частот, где они становились значимыми и появлялись новые частоты, которые отсутствовали в интактном препарате. Вместе с тем частотный спектр обонятельных жгутиков, стимулированных острым запахом, суживался, что означает упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков лягушки под действием аммиака

Это подтверждается расчётами энтропии, которые показали, что происходило достоверное ($P < 0,05$) ее снижение на $15\% \pm 2\%$ в ответ на действие одоранта.

Таким образом, визуальный анализ и используемые нами объективные критерии позволили показать, что обонятельные жгутики лягушек, крыс и кроликов упорядочивают двигательную активность под действием

прогорклого, цветочного и эвкалиптового ароматов, а также при стимуляции обонятельной выстилки лягушек гнилостным и острым запахами.

3.3. Исследование молекулярных систем биологической подвижности обонятельных жгутиков вне и под действием одорантов

3.3.1. Исследование актин-миозиновой молекулярной системы биологической подвижности обонятельных жгутиков лягушки вне и под действием одорантов

Для изучения роли актин-миозиновой системы мы блокировали сборку актиновых филаментов цитохалазином и исследовали влияние самого этого вещества на двигательную активность обонятельных жгутиков лягушек (n=7) и крыс (n=2). Результаты визуального анализа показали, что под действием цитохалазина (4 мкг/мл) подвижность увеличивалась. При этом их рыскающие движения становились более активными и хаотичными.

Для того, чтобы объективно оценить визуальные наблюдения мы построили траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной направлению движения жгутика (наподобие фигур Лиссажу) в интактном препарате и в присутствии цитохалазина. На рис. 30, 31 видно, что на фоне цитохалазина область траектории движения кончика обонятельного жгутика ничем не отличалась от области траектории движения кончика жгутика обонятельной выстилки, не обработанной цитохалазином.

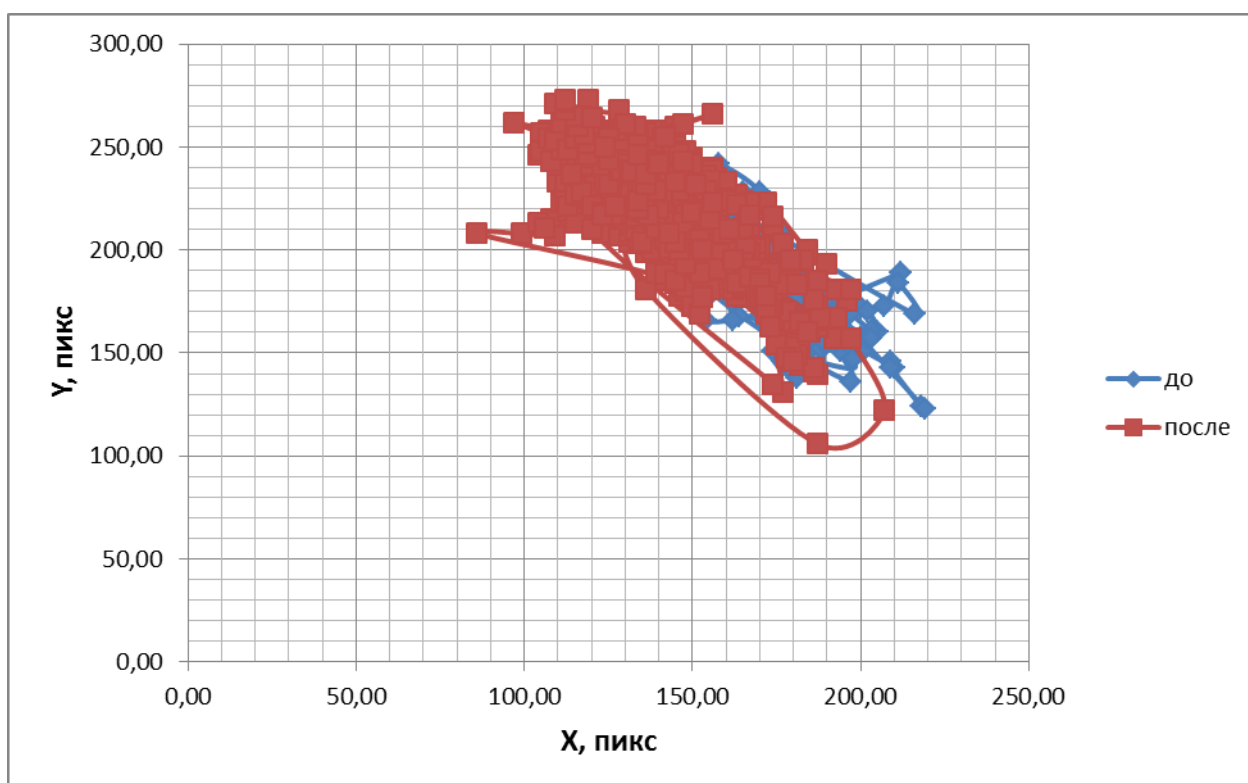


Рис. 30. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до и после воздействия цитохалазином

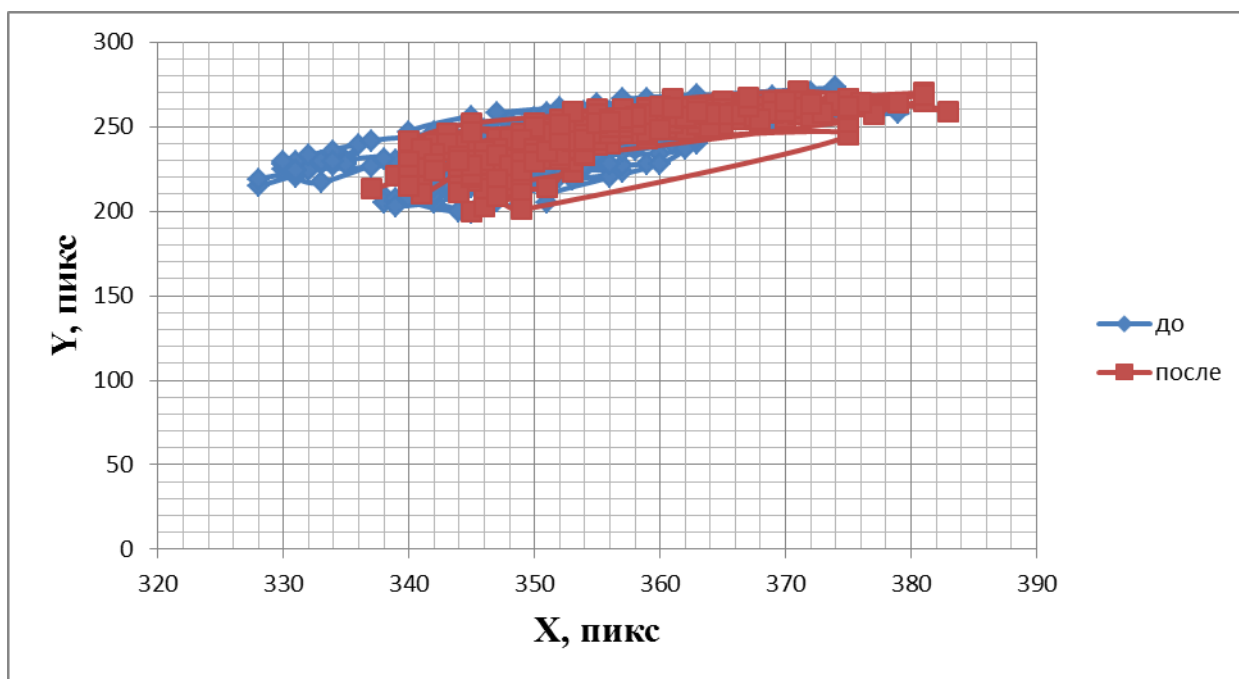


Рис. 31. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика крысы до и после воздействия цитохалазином

Вместе с тем расчёты энтропии показали, что под влиянием цитохалазина происходило значительное достоверное ($P < 0,05$) ее возрастание на $82\% \pm 7\%$. Увеличение энтропии свидетельствует о неупорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков лягушки и крыс, инициируемой цитохалазином.

При определении средних частот колебаний было установлено, что в 100% опытов под действием цитохалазина происходило достоверное ($P < 0,05$) снижение частоты движений обонятельных жгутиков с 0,58 Гц до 0,42 Гц (на $27\% \pm 3\%$).

Сравнение гармонических спектров колебаний обонятельных жгутиков до и после воздействия цитохалазином (рис. 32) показало, что в присутствии цитохалазина увеличивалась амплитуда основной гармоника (0,04 Гц). То есть спектр частот смещается в область более низких частот и расширяется. Низкие гармоники вносили наибольший вклад в двигательную активность жгутиков. Такое расширение спектральных характеристик сложного движения обонятельных жгутиков свидетельствует, по-видимому, о неупорядоченном характере двигательной активности обонятельных жгутиков, как у лягушек, так и у крыс, инициируемым цитохалазином.

Это означает, что обонятельные жгутики интактной обонятельной выстилки вне действия одорантов кратковременно упорядочивали свою подвижность. В основе этого упорядочения лежит кратковременная полимеризация и деполяризация актиновых филаментов в дистальном отделе обонятельного жгутика.

Через 20 минут инкубации выстилки в цитохалазине жгутики двигались значительно медленнее, при этом дистальный конец не совершал кратковременных направленных движений.

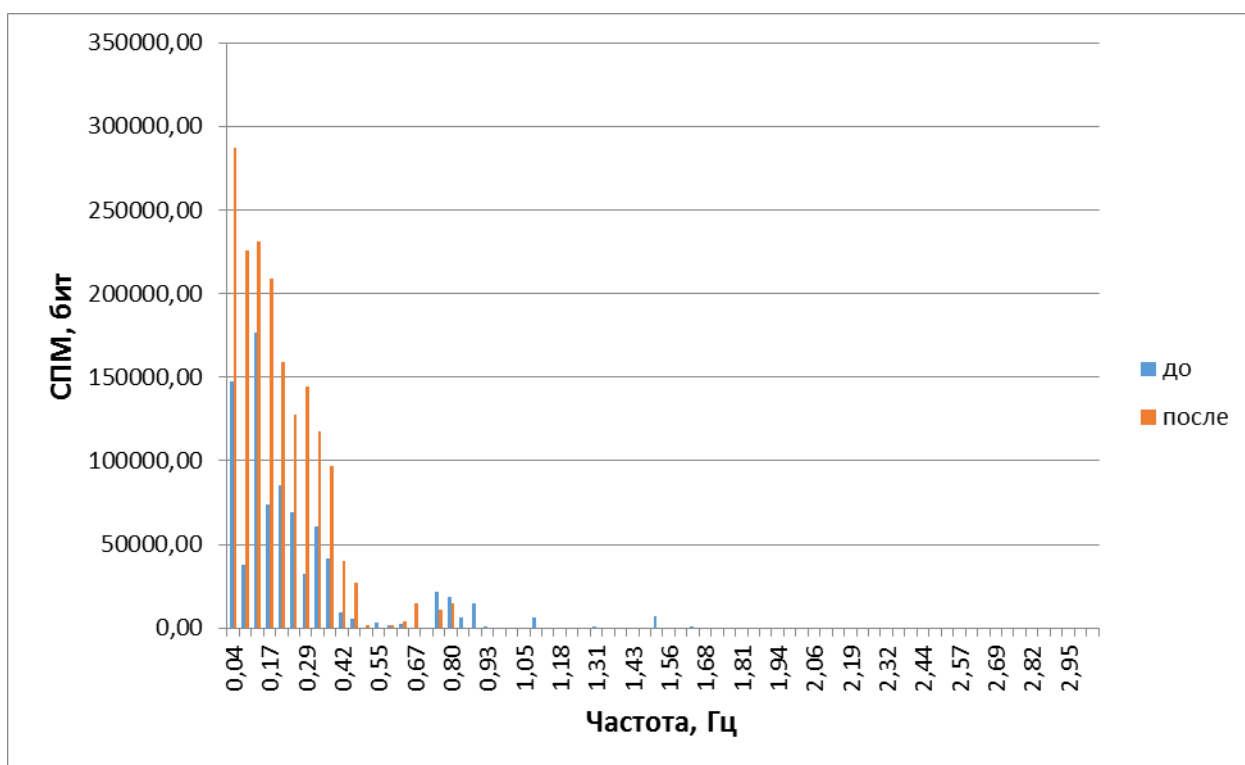


Рис. 32. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия цитохалазином

После инкубации обонятельной выстилки в цитохалазине мы наблюдали за изменением двигательной активности обонятельных жгутиков, инициируемых амиловым спиртом. Визуальный анализ не выявил направленного движения дистального отдела обонятельного жгутика в градиенте концентрации одоранта, что свидетельствует об отсутствии упорядочения движения обонятельного жгутика при нарушении процесса полимеризации актина в нем.

Построение траектории движения кончика обонятельного жгутика в присутствии цитохалазина и после стимуляции обонятельной выстилки амиловым спиртом на фоне цитохалазина (рис. 33) выявило, что под действием амилового спирта на фоне цитохалазина не происходило смещения кончика обонятельных жгутиков лягушки и крысы в направлении градиента концентрации, действующего одоранта. Это также означает, что в отсутствие полимеризованных актиновых филаментов в дистальных отделах

обонятельного жгутика упорядочения двигательной активности не происходило.

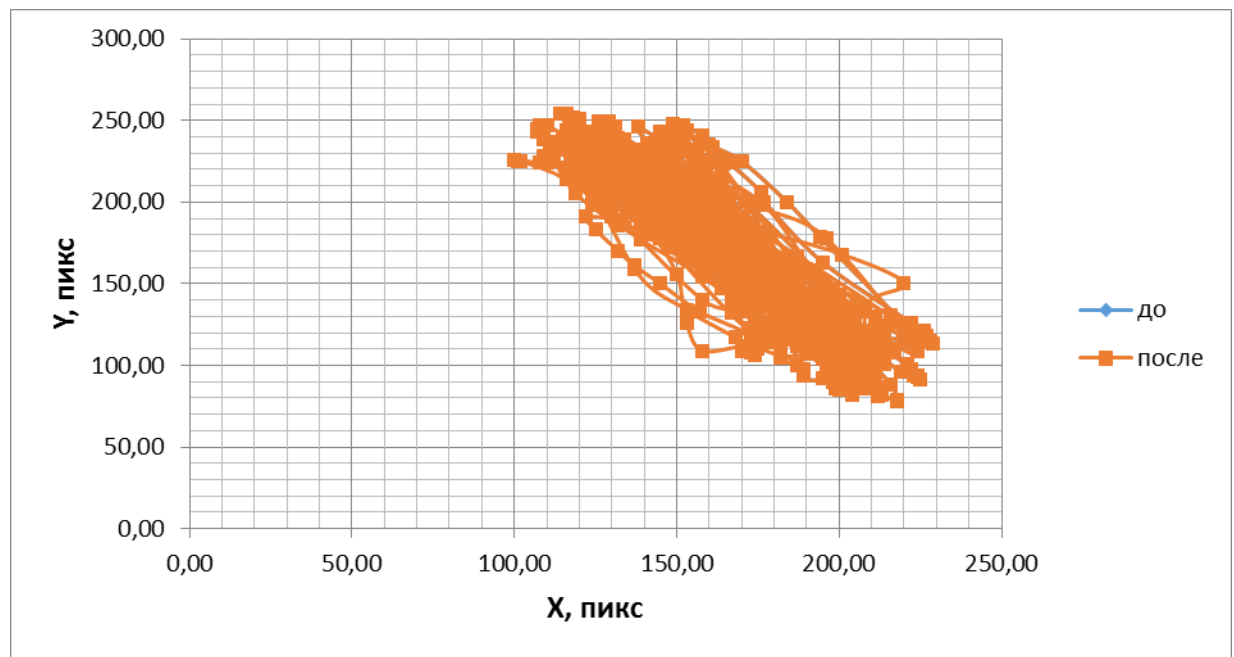


Рис. 33. Траектории наподобие фигур Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до воздействия и после воздействия амиловым спиртом на фоне цитохалазина

Расчёты энтропии подтвердили этот вывод. Оказалось, что под действием амилового спирта на фоне цитохалазина энтропия достоверно ($P < 0,05$) возросла на $41\% \pm 1\%$, что свидетельствует о неупорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков.

При расчётах средней частоты колебаний было установлено, что под действием амилового спирта на фоне цитохалазина в 100% опытов частота движений кончика обонятельных жгутиков достоверно ($P < 0,05$) возросла с 0,68 Гц до 0,89 Гц (на $30\% \pm 1\%$), в отличие от действия амилового спирта на интактный препарат (рис. 34).

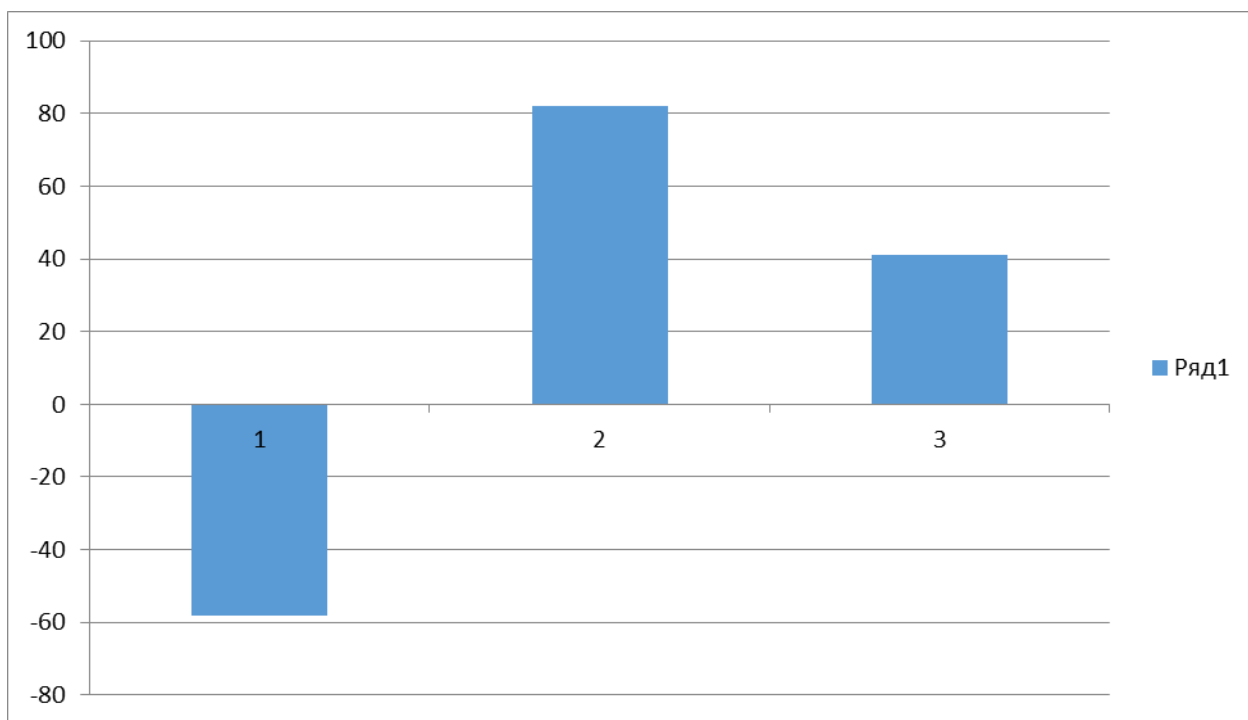


Рис. 34. изменение энтропии на амиловый спирт (1), цитохалазин (2) и реакция на амиловый спирт на фоне цитохалазина (3)

Построение гармонических спектров сложных колебаний обонятельного жгутика (рис. 35) показало, что при стимуляции обработанной цитохалазином обонятельной выстилки амиловым спиртом в гармоническом спектре увеличивалась доля высоких частот, а спектр расширялся. Учащение двигательной активности обонятельных жгутиков и расширение частотного спектра свидетельствуют о неупорядоченности активности обонятельных жгутиков под действием прогорклого запаха.

Таким образом, амиловый спирт не инициирует упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков, когда одорант не способен модулировать полимеризацию мономерного актина в дистальном отделе жгутика.

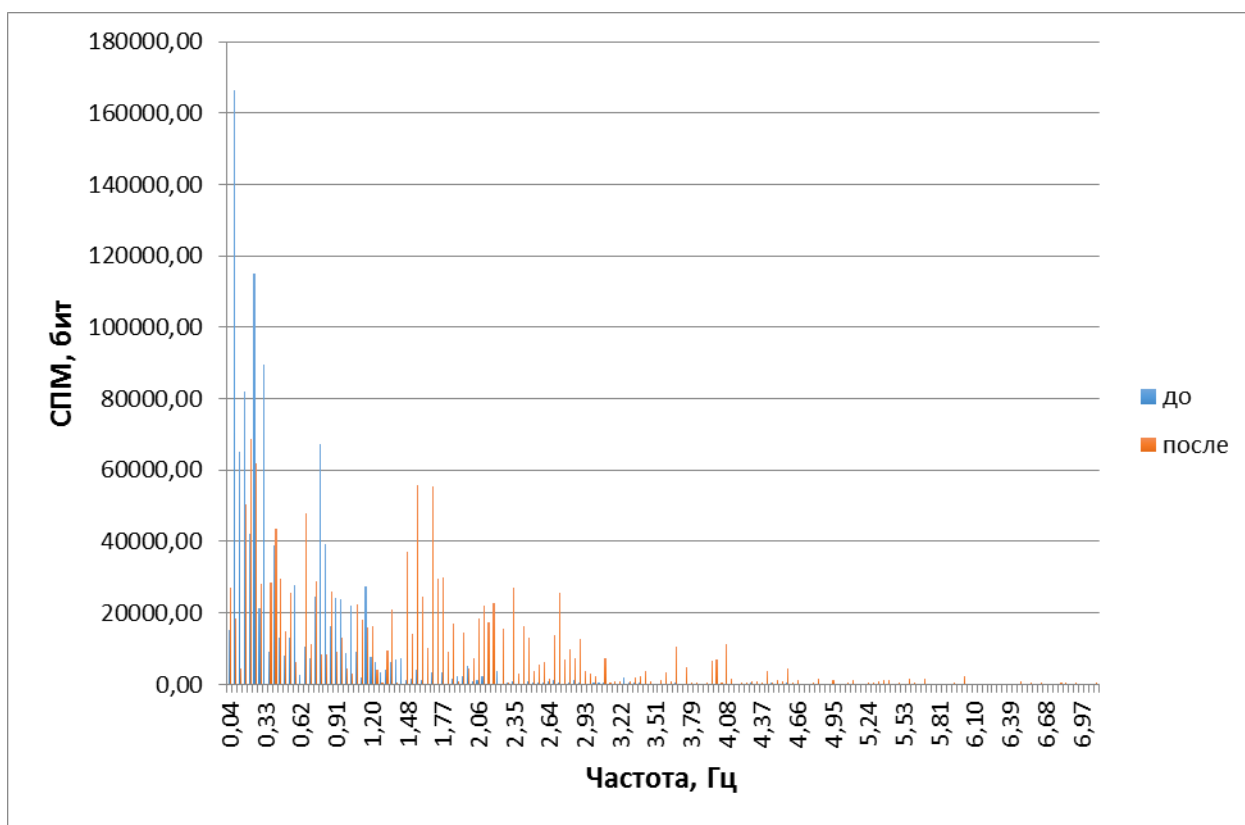


Рис. 35. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до воздействия и после воздействия амиловым спиртом на фоне цитохалазина.

Как показали результаты наших исследований, обонятельные жгутики лягушек и крыс реагировали на камфору и цинеол так же, как и на амиловый спирт. Следовательно, учитывая результаты визуального, фармакологического и математического анализ, можно заключить, что упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков обуславливается полимеризацией G-актина в дистальном отделе обонятельных жгутиков у лягушек, у крыс и кроликов. Таким образом, упорядочение движений [Бигдай Е.В., 2004] обонятельного жгутика обеспечивает актин-миозиновая молекулярная система подвижности.

3.3.2. Исследование тубулин-динеиновой молекулярной системы биологической подвижности обонятельных жгутиков лягушки вне и под действием одорантов

Для изучения роли тубулин-динеиновой молекулярной системы биологической подвижности в движении обонятельного жгутика мы разрушали микротрубочки аксономы с помощью колхицина, который в высоких концентрациях до 1 мМ деполяризует их. Прежде, чем обрабатывать обонятельную выстилку колхицином мы оценивали реакции обонятельного жгутика на одорант, поскольку необходимо было выявить тот обонятельный жгутик, который реагировал на этот запах упорядочением своей двигательной активности. Затем препарат отмывали от амилового спирта, и инкубировали в течение 30 минут в растворе колхицина, наблюдая за его поведением. Оказалось, что под действием колхицина проксимальный конец жгутиков лягушки ($n=10$) замедлял своё движение и останавливался. Это означает, что в отсутствии одоранта движение проксимального отдела обонятельного жгутика обеспечивается тубулин-динеиновой системой подвижности. Вместе с тем подвижность дистального отдела сохранилась. При этом он двигался быстрее, активнее. Неупорядоченность его возрастала.

Кроме того, после обработки колхицином через 2,5 минуты обонятельные жгутики начинали флуоресцировать. Следовательно, повышение интенсивности флуоресценции для обонятельных жгутиков, инициируемой колхицином, обуславливается деполимеризацией микротрубочек в аксонеме обонятельных жгутиков

Для объективной оценки изменения подвижности обонятельного жгутика мы строили траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости перпендикулярной направлению движения жгутика (наподобие фигур Лиссажу) без действия колхицина и его фоне. На рис. 36 видно, что под действием колхицина дистальный отдел обонятельного жгутика лягушки совершает свои движения в пространстве, занимающем большую площадь,

чем до воздействия колхицином. И эта область смещена относительно другой области за счет увеличения размаха колебаний обонятельного жгутика, которые приводят к увеличению площади.

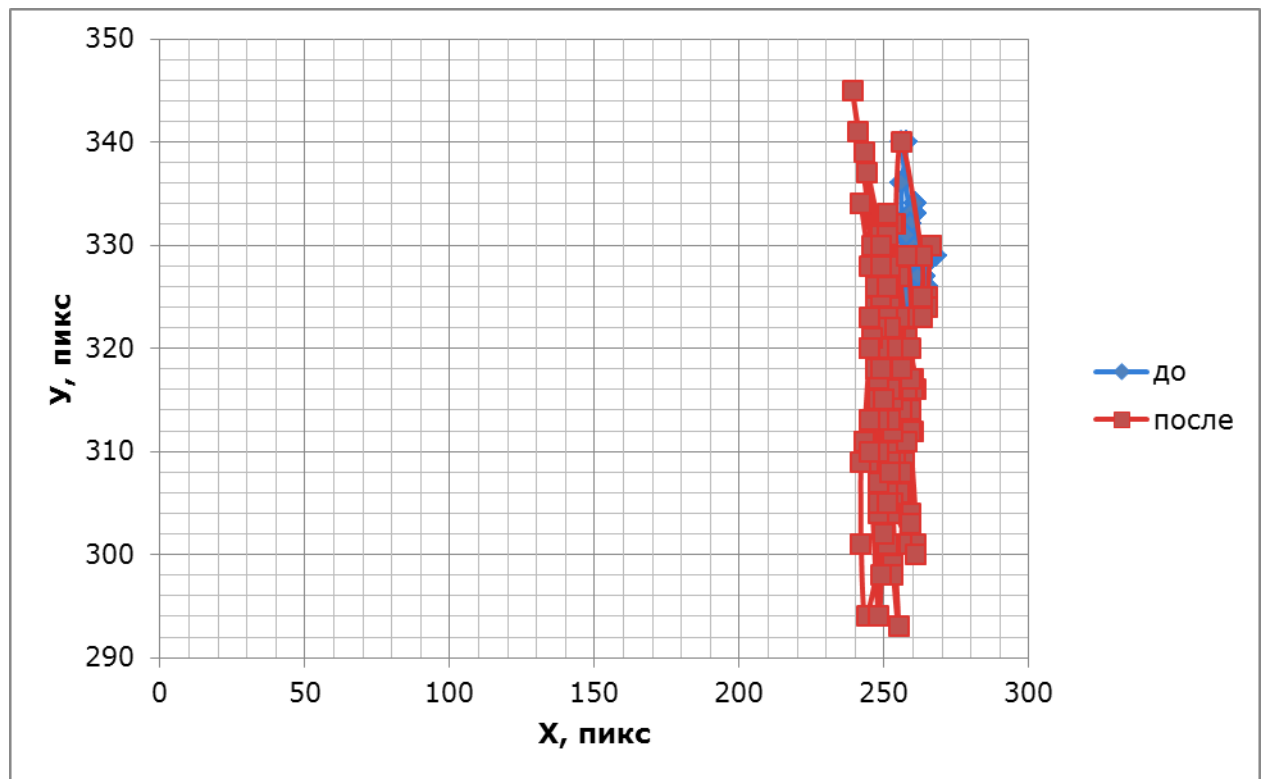


Рис. 36. Траектории наподобие фигур Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до и после воздействия колхицином

Расчёты энтропии показали, что происходило достоверное ($P < 0,05$) ее повышение на $42\% \pm 5\%$ в ответ на действие колхицина. Полученные данные говорят об увеличении неупорядоченного движения жгутика, инициируемого колхицином.

При определении основных гармоник было установлено, что у лягушек ($N=10$) под действием колхицина происходило достоверное ($P < 0,05$) увеличение частоты с 0,43 Гц до 0,58 Гц (на $25\% \pm 4\%$).

Данные расчётов основных гармоник были подтверждены построением гармонических спектров сложных колебаний обонятельного жгутика. На рис. 38 видно, что при инкубации обонятельной выстилки в колхицине в

гармоническом спектре увеличивается доля высоких частот и происходит расширение спектра. Появляются новые, более высокие частоты, которые отсутствовали при фоновом движении в отсутствие колхицина. Это означает, что под действием колхицина неупорядоченность двигательной активности обонятельных жгутиков увеличивалась.

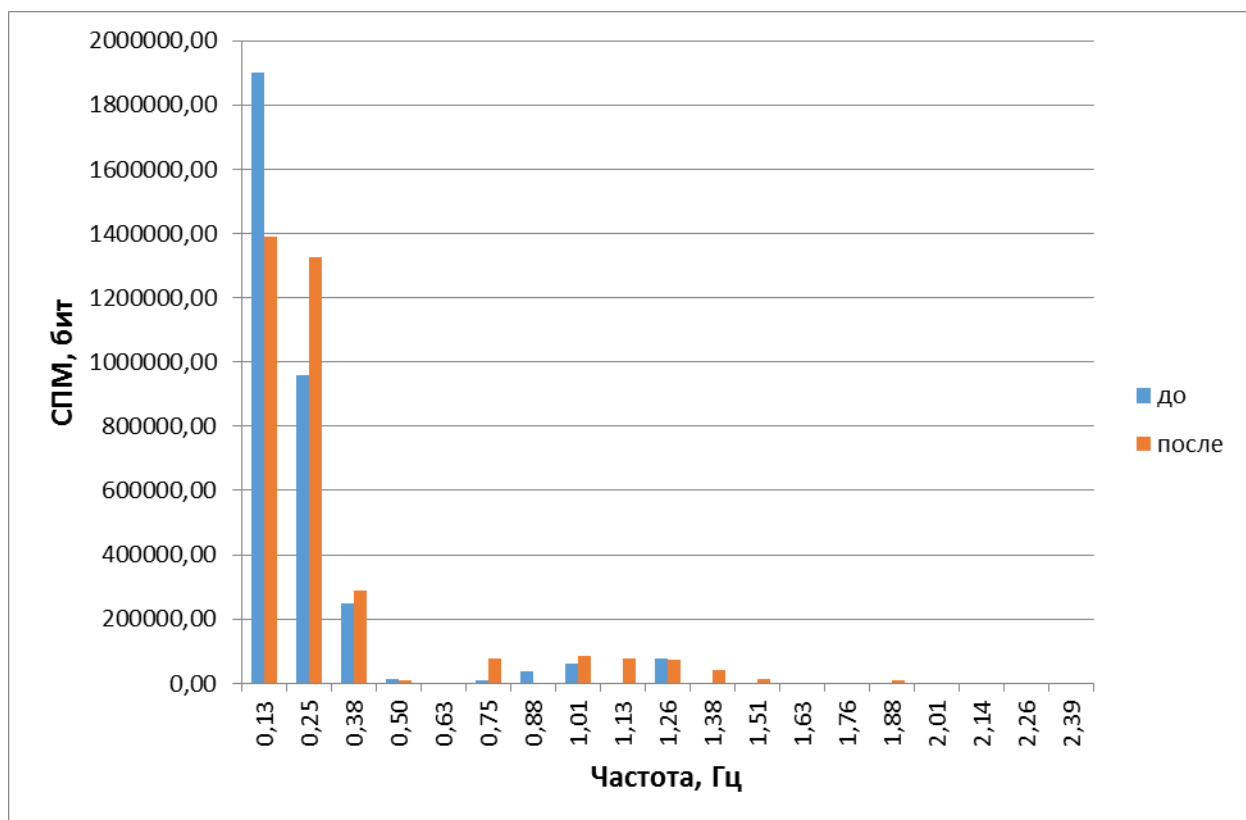


Рис. 37. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до и после воздействия колхицином

Следовательно, деполяризация микротрубочек в проксимальном отделе обонятельного жгутика увеличивает неупорядоченность двигательной активности в его дистальной части.

Можно предположить, что целостность тубулин-динеиновой молекулярной системы подвижности сопряжена с кратковременной полимеризацией и деполимеризацией актина в дистальной области, которая обеспечивает кратковременные упорядочения двигательной активности обонятельных жгутиков в отсутствие одоранта.

Возможно, что при разрушении микротрубочек в проксимальном отделе обонятельного жгутика дистальный участок продолжает реагировать на одорант упорядочением своей активности. Для подтверждения упорядочения дистального участка обонятельного жгутика мы на фоне колхицина стимулировали обонятельную выстилку амиловым спиртом.

Визуальный анализ показал, что под действием одоранта кончик обонятельного жгутика начинал более активно двигаться, с замираниями, похожими на замирания, возникающие при действии амилового спирта в отсутствие колхицина. Однако выявление перехода от неупорядоченного движения к упорядоченному посредством визуального анализа имело субъективный характер.

Построение траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной направлению движения жгутика (наподобие фигур Лиссажу), без действия и при стимуляции обонятельной выстилки амиловым спиртом на фоне колхицина показало (рис. 38), что под действием амилового спирта на фоне колхицина дистальный отдел обонятельного жгутика лягушки не изменяет площади, в которой он двигался, по сравнению с той, которую он занимал при стимуляции одорантом. Однако эта область смещена в сторону источника запаха, что было не заметно при визуальном анализе. Интересно отметить, что движения обонятельного жгутика под действием прогорклого запаха на фоне колхицина были размашистыми со смещением области в которой двигался кончик жгутика. Такой характер движения обонятельного жгутика может быть обусловлен нарушением тубулин-динеиновой системы, которая не способна в этих условиях совершать ротационные движения.

Расчёты энтропии показали, что под действием одоранта на фоне колхицина происходило достоверное ($P < 0,05$) ее снижение на $5\% \pm 1,2\%$ в ответ на действие одоранта. Это означает переход к упорядочению

двигательной активности обонятельных жгутиков, инициируемый амиловым спиртом, независимо от целостности тубулин-динеиновой системы.

При определении основных гармоник было установлено, что под действием амилового спирта на фоне колхицина в 100% опытов у лягушек (N=15) происходило достоверное ($P < 0,05$) уменьшение частоты с 0,4 Гц до 0,27 Гц (на 32%±5%).

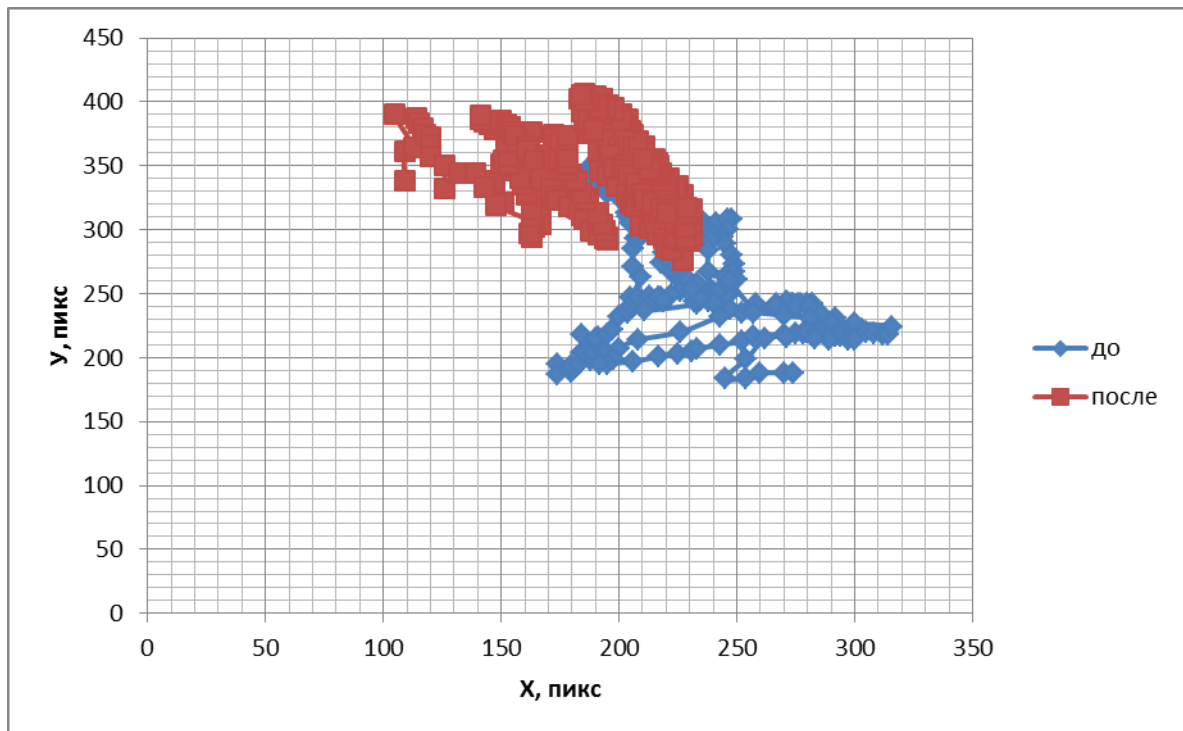


Рис. 38. Траектории наподобие фигур Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до и после воздействия амиловым спиртом на фоне колхицина

При построении гармонических спектров сложных колебаний обонятельного жгутика на рис. 40 видно, что при стимуляции обонятельной выстилки амиловым спиртом в гармоническом спектре незначительно увеличивается доля высоких частот, при этом расширения спектра не происходит, что также свидетельствуют об упорядочении двигательной активности обонятельных жгутиков под действием запаха.

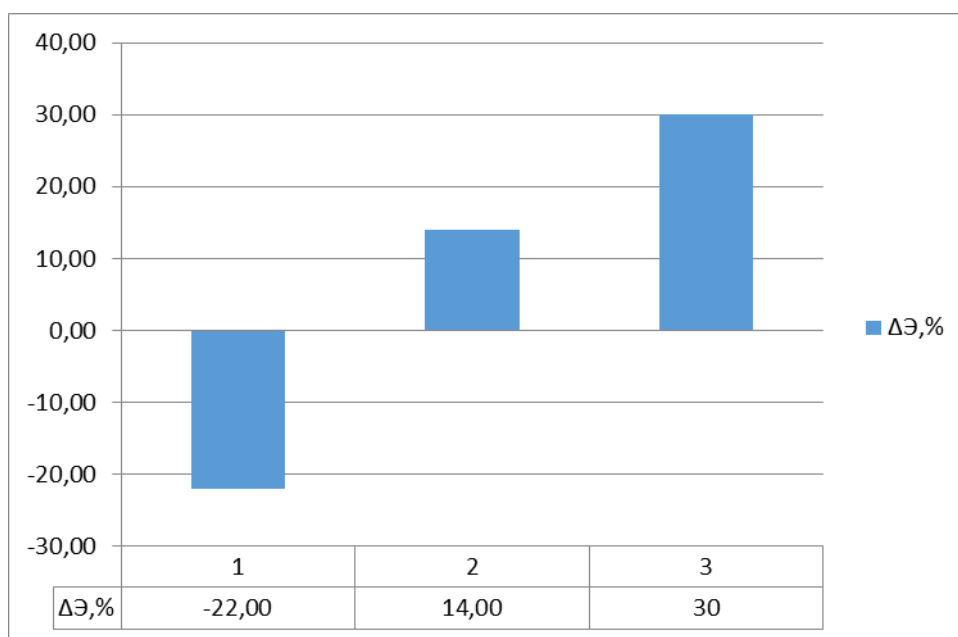


Рис. 39. Изменение энтропии в ответ на амиловый спирт (1), колхицин (2) и амиловый спирт на фоне колхицина (3)

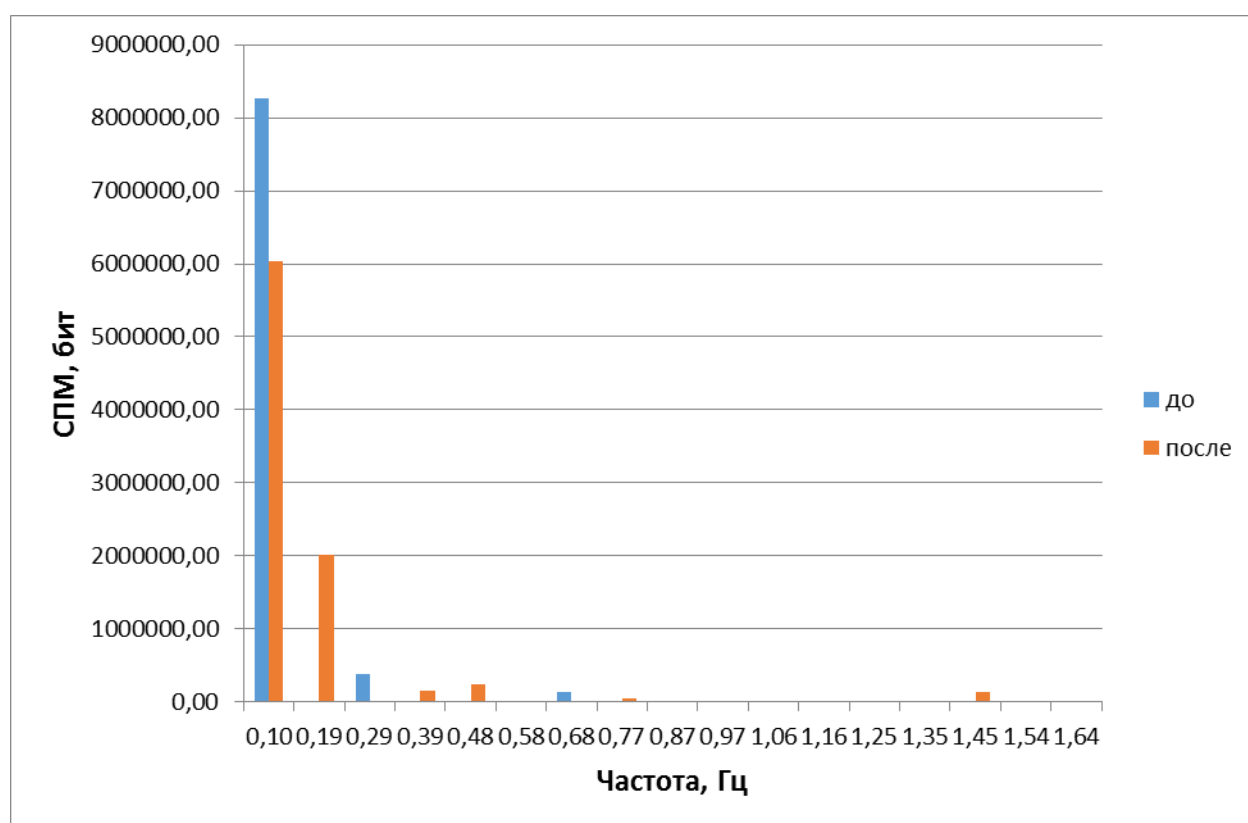


Рис. 40. Гармонические спектры сложных колебаний обонятельного жгутика до и после воздействия амиловым спиртом на фоне колхицина

Таким образом, тубулин-динеиновая система обеспечивает движения жгутика вне стимула, поддерживая рыскающие, неупорядоченные движения и, по-видимому, не участвует в их упорядочении.

3.3.3. Исследование роли взаимодействия актин-миозиновой и тубулин-динеиновой молекулярных систем биологической подвижности обонятельных жгутиков лягушки вне и под действием одорантов

Для того чтобы изучить взаимовлияние актин-миозиновой и динеин-тубулиновой систем на подвижность обонятельных жгутиков ($n=7$) мы сначала стимулировали интактный обонятельный эпителий лягушки одорантом. Это позволило нам определить жгутик, который упорядочивал свою двигательную активность под действием пахучего стимула. Затем мы инкубировали обонятельную выстилку в растворе колхицина. Колхицин разрушал микротрубочки, вызвав остановку проксимальной части жгутика.

Мы инкубировали препарат в растворе цитохалазина, чтобы остановить сборку актина. Визуальный анализ показал, что под действием цитохалазина жгутики, в которых разрушены микротрубочки, сначала учащали своё движение, но вскоре уряжали и останавливались. Реакция таких обонятельных жгутиков на цитохалазин отличалась от реакции обонятельных жгутиков с интактными микротрубочками, когда остановки жгутиков не происходило. Через некоторое время воздействовали на обонятельные жгутики амиловым спиртом, но жгутики движение не возобновляли.

Таким образом, наши экспериментальные исследования показали, что в движении обонятельных жгутиков участвуют две молекулярные системы биологической подвижности:

- 1) динеин-тубулиновая система, обеспечивающая неупорядоченное движение жгутика вне стимула;
- 2) актин-миозиновая система, которая обеспечивает упорядочивание движения обонятельного жгутика под действием одоранта.

Только во взаимодействии двух систем подвижности возможно осуществление упорядоченности движения жгутиков под действием одоранта и их направленное движение к источнику запаха, как и рыскающие движения вне действия стимула.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пионером систематических исследований двигательной активности обонятельных жгутиков методом прижизненной микроскопии можно признать А.А. Бронштейна. Он показал, что обонятельные жгутики различных видов животных, включая млекопитающих, обладают подвижностью как в присутствии, так и в отсутствие одорантов [Бронштейн А. А., 1977]. Однако с его данными не согласны большинство зарубежных исследователей [Menco B.Ph.M., 1992, Satir P., 2007, Salathe M., 1999]. Следует отметить, что их точка зрения основана на данных, полученных посредством электронной микроскопии, по результатам которой было обнаружено, что в аксонеме отсутствует динеин [Moran D.T. et al., 1983, Kerjaschki D. et al., 1976]. Вместе с тем известно, что в природе существуют аксонемы потерявшие динеиновые ручки или внутренние динеиновые ручки, но сохранившие при этом подвижность [Farnum C.E. et al., 2012, Silflow C.D., 2001].

В нашей работе была использована методика прижизненной телевизионной микроскопии высокого разрешения с использованием объективных критериев оценки изменения двигательной активности обонятельных жгутиков. Это позволило нам не только подтвердить, углубить и расширить данные, полученные А.А. Бронштейном, но и разобраться в молекулярных механизмах двигательной активности обонятельных жгутиков.

4.1. Подвижность обонятельных жгутиков вне действия стимула

Результаты наших исследований показали, что обонятельные жгутики как земноводных, так и млекопитающих, включая человека, вне действия пахучего стимула двигаются, и характер их двигательной активности сходен.

Движения обонятельных жгутиков асинхронны и сложны по форме. Они отличаются от строго упорядоченных колебаний ресничек респираторного

эпителия. В движениях обонятельных жгутиков отмечается большое разнообразие – они двигаются волнообразно, воронкообразно, маятникообразно, кругообразно. Вне стимуляции одорантами обонятельные жгутики совершают рыскающие движения, они сходны с движениями «хлыста в руке погонщика». Такой характер двигательной активности связан, вероятно, с тем, что полноценная аксонема присуща только проксимальному отделу обонятельного жгутика.

Известно, что все подвижные реснички и жгутики имеют аксонему с конфигурацией $(9 \times 2) + 2$ (рис. 1) [Бронштейн А.А., 1977, Silflow C.D., 2001, Salathe M., 2007]. Особенностью такой конфигурации является наличие 9 пар периферических дублетов микротрубочек и центральной пары микротрубочек.

4.1.1. Тубулин-динеиновая молекулярная система биологической подвижности обонятельных жгутиков

Мы предположили, что именно тубулин-динеиновая молекулярная система подвижности, сосредоточенная в проксимальном отделе обонятельных жгутиков, участвует в их движениях вне действия стимула. Для проверки этого предположения мы обрабатывали обонятельную выстилку колхицином, который ингибирует образование микротрубочек, а в достаточно высокой концентрации разрушает их [Ravelli R.B., 2003, Maier U.H., 1997, Katzung B.G., 1995]. Результаты наших исследований показали, что под действием колхицина, то есть в отсутствие нормального функционирования тубулин-динеиновой системы обонятельные жгутики останавливались.

При обработке обонятельной выстилки колхицином мы наблюдали два эффекта. Во-первых, в обонятельных жгутиках возникала флуоресценция, поскольку известно, что свечение возникает при связывании колхицина с гетеродимерами α - β -тубулина на которые распадаются микротрубочки, следовательно, флуоресценция может свидетельствовать о нарушении

молекулярной структуры аксонемы в результате деполимеризации ее микротрубочек в обонятельных клетках. Во-вторых, появление свечения коррелирует с остановкой обонятельных жгутиков под действием колхицина. Это означает, что остановка обонятельных жгутиков обуславливалась деполимеризацией микротрубочек вызванной высокими концентрациями колхицина. Следовательно, в отсутствие одоранта двигательная активность обонятельных жгутиков осуществляется благодаря тубулин-динеиновой молекулярной системе подвижности.

Теория скольжения для тубулин-динеиновой системы респираторных ресничек была разработана P. Satir [1990] по аналогии с актин-миозиновым скольжением в скелетном миоците [Satir P., 1990]. Согласно этой теории, механохимический процесс взаимодействия динеина с тубулином обеспечивается гидролизом АТФ, причём АТФазной активностью обладают головки динеина. В результате такого взаимодействия происходит перемещение друг относительно друга двух дублетов микротрубочек, соединённых динеиновыми ручками [Bui K.N. et al., 2009]. АТФ требуется для отсоединения динеина от тубулина, чтобы сделать следующий шаг вдоль аксонемы.

Таким образом, для функционирования тубулин-динеиновой системы в аксонеме обонятельного жгутика требуется энергетическое обеспечение, поскольку при ингибировании клеточного дыхания (ротеноном и маланатом Na) обонятельные жгутики останавливаются [Руденко Я.Н., 2007]. Митохондрии, продуцирующие АТФ, располагаются в булаве обонятельного жгутика [Бронштейн А.А., 1977, Voet, D. et al., 1990]. Они являются определяющим фактором ольфакторной сигнализацией. АТФ из митохондрии диффундирует вдоль аксонемы обонятельного жгутика.

Известно, что в обеспечении движений ресничек участвует не только АТФ, но и ионы Ca^{2+} [Menini A., 2004, De Palo G., 2013]. Для двигательной активности обонятельных жгутиков также необходимы ионы Ca^{2+} . Повышение

концентрации Ca^{2+} в цитозоле осуществляется двумя путями: входом Ca^{2+} через ионные каналы из внеклеточной среды или высвобождением его из эндоплазматического ретикулума, который является внутриклеточным хранилищем этого иона. Показано, что выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо не вносит вклад в повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} обонятельного жгутика [Selvaraj S., 2012]. Вместе с тем опыты на обонятельных жгутиках показали, что в отсутствие ионов Ca^{2+} они останавливались [Бигдай Е.В., 2013]. Следовательно, для двигательной активности обонятельных жгутиков необходим вход Ca^{2+} из внешней среды [Selvaraj S., 2012].

В экспериментах с обработкой обонятельной выстилки ингибитором Ca^{2+} -каналов семейства TRP рутениевым красным было обнаружено, что блокирование Ca^{2+} -каналов в обонятельном жгутике этим агентом вызывает их остановку [Бигдай Е.В., 2013]. Это означает, что Ca^{2+} входит в цитозоль через Ca^{2+} -каналы семейства TRP. Вместе с тем в движении вне действия стимула потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы не участвуют.

Показано [Бигдай Е.В., 2013], что под действием гадолиния, специфического блокатора механочувствительных Ca^{2+} каналов, обонятельные жгутики останавливаются. Следовательно, двигательная активность обонятельных жгутиков вне действия стимула осуществляется благодаря входу Ca^{2+} через механочувствительные Ca^{2+} -каналы семейства TRP [Бигдай Е.В. и др, 2013]. Можно предположить, что таким каналом может быть TRPC1, так как он открывается механическим стимулом при растяжении [Venkatachalam K. 2007]. Обонятельные жгутики совершают изгибательные движения. Поэтому в области изгиба плазмолемма подвергается натяжению, в результате чего, вероятно, открываются TRPC1-каналы для входа Ca^{2+} в цитозоль обонятельного жгутика.

Ионы Ca^{2+} в аксонеме обонятельного жгутика обеспечивают, вероятно, взаимодействие головок динеина с тубулином периферических дуплетных

микротрубочек, аналогично тому, как это происходит в актин-миозиновой системе подвижности респираторных ресничек [Самойлов В.О. и др., 2013].

Результаты нашего визуального анализа видеоизображений показали, что вне действия стимула обонятельные жгутики совершают кругообразные или воронкообразные движения. Данный характер траектории движения жгутиков отличается от траектории ресничек. У последних чётко различаются фазы эффективного удара и замаха, которых нет при движении обонятельных жгутиков [Самойлов В.О., 2010]. Можно предположить, что в основе таких движений обонятельных жгутиков лежат особенности их аксонемы. Известно, что в направлении к дистальному отделу аксонема обонятельного жгутика теряет периферические дуплеты, и на верхушке из 9 остаётся 2 [Satir P., 1996]. Наряду с периферическими дублетами исчезает и центральная пара микротрубочек [Lidow M.S., Menco B.P.M., 1984]. В настоящее время именно центральной паре отдают главную роль в механизмах маятникообразных изгибов ресничек и флагелл. В свою очередь, отсутствие аппарата центральной пары и радиальных спиц вызывает круговые, движения [Satir P., 1996].

В условиях отсутствия аппарата центральной пары с радиальными спицами характер двигательной активности определяется функционированием нексиновых связей, распределяющих нагрузку на соответствующие периферические дублеты [Satir P., 1996]. Анализ междублетного скольжения аксонем подвижных ресничек показал, что ориентация аппарата центральной пары контролирует область активного скольжения, которая осуществляется динеином. Поскольку аксонема прикреплена к базальному тельцу, то скольжение микротубулярных дублетов приводит к сгибанию, которое контролируются, в соответствии с гипотезой *geometric-clutch* [Lindemann C.B., 2010], междублетными связями и взаимодействиями радиальных спиц с центральной парой.

Вероятно, в отсутствие центральной пары в дистальном отделе аксонемы пропадает такой контроль, чем и обуславливается пассивное кругообразное движение дистальных кончиков жгутиков.

Доказано, что в некоторых ресничках и флагеллах центральная пара действительно вращается в ходе цикла биения [Mitchell D.R., 2004]. Однако результаты визуального анализа обнаружили, что такие воронкообразные и кругообразные движения обонятельных жгутиков, характеризующие их неупорядоченное движение вне действия стимула, сменяются кратковременными промежутками упорядоченного движения. Они проявляются в том, что обонятельные жгутики начинают двигаться в каком-либо направлении. Жгутик как будто «принюхивается» к окружающей среде. Затем быстро возвращается в исходное положение и снова на короткое время устремляется в другом направлении. Такой характер движения обонятельных жгутиков очень похож на формирование «пилотных» псевдоподий у мигрирующих клеток [Тюрин-Кузьмин П.А. и др., 2013]. Вероятно, это играет определённую роль в процессе обоняния, поскольку по мнению А.А. Бронштейна [1977], цилиарный аппарат обонятельных клеток является специализированной антенной, обеспечивающей активный поиск и обнаружение одорантов в слизи.

Некоторые аналогии можно провести между поведением обонятельных жгутиков и таких одноклеточных организмов, как амёбы, дрожжи и лейкоциты млекопитающих. Известно, что все живые клетки, как и обонятельные, могут воспринимать изменения химического состава своего окружения. Предложен термин “directional sensing” (“направленное чувство”), который относится к способности клетки определять направление и близость внеклеточного стимула [Parent C.A., 1999]. “Направленное чувство” необходимо для детекции аттрактантов, которые управляют, например, клеточной миграцией при хемотаксисе, а также, вероятно, при восприятии запахов ольфакторными рецепторными клетками.

«Направленное чувство» позволяет клетке последовательно измерять концентрацию аттрактанта в двух точках среды, и в зависимости от концентрационного градиента образовывать случайные пилотные филоподии или псевдоподии. Важно отметить, что при этом клетка не совершает направленного движения, и в ней не происходит реорганизации цитоскелета [Parent C.A., 1999].

Такое хаотическое рыскание очень похоже на спонтанные движения обонятельных жгутиков в отсутствии одорантов. Возможно, такой характер их двигательной активности обеспечивает рецепторной клетке “directional sensing” без пахучего стимула в среде, которые сопровождаются кратковременным упорядочением их движений.

4.1.2. Актин-миозиновая молекулярная система биологической подвижности обонятельных жгутиков

Мы предположили, что такое упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков обусловлено кратковременной реорганизацией актинового цитоскелета в дистальном отделе. Методом конфокальной имуннофлуоресцентной микроскопии [Бигдай Е.В., 2006] показано, что в отсутствие одорантов в дистальном отделе обонятельного жгутика содержатся небольшие «глыбки», которые по-видимому, соответствуют небольшим фрагментам молекул полимеризованного актина. Вероятно, кратковременная упорядоченность обусловлена полимеризацией актинового цитоскелета в обонятельном жгутике, поскольку известно, что кинетика сборки актиновых филаментов различна на разных этапах полимеризации. [Vavylonis D., 2005]. Начальная скорость полимеризации очень медленная, но после того как собираются вместе 3 или больше мономеров актина, образуя стабильное ядро, удлинение филамента является быстрой реакцией первого порядка.

Актиновые микрофиламенты обладают высоким динамизмом: вслед за полимеризацией происходит деполимеризация и наоборот [Theriot J.A., 1991].

Вероятно, деполимеризация образующихся актиновых микрофиламентов в обонятельном жгутике приводит к исчезновению кратковременной упорядоченности движений дистального отдела, вследствие чего исчезает направленное движение, возникающее вне действия пахучего стимула.

Наше предположение подтвердилось, когда мы обработали обонятельную выстилку цитохалазином. Оказалось, что при ингибировании полимеризации актина степень неупорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков увеличивалась. При этом снижалась частота жгутиковых колебаний, происходило расширение частотного спектра, а энтропия возрастала на $82\% \pm 7\%$, что является объективным доказательством увеличения степени неупорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков. Полученные данные означают, что кратковременное упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков вне действия стимула обусловлено кратковременной полимеризацией G-актина в дистальном отделе обонятельного жгутика. Однако несмотря на то, что эта полимеризация кратковременна, она может играть важную роль в процессе обонятельного восприятия

Известно, что неупорядоченная двигательная активность вне действия одорантов, с одной стороны обеспечивает состояние готовности и позволяет легко переходить к определённому динамическому режиму, соответствующему реакции на предъявляемый сигнал [Skarda, C.A. et al, 1987]. Рыскающие движения ОЖ, очевидно, повышают вероятность встречи рецепторов с одорантами при появлении их в среде.

С другой стороны, постоянное наличие даже незначительного пула полимеризованного F-актина способствует быстрому переходу из неупорядоченного движения в упорядоченное.

Вероятно актиновые филаменты обеспечивают упорядоченное движение в результате взаимодействия с аксонемальными микротрубочками показано, что в основе механизма взаимодействия микротрубочек с F-актином лежит

связывание формин образующих комплексов с другими клеточными факторами, динамичных «+»-концов микротрубочек с быстро полимеризующимися тупыми «-»-концами актиновых филаментов [Goode B.L. et al, 2007].

В аксонемах с микротрубочками взаимодействует немышечный миозин Va. Таким образом, этот мотор способен объединить 2 молекулярные системы подвижности: F-актин и микротрубочку. При этом миозин Va связывается с микротрубочками своим хвостовым доменом, который обладает высоким сродством к ним, и образует поперечные мостики между микротрубочками и F-актином. Следовательно, миозин Va может механически сопрягать микротрубочки с актиновыми филаментами [Сао Т.Т. et al., 2004], обеспечивая функциональное сотрудничество между актиновой и тубулиновой системой микрофиламентов.

В обонятельном жгутике также присутствует миозин VIIa [Wolfrum U., 1998]. Можно предположить, что в ОЖ существует сотрудничество этих миозинов. Однако, в отличие от аксонального транспорта по микротрубочкам, в ОЖ микротрубочки являются не переносимым грузом для миозина, а местом заякорения его хвостов, тогда как головки миозина VII перемещаются по F-актину, обеспечивая упорядоченное, направленное движение обонятельных жгутиков. Возможно, миозин VII активируется, когда происходит полимеризация F-актина, инициирующая связывание хвостов миозина с микротрубочками.

Таким образом, вне действия одоранта в двигательной активности обонятельных жгутиков участвуют 2 молекулярные системы подвижности: тубулин-динеиновая и актин-миозиновая. За счёт них обонятельные жгутики совершают два типа движений вне действия стимула: динеин-тубулиновая система, участвует в неупорядоченном движении, тогда как актин-миозиновая система – в кратковременном направленном упорядоченном движении вне стимула.

Вероятно, этим можно объяснить довольно сложную, в отличие от ресничек и флагелл, двигательную активность обонятельных жгутиков. Актин-миозиновая система вовлекается в кратковременное упорядочение двигательной активности жгутиков вне действия одорантов. При этом актин-миозиновое взаимодействие может создавать тонус, обеспечивающий поддержание определённого направления. Можно предположить, что актин-миозиновая и динеин-тубулиновая молекулярные системы подвижности действуют не изолированно друг от друга, а взаимодействуют между собой и влияют на активность друг друга. Такое взаимодействие двух систем увеличивает вероятность встречи обонятельных жгутиков с одорантом.

4.2. Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием одорантов

Анализ полученных результатов выявил, что под действием стимула характер двигательной активности обонятельных жгутиков кардинально меняется. Воздействия препаратов (амиловый спирт и т.д.), использованных в исследованиях, инициировали упорядоченное движение. При визуальном анализе видеоизображений мы наблюдали, что дистальный конец жгутика начинал активно вытягиваться, в направлении источника одоранта в градиенте его концентрации. Он застывал на длительное время в этом положении, затем возвращался в исходное состояние и снова вытягивался, и останавливался в том же направлении, повторяя такой характер движения на протяжении действия одоранта. Результаты, полученные в нашей работе, совпадают с результатами, полученными ранее [Бигдай Е.В, Руденко Я.Н., 2007]. Визуальный анализ был подтверждён в нашей работе при использовании объективных критериев: построении фигур наподобие фигур Лиссажу, вычислении изменений энтропии и частоты и проведении спектрального анализа.

Было показано [Бигдай Е.В., 2004], что упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков обусловлено полимеризацией актина в дистальном отделе жгутика, инициируемой одорантом. Эти данные были получены на фиксированных препаратах. Мы решили проверить их достоверность посредством прижизненной телевизионной микроскопии. Для этого мы инкубировали обонятельную выстилку в цитохалазине, а затем стимулировали одорантами. Оказалось, что на фоне цитохалазина обонятельные жгутики не реагировали на предъявляемые пахучие вещества, то есть их двигательная активность не упорядочивалась. Такое заключение было сделано по результатам визуального и математического анализов. На видеозаписях не наблюдалось упорядочения жгутиковых движений, инициируемых одорантами. Видеонаблюдения подтверждались объективными методами оценки: фигуры подобные фигурам Лиссажу не смещались в пространстве, энтропия возрастала на $15\% \pm 2\%$, а средняя частота на $35\% \pm 3\%$.

Направленные движения в градиенте концентрации аттрактанта представляет собой хемотаксис [Катанаев В.Л., 2001]. Он присущ мигрирующим клеткам, способным перемещаться в пространстве в градиенте концентрации хемоаттрактанта. Хемотаксис – это сложный процесс, связанный не просто со способностью клеток к миграции, а со способностью мигрировать в правильном направлении. Направление миграции определяется градиентами хемоаттрактантов. Ими являются различные сигнальные молекулы, находящиеся в среде. Они взаимодействуют со специфическими рецепторами, локализующимися на лидирующем крае клетки [Pollard T.D., 2003], инициируя реорганизацию цитоскелета в нем. При этом в области формирования псевдоподий происходит полимеризация мономерного актина, что, в конечном счёте, обеспечивает упорядоченную клеточную локомоцию [Theriot J.A., 1991].

Подобным образом ведут себя обонятельные жгутики в градиенте концентрации одорантов. Известно, что в дистальных отделах обонятельного

жгутика сосредоточены обонятельные рецепторы, специфически взаимодействующие с одорантами [Paulussen M. et al., 2009]. Так же, как и в локомоторных клетках, это взаимодействие инициирует полимеризацию актина, обуславливающую направленное движение обонятельных жгутиков в градиенте концентрации одоранта. Как и в амёбоидных клетках [Vavylonis D., 2005], в ОЖ пахучее вещество инициирует полимеризацию G-актина в области, самой близкой к сигналу, т.е. в дистальном отделе ОЖ. Причём реакция развивается очень быстро, подобно тому, как это происходит в локомоторных клетках, где стимул через 1 с инициирует направленное их движение [Тюрин-Кузьмин П.А. и др., 2013]. Следовательно, реакция обонятельных жгутиков является по существу хемотаксисом.

Визуальный анализ показал, что при упорядоченном движении обонятельный жгутик вытягивается в направлении стимула, то есть происходит увеличение его длины за счёт разгибания. Известно, что, например, в нейрональном конусе роста под действием нейтрофинов длина филоподий также увеличивается, при этом увеличение длины филоподий на 30% расширяет объем поиска конуса роста на 120%. Такое увеличение сенсорной способности конуса роста может способствовать обнаружению градиентов хемотаксиса [Gehler S. et al., 2004]. Вероятно, вытягивание обонятельных жгутиков, инициируемое одорантами, обеспечивает им повышенную вероятность встречи с пахучими молекулами, а, следовательно, может повышать чувствительность обонятельного анализатора.

В процессе хемотаксиса изменяется траектория движения обонятельных жгутиков, которая описывается фигурами, подобными фигурам Лиссажу. Изменяется как рисунок, так и площадь фигур, которые описывают кончик ОЖ в плоскости, перпендикулярной этому движению. Можно предположить, что траектория обонятельного жгутика опосредуется сигнальными путями, подобно тому, как это происходит в сперматозоидах [Kaup U.R. et.al, 2008].

Во время плавания по круговой траектории в градиенте концентрации молекулярные рецепторы сперматозоида взаимодействует с молекулами хемоаттрактанта, активируя каскад внутриклеточных посредников. Сигнальный путь преобразует химический стимул в периодическую модуляцию кривизны траектории. Здесь существует характерный фазовый сдвиг между периодической стимуляцией и периодической модуляцией кривизны траектории, которая зависит от движущих сил, а фаза сдвига определяет направление дрейфующих круговых траекторий [Kaup U.R. et.al, 2008].

Таким образом, анализ результатов показал, что в реакции ОЖ на различные одоранты есть много общего. Однако, несмотря на сходство реакции обонятельных жгутиков на различные одоранты, мы обнаружили и различия в этих реакциях на них. Под действием одорантов изменялась частота жгутиковых движений. Однако разные одоранты по-разному влияли на частотные характеристики обонятельных жгутиков.

4.2.1. Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием амилового спирта и ванилина

Так, под действием амилового спирта, имеющего прогорклый запах, и ванилина, обладающего цветочным ароматом, происходило сужение частотного спектра в сторону низких частот. Энтропия снижалась. Уменьшалась площадь, занимаемая движениями кончика жгутика на плоскости, перпендикулярной движению. При этом, как говорилось выше, площадь, в которой перемещался кончик жгутика, смещалась в градиенте концентрации амилового спирта или ванилина.

Следовательно, хемотаксис обонятельных жгутиков на прогорклый и цветочный запахи сходен, поэтому мы объединили эти два одоранта в одну группу. Следует отметить, что обонятельная трансдукция амилового спирта и ванилина осуществляется с участием разных внутриклеточных посредников.

Амиловый спирт вовлекает в этот процесс аденилатциклазную систему, а ванилин – фосфоинозитидную. Вместе с тем двигательная реакция на эти одоранты у них сходна. Можно предположить, что как аденилатциклазная, так и фосфоинозитидная системы внутриклеточных посредников вовлекаются в процесс реорганизации актинового цитоскелета в обонятельном жгутике.

Результаты наших исследований показали, что под действием амилового спирта и ванилина частота движения обонятельных жгутиков замедлялась на $28\pm 3\%$ и $70\pm 1\%$, соответственно. Одним из механизмов снижения частоты может стать чрезмерное повышение Ca^{2+} в цитозоле обонятельного жгутика. Подобные реакции наблюдаются в ресничках цилиарных клеток морского ежа, когда повышение концентрации Ca^{2+} в них с 10^{-9} моль до 10^{-6} - 10^{-5} моль снижало скорость скольжения микротрубочек на 20% [Travis S.M., 1988]. Полагают, что Ca^{2+} -индуцируемое уменьшение скорости скольжения микротрубочек осуществляется с участием центральной пары, если оно сопровождается повышением концентрации АТФ до 100 мМ.

В обонятельных жгутиках концентрация Ca^{2+} увеличивается в результате его входа в цитозоль через механочувствительные каналы семейства TRP в отсутствие одоранта и дополнительного входа, инициируемого действием амиловым спиртом и ванилином. Кроме того, показано [Самойлов В.О., и др., 2008], что одоранты стимулируют клеточное дыхание, в результате которого происходит дополнительный синтез АТФ по ротенон-резистентному пути посредством перехода на окисление сукцинатдегидрогеназы в митохондриях обонятельных клеток. Все эти причины могут, вероятно, обуславливать резкое повышение концентрации Ca^{2+} , что, в свою очередь, вызывает снижение частоты движения обонятельных жгутиков, наблюдаемое в наших опытах.

При повышении концентрации АТФ Ca^{2+} , вероятно, модифицирует регуляторный сигнал от центральной пары, который действует через радиальные спицы и контролирует активность динеиновых ручек [Ring S., 2010]. Можно предположить, что в снижении частоты жгутиковых движений

участвуют внутренние динеиновые ручки аксономы обонятельного жгутика, в регуляции которых участвует центральная пара и радиальные спицы как это показано при исследовании ресничек мерцательного эпителия [Ring S., 2010], что система в ресничках и флагеллах центральная пара – радиальные спицы вовлекается в регуляцию функционирования внутренних динеиновых ручек. При этом проекции центральной пары способны передавать локальный сигнал к радиальным спицам, которые изменяют активность этих динеиновых ручек [Ring S., 2010]. Посредниками в процессе передачи сигнала являются ионы Ca^{2+} .

Вероятно, замедление двигательной активности ОЖ под действием амилового спирта и ванилина происходит в результате переключения активности динеиновых ручек с быстрой на медленную, которое осуществляется протеинкиназой C, по аналогии с ресничками [M. Salathe, 1999].

4.2.2. Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием камфоры

Реакция обонятельных жгутиков на камфору при визуальном анализе отличалась от реакции на два предыдущих одоранта: обонятельный жгутик становился более подвижным. Двигательная активность обонятельного жгутика под влиянием камфоры имела интересные особенности: сначала жгутик вытягивался по направлению к источнику запаха, замирал в этом положении, а затем совершал резкий мах обратно, направляясь в противоположную от одоранта сторону, то есть против градиента концентрации камфоры. Таким образом, камфора инициировала упорядоченные движения обонятельных жгутиков в двух противоположных направлениях: по градиенту концентрации и против градиента концентрации. Такое поведение, возможно, связано с переключением активности динеиновых ручек с одной стороны аксономы на противоположную.

В соответствии с гипотезой точки переключения [Satir P., 1990], в определённый промежуток времени только половина дуплетов активна, и переключение чередуется между половинами. Таким образом, каждая сторона образует различную функциональную единицу, которая чередуется между двумя половинами аксонемы.

Следовательно, изменение направления движения на обратное под действием камфоры может обуславливаться таким переключением активности динеина на противоположную сторону аксонемы обонятельного жгутика. Показано [Bui et al., 2009, Piasecki B.P., 2008], что подобным образом ведёт себя флагелла хламидоманад при повышении концентрации Ca^{2+} . Можно предположить, что в процессе диффузии камфоры в обонятельной среде, окружающей препарат обонятельной выстилки, повышается концентрация этого одоранта вокруг обонятельного жгутика. В результате одорант взаимодействует с большим числом рецепторов в мембране обонятельного жгутика, приводя к повышению концентрации Ca^{2+} в его цитозоле. В таком случае в регуляцию активности специфических дуплетов включается система центральной пары и радиальных спиц. Полагают [Bui K.H. et al., 2009], что центральная пара передаёт сигналы к динеиновым ручкам через радиальные спицы, таким образом, регулируя активные дуплеты.

Интересно отметить, что при обратном биении в точке переключения развивается трансверсальная (поперечная) сила величиной около 0,5 нН/мкм [Bui K.H. et al., 2009], которая способствует отцеплению динеиновых головок на одной стороне и прикреплению динеиновых головок к микротрубочкам на противоположной стороне аксонемы.

Результаты наших опытов показали, что при построении траектории движения кончика обонятельного жгутика лягушки в плоскости, перпендикулярной направлению его движения (наподобие фигур Лиссажу) обонятельный жгутик смещался в пространстве. Оказалось, что под действием камфоры это движение занимало меньшую площадь, чем до стимуляции

одорантом. Показано, что площадь, занимаемая движением кончиком хвоста сперматозоида, зависит от того, плывёт он в направлении источника химического сигнала или от него. В градиенте хемоаттрактанта сперматозоид совершает широкие круговые изгибы, а в градиенте репеллента траектория его движений образует плотные петли при движении от источника сигнала. Вероятно, камфора, которую используют в качестве отпугивающего вещества для насекомых, является репеллентом, выполняет роль одоранта. Поэтому площадь, занимаемая кончиком обонятельного жгутика в градиенте концентрации камфоры, уменьшается, об этом же свидетельствует и отклонение жгутика в обратную сторону от источника запаха как показано в наших экспериментах. Таким образом полученные данные свидетельствуют об упорядочение двигательной активности обонятельных жгутиков, инициируемой камфорой.

Вместе с тем камфорный запах вызывал расширение частотного спектра и повышение энтропии, что противоречит сказанному выше. Но дело в том, что камфора, с одной стороны, является одорантом, а с другой, – веществом, вызывающим ощущение тепла. Это ее свойство используется в медицине как противоотёчное назальное средство и для подавления кашля, а также при аппликации на кожу в качестве отвлекающего и разогревающего средства [Беликов В.Г., 1979].

Как видно камфора обладает свойствами пахучего вещества и вещества с тепловым воздействием, можно предполагать, что оба этих эффекта камфора может оказывать на обонятельные клетки. Мишенью влияния камфоры могут быть каналы семейства TRP.

В настоящее время активно исследуются TRP-каналы. Общим свойством для них является то, что они способны реагировать на все основные классы внешних стимулов, включая свет, звук, химические, механические и термические раздражители. Каналы семейства TRP экспрессируются и функционируют как у низших, так и высших организмов, включая человека.

Одной из подгрупп этого семейства является TRPV-каналы. TRPV₁ – тип каналов активируется теплом (при нагревании до температуры 43⁰С и выше) и химическими веществами, обладающими тепловыми эффектами [Venfatachalam B., et al., 2007]. Активация теплом свойственна также и для TRPV₃-канала. Он реагирует на нагревание в области 30 - 33⁰ С. Оба этих канала проницаемы для ионов Ca²⁺ [Owsianik G., et al., 2006], а также для Na⁺ (на 1 Ca²⁺ приходится 10 Na⁺).

Показано [Xu H. et al, 2005], что камфора является агонистом для TRPV₁ (причём она как активирует, так и десенсибилизирует его), и TRPV₃. Кроме того, показано, что TRPV₁ - и TRPV₃ - каналы экспрессируются в сенсорных клетках и являются термо-TRP. Показано, что камфора вызывает ощущение тепла, совпадая с областью температурной активации TRPV₃.

Вместе с тем показано, что мутации гена TRPV, ост-2, вызывают дефект в реакциях на одоранты у *C. elegance*. Полагают, что TRPV у них вовлекается в обонятельную трансдукцию [Venkatachalam K. et al, 2007]. Можно предположить, что в мембране исследуемых нами обонятельных жгутиков экспрессируется TRPV₃- каналы, поскольку их температурная активность лежит в области более низких температур, чем у TRPV₁-каналы.

Надо отметить, что температурная активация TRPV₁-каналов зависит от концентрации камфоры и проявляется отчётливо при использовании 1-10 мМ камфоры, что на 2 порядка выше той, которую мы применяли в наших экспериментах в качестве одоранта. Однако, возможно, в обонятельном эпителии, в отличие от кератоцитов и НЕК-клеточных культур, порог для восприятия тепла под действием камфоры ниже.

Таким образом, можно предположить, что камфора взаимодействует с TRPV₃- каналами, в результате чего повышается концентрация ионов Ca²⁺ в цитозоле обонятельного жгутика. Такое предположение следует из экспериментов с определением концентрации Ca²⁺ в НЕК-клетках, экспрессирующих TRPV₁ и TRPV₃ –каналы. Под воздействием камфоры в них

повышается концентрация ионов Ca^{2+} [Venkatachalam K. et.al., 2007]. Вместе с тем показано, что камфора инициирует вход Ca^{2+} в обонятельные жгутики [Бигдай Е.В., 2004]. Вероятно, с этим связано повышение частоты колебаний обонятельных жгутиков под действием камфоры, наблюдаемое в наших опытах.

Показано [Ring S., 2010, Zindermann D., 2011], что частота биений ресничек и флагелл регулируются с участием наружных динеиновых ручек. Наружные динеиновые ручки являются механосенсором [Ring S., 2010]. Три тяжёлые цепи динеина этих ручек обладают регуляторными функциями. Основную роль в контроле функции наружных динеиновых ручек играют γ -тяжёлые цепи динеина.

Как уже говорилось выше, под действием камфоры энтропия повышается. Камфора обладает тепловым эффектом. Вероятно, этим обуславливается повышение энтропии при одновременном проявлении упорядочения двигательной активности обонятельных жгутиков, инициируемых одорантом.

4.2.3. Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием цинеола

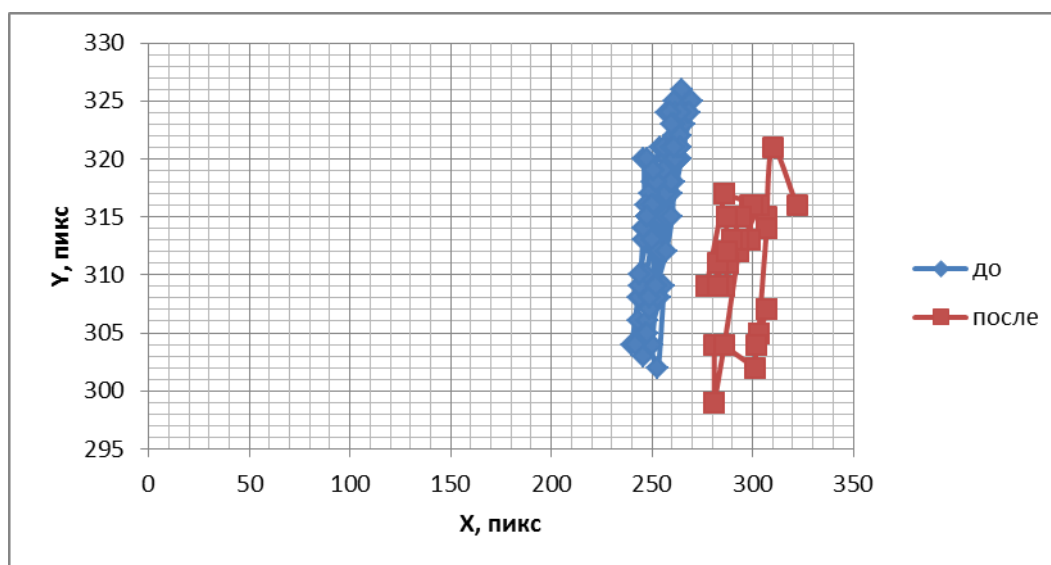


Рис. 41. Траектории, подобные фигурам Лиссажу, отображающие перемещения обонятельного жгутика лягушки до и после воздействия цинеолом

Другим пахучим веществом, относящимся, как и камфора, к терпеноидам, служил цинеол. Под действием цинеола при визуальном анализе обонятельный жгутик начинал двигаться более активно и в направлении одоранта. Это подтверждается построением траекторий наподобие фигур Лиссажу. Как видно (рис. 41), происходит смещение области движения кончика обонятельного жгутика в сторону источника запаха. При стимуляции обонятельного жгутика цинеолом энтропия снижалась. Полученные данные свидетельствуют об упорядочении двигательной активности обонятельных жгутиков под действием эвкалиптового запаха. Вместе с тем повышается средняя частота колебания обонятельных жгутиков и расширяется частотный спектр. Такое поведение обонятельного жгутика свидетельствует о неупорядоченности двигательной активности.

Как видно, реакция обонятельных жгутиков на цинеол сходна с их реакцией на камфору: одновременно проявляются процессы упорядоченности и неупорядоченности их двигательной активности. Такое сходство можно объяснить тем, что камфора и цинеол принадлежат к терпеноидам. Оба обладают как ольфакторными, так и температурными эффектами. Однако в отличие от камфоры, душистый эвкалипт вызывает ощущение холода, а не тепла.

Известно, что цинеол является агонистом TRPM8 [Venkatachalam K, 2007]. TRPM8 принадлежит также к TRP-каналам, чувствительным к температуре, но в области ниже 23 - 28⁰С. Полагают, что домены TRPM8, активируемые термическим и химическим стимулами различны. Поэтому TRPM8 может функционировать как хемо- так и терморецептор. TRPM8 чувствителен к цинеолу и проницаем для Ca²⁺. Активация его одорантом с эвкалиптовым запахом вызывает повышение ионов Ca²⁺ в цитоплазме, в

культурах клеток, экспрессирующих этот канал. Вместе с тем показано [Самойлов В.О. и др., 2004], что стимуляция цинеолом обонятельной клетки инициирует вход Ca^{2+} в обонятельный жгутик.

Полагают, что механизмы термальной активности TRPV3 и TRPM8 горячими и холодowymi температурами, соответственно, сходны. Активация их температурой, а также химическими веществами сдвигает их пороговый сдвиг мембранного потенциала [Venkatachalam K, 2007].

Такое сходство двигательной реакции обонятельных жгутиков на камфору и цинеол позволяет объединить их в одну группу, хотя по механизмам обонятельной трансдукции они принадлежат к различным группам: камфора воспринимается через фосфоинозитидную систему внутриклеточных посредников, а цинеол – через аденилатциклазную систему [Самойлов В.О. и др. 2004, Бигдай Е.В. и др. 2006].

Вместе с тем, в отличие от камфоры, в ответ на цинеол энтропия уменьшается как под действием амилового спирта и ванилина. Можно предположить, что это связано с противоположным камфоре воздействию эвкалиптового запаха: он вызывает ощущение прохлады, а не тепла.

Из сказанного выше видно, что даже в одной и той же группе на различные одоранты, действующие через разные сигнальные системы трансдукции ОЖ проявляют гетерогенные двигательные реакции.

4.2.4. Исследование двигательной активности обонятельных жгутиков под действием сероводорода

Сероводород относится к газотрансмиттерам (к газам, участвующим в обмене информации между клетками) [Nishida M., 2013]. Визуальный анализ двигательной активности обонятельных жгутиков, выявил, что под действием сероводорода обонятельный жгутик начинал двигаться более активно. Направленность его движений различить было трудно. При этом появлялись дрожащие и замирающие движения. Они сменялись восстановлением

двигательной активности обонятельных жгутиков, но жгутик начинал значительно медленнее двигаться, а движения имели судорожный характер. В этот момент жгутики вытягивались в струну и на долгое время (15 с) замирали в таком положении, подрагивая. При построении траекторий наподобие фигур Лиссажу выявило смещение области движения в сторону от запахов, средняя частота движений обонятельных жгутиков под действием газотрансмиттера возрастала, так же расширялся и частотный спектр, однако энтропия снижалась. Таким образом, как визуальный анализ, так и объективные критерии свидетельствуют об упорядоченности двигательной активности обонятельных жгутиков, инициируемой сероводородом. Вместе с тем изменения движений кончика обонятельного жгутика лягушки, вызванные сероводородом, отличаются от амилового спирта, ванилина и цинеола, поскольку направление его движения противоположно направлению действующего стимула.

Возможно, реакция обонятельных жгутиков на сероводород противоположна реакции жгутиков на другие одоранты связана с тем, что сероводород является ирритантом с запахом тухлых яиц в высоких концентрациях, и выполняет роль хемоаттрактанта в низких. Как известно, ирританты вызывают отрицательные эмоции и стремление живых организмов двигаться от источника аттрактанта. Сероводород, как газотрансмиттер, активирует TRPA₁ каналы [Takahashi N., et al., 2012] и TRPV₁ каналы и вызывает сенсibilизацию и активацию Ca²⁺ каналов L- и T- типа [Tang G., et al., 2010]. Это приводит к большому потоку внеклеточного Ca²⁺ в цитозоль обонятельного жгутика. Вероятно, с этим связана активация двигательной активности обонятельных жгутиков переходящая в замедление его движений, замирание и дрожание.

Известно также, что сероводород ингибирует клеточное дыхание, что вызывает дефицит АТФ и энергетическое голодание клетки [Руденко Я.Н., 2007]. В этих условиях происходит выход Ca²⁺ из митохондрий, вызывая

дополнительное увеличение содержания Ca^{2+} в цитозоле ОЖ. В результате на фоне избыточно высокой концентрации Ca^{2+} , поступившего в цитоплазму обонятельного жгутика, отсутствие АТФ приводит к тому, что динеин и миозин не могут отцепиться и провзаимодействовать с тубулином и актином соответственно. Следовательно, не происходит скольжения и сгибания ОЖ, что приводит к дрожанию, замиранию с последующей остановкой. При низких концентрациях сероводорода, используемых в наших экспериментах, двигательная реакция была обратимой, и после действия стимула движения ОЖ возобновлялись.

4.2.5. Двигательная активность обонятельных жгутиков под действием аммиака

Под действием аммиака жгутики начинали двигаться хаотично, разнонаправленно. При этом, если до стимуляции дистальная часть обонятельного жгутика двигалась пассивно за проксимальной частью, то на фоне одоранта жгутик по всей своей длине начинал змееподобно извиваться. Обонятельный жгутик двигался заметно чаще, и эта частота увеличивалась на протяжении действия стимула. Затем жгутик переставал колебаться, вытягивался и начинал дрожать. Смещения направления его движения в пространстве в градиенте концентрации аммиака визуальный анализ не выявил.

Построение траектории движения кончика обонятельного жгутика в плоскости, перпендикулярной направлению движения жгутика (наподобие фигур Лиссажу), без действия и при стимуляции обонятельной выстилки аммиаком выявило, что только небольшой участок траектории выходит далеко за пределы основной площади. При построении гармонических спектров отмечено, что в присутствии аммиака они смещаются в область более высоких частот, где они становятся значимыми, и появляются новые частоты с сужением частотного спектра. Средняя частота движения жгутиков

возрастала, а энтропия снижалась. Это означает, что под действием аммиака двигательная активность обонятельных жгутиков лягушки упорядочивается, то есть обонятельный жгутик проявляет хемотаксис в градиенте концентрации NH_3 .

Подобный хемотаксис под действием NH_3 возникает и у таких многоклеточных животных, как слизняки (для них аммиак является репиленом) [Kosugi T., et al, 1989] и нематоды *C. elegans* [Ward S., 1973]. Показано, что у нематод NH_3 воспринимается ольфакторными клетками, то есть NH_3 для них представляет собой ольфакторный аттрактант. Восприятие его ольфакторными клетками связано с активацией циклонуклеотидзависимых ионных каналов TAX-2/TAX-4, которые широко экспрессируются в сенсорных нейронах. Эти каналы открываются при повышении концентрации цГМФ, а в процессе трансдукции участвует G-белок.

Однако существует и другое представление о механизмах действия NH_3 . Аммиак является ирритантом, с едким (острым) запахом. Показано, что ирританты активируют TRPA1 каналы [Venkatachalam K. et al, 2007]. Помимо TRPA1 аммиак взаимодействует с TRPV1-каналами [Dhaka A. et al, 2009], причем оба широко экспрессируются в сенсорных нейронах.

Известно, что NH_3 свободно диффундирует через плазматическую мембрану и защелачивает цитозоль многих типов клеток, включая и обонятельные жгутики. Щелочная pH активирует TRPV1 и TRPA1 –каналы. Таким образом, аммиак при внутриклеточном защелачивании активирует TRPA1, модифицируя внутриклеточные аминокислотные остатки гистидина. Реакция на NH_3 сопровождается входом Ca^{2+} через эти каналы в мембране культивированных нейронов заднего корешкового ганглия [Dhaka et al, 2009]. В реакцию на аммиак вовлекаются внутриклеточные посредники фосфоинозитидной сигнальной системы [Venkatachalam K. et al, 2007].

Можно предположить, что в мембране жгутика обонятельная трансдукция осуществляется с участием гуанилатциклазной сигнальной

системы, а рецепторный потенциал генерируется благодаря открытию TAX-2/TAX-4 ионных каналов, тогда как восприятие ирритантных свойств происходит через TRPV1 и TRPA1 –каналы и фосфоинозитидную сигнальную систему.

В результате активации различных рецепторов, открытия Ca^{2+} каналов и тока Ca^{2+} в цитозоль ОЖ происходит полимеризация актина в дистальном отделе, что обеспечивается упорядочением двигательной активности обонятельных жгутиков, наблюдаемое в наших опытах. Вход Ca^{2+} в цитозоль обонятельного жгутика обуславливает повышение частоты жгутиковых биений.

Однако, как показывают данные наших экспериментов, повышение частоты колебаний обонятельных жгутиков сменяется дрожанием, и они не способны теперь совершать изгибательные движения, приняв жёсткую палочкообразную форму. Дрожание обонятельных жгутиков обуславливается, вероятно, неспособностью динеиновых ручек отсоединиться от тубулиновых дуплетов, чтобы совершить следующий шаг вдоль них. Причиной этого может быть недостаток АТФ.

Известно, что аммиак ингибирует в обонятельных жгутиках клеточное дыхание [Руденко Я.Н., 2007], что приводит к дефициту АТФ, и как следствие, к энергетическому голоданию обонятельной клетки. Вместе с тем Ca^{2+} выходит из митохондрий, пополняя пул цитозольного Ca^{2+} . Это, в свою очередь, приводит к соединению динеиновых ручек с тубулином, и к образованию новой более дистальной точки фиксации, аналогично тому, как это происходит у сперматозоидов [Brokaw C.J., 1979]. В результате движение дистальной части флагеллы убыстряется. Чем дистальнее располагается точка фиксации, тем быстрее движется кончик жгутика.

Таким образом, повышение частоты движения жгутиков под действием аммиака связано с активацией TRPV1 и TRPA1 каналов и током Ca^{2+} внутрь клетки, а переход в дрожание связан, вероятно, с энергетическим голоданием.

В итоге, реакции на аммиак сходны с реакцией ОЖ на сероводород. Таким образом аммиак и сероводород можно объединить в 3-ю группу одорантов.

Таким образом, визуальный анализ и используемые нами объективные критерии двигательной активности обонятельных жгутиков позволили установить, что она упорядочивается под действием прогорклого, цветочного, камфорного и эвкалиптового ароматов, а также при стимуляции обонятельной выстилки лягушек гнилостным и острым запахами. Результаты анализа выявили гетерогенность двигательной реакции обонятельных жгутиков в ответ на действие одорантов. Мы разделили реакции ОЖ на 3 группы в зависимости от действующих одорантов.

В первую группу вошли реакции на амиловый спирт и ванилин. В градиенте концентрации данных веществ движения обонятельных жгутиков сопровождались расширением спектра, снижением основной частоты и энтропии.

Во вторую группу попали реакции ОЖ на камфору и цинеол. В градиенте концентрации данных веществ движения обонятельных жгутиков сопровождались смещением траектории движения и возрастанием основной частоты со снижением энтропии.

В третью группу вошли реакции на сероводород и аммиак. В градиенте концентрации данных веществ движения обонятельных жгутиков сопровождались смещением области движения от одоранта и возрастанием основной частоты, которая сменялась дрожанием вплоть до остановки. Энтропия увеличивалась.

Фармакологический анализ двигательной активности ОЖ показал, что их актин-миозиновая система функционирует и в отсутствие одорантов, подобно «пилотным» псевдоподиям у мигрирующих клеток. Формирующиеся при этом актиновые нити не могут обеспечить подвижность жгутиков поскольку имеют небольшую длину, быстро образуются и распадаются.

Однако наличие небольшого пула F-актина (своеобразных «полуфабрикатов») создаёт предпосылки для очень быстрой сборки длинных актиновых нитей при появлении в среде одоранта.

Сложный процесс перестройки цитоскелета в ОЖ подобен хемотаксису у мигрирующих клеток. Можно полагать, что обонятельных клетки, не имея возможности мигрировать, непрерывно измеряют градиент концентрации пахучих веществ посредством движений своих жгутиков для которых характерны автоволновые процессы. По достижении пороговой величины концентрационного градиента неупорядоченные движения сменяются упорядоченными. Это приводит к повышению концентрационного градиента одоранта. С такими преобразованиями двигательной активности ОЖ и могут быть связаны различия между порогом обнаружения и порогом опознания запаха.

Разнообразные двигательные реакции обонятельных жгутиков на различные стимулы, в основе которых лежит сложная перестройка опорно-двигательного аппарата жгутика с разнообразной комбинацией его «цитокостей» и «цитомышц», сложной системой регуляции движения и подтверждают концепцию гетерогенности хемосенсорных систем, включая обоняние.

5. ВЫВОДЫ

1. По двигательной реакции обонятельных жгутиков на запахи исследованные одоранты можно разделить на 3 группы: 1) прогорклый и цветочный; 2) камфорный и эвкалиптовый; 3) едкий и гнилостный – что является одним из проявлений гетерогенности двигательной активности обонятельных жгутиков.

2. Основная роль тубулин-динеиновой системы подвижности заключается в обеспечении движений обонятельных жгутиков вне стимула.

3. В своей двигательной активности обонятельные жгутики в отсутствие стимула подобны «пилотным псевдоподиям» у мигрирующих клеток.

4. Упорядочение движений обонятельных жгутиков под действием одорантов обеспечивается актин-миозиновой молекулярной системой

5. Сложный гетерогенный процесс перестройки опорно-двигательных молекулярных аппаратов в обонятельных жгутиках при направленных движениях в градиенте концентрации пахучих веществ подобен хемотаксису.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АЦ – аденилатциклаза

АЦ III – аденилатциклаза III

ОЖ – обонятельный жгутик

ОЭ – обонятельный эпителий

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанинмонофосфат

АС – аденилатциклаза

Arp – actin-related protein (актинсвязывающий белок)

IP₃ – инозитолтрифосфат

TRP-каналы – transition receptor potential channel (транзиторные потенциалзависимые рецепторные каналы)

ЭДТА – этилен-диаминтетрауксусной кислоты

CNG каналы

пН

кДа

М

мкМ

ARP

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Приказ министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»
2. АТФ в обонятельном органе лягушки / О.С. Гладышева [и др.] // Цитология. – 1984. – Т. 26. – № 7. — С. 788–793.
3. Бекусова В.В. Двигательная активность обонятельных жгутиков земноводных и млекопитающих / В.В. Бекусова // Диссерт. на соиск. уч. степ. кон. биол. наук – СПб. – 2010. –164 с.
4. Беликов В.Г. Учебное пособие по фармацевтической химии. / В.Г. Беликов – М.: Медицина, 1979. – 242 с.
5. Бигдай Е.В. Гетерогенность молекулярных механизмов обонятельной рецепции / Е.В. Бигдай // Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. – 2004 б. – Т. 90. – № 6. – С. 790–800.
6. Бигдай Е.В. Гетерогенность обонятельной рецепции / Е.В. Бигдай // Диссерт. на соиск. уч. степ. докт. биол. наук – СПб. – 2004 а. –264 с.
7. Бигдай Е.В. Влияние одорантов на цитоскелет ресничек обонятельных клеток. / Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов, В.В. Бекусова // Морфология. – 2006. – Т. 129, N. 2. – С. 21.
8. Бигдай Е.В. Прижизненная микроскопия в исследовании двигательной активности обонятельных жгутиков / Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов // Науч.-тех. ведомости СПбГПУ. – 2007. – № 50. – С. 81–90.
9. Бигдай Е.В., Объективные критерии оценки перехода неупорядоченной двигательной активности обонятельных жгутиков в упорядоченную. / Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов, В.В. Бекусова, Э.В. Крыжановский, Б.А. Дудич, С.А. Панов // Биофизика. – 2010. – том 55, вып. 5. – с. 886-891.

10. Бигдай Е.В. Биофизика цитоскелета и биофизические механизмы немышечной подвижности. / Е.В. Бигдай. – СПб. ; Изд-во Политехнического ун-та, 2011. – 151 с.
11. Бигдай Е.В., Музыка обонятельных жгутиков. / Е.В. Бигдай, В.О. Самойлов // Сборник научных трудов «Нейробиотеком-2012». – СПб. – 2012. – с. 164-169.
12. Большая советская энциклопедия: В 30 т. - М.: "Советская энциклопедия" – 1969-1978.
13. Бронштейн А.А. Обонятельные рецепторы позвоночных. / А.А. Бронштейн. – Л.; Наука, 1977. – 160 с.
14. Бронштейн А.А., В. Г. О содержании натрия и калия в слизи обонятельной выстилки позвоночных / А.А. Бронштейн, В.Г. Леонтьев // Журн. Эвол. Биохим. Физиол. – 1972. – Т. 8. – С. 580–585.
15. Винников Я.А. Структурная и цитохимическая организация рецепторных клеток органов чувств в свете эволюции их функции / Я.А. Винников // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1965. – Т.1. – № 1. – С. 67.
16. Винников Я.А. Цитологические и молекулярные основы рецепции. Л.: Наука, 1971. – 372с.
17. Гладышева О.С. Особенности состава и формирования обонятельной слизи / Д.М. Кукушкина, Г.И. Мартынова, В.П. Сафронов // Химические сигналы животных. М.: Наука, 1982. – С. 178 – 197.
18. Гулимова В.И. "Пять носов" человека и 2500-летняя история их изучения // Ароматы и запахи в культуре: [Сборник. В 2-х кн.] / Сост. О. Б. Вайнштейн. – М.: Новое литературное обозрение, 2003. – № 1. – С. 122–169
19. Дудич Б.А. Объективные критерии двигательной активности обонятельных жгутиков. / Б.А. Дудич // Сборник научных трудов «Нейробиотеком-2012». – СПб. – 2012. – с. 114-115.

20. Каркищенко Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева – М.: Профиль – 2С, 2010. – 358 с.
21. Катанаев В.Л. Внутриклеточная передача сигнала при хемотаксисе нейтрофилов / В.Л. Катанаев // Биохимия. – 2001. – Т. 66., вып. 4. – С. 437-456.
22. Молекулярные механизмы выбора направления движения мезинхимальными клетками. / П. А. Тюрин-Кузьмин, А. В. Воротников, В. А. Ткачук // Рос. физиол. журнал. – 2013. – том 99, № 3. – С. 294-312
23. Ноздрачев А.Д., Анатомия крысы / А.Д. Ноздрачев, Е.Л. Поляков // СПб.: Лань, 2001. – 463 с.
24. Овчинников Ю.М. Нарушения обоняния / Ю.М. Овчинников, С.В. Морозова, Ф.В. Минор – М.: ММА им. И.М. Сеченова, 1999. – 156 с.
25. Поглазов Б.Ф. Миозин и биологическая подвижность. / Б.Ф. Поглазов, Д.И. Левицкий // М., 1982. – 248 с.
26. Руденко Я.Н. Кинетика метаболической активности обонятельной выстилки травяной лягушки (*Rana temporaria*) под действием одорантов // Диссерт. на соиск. уч. степ. канд. медиц. наук. СПб. – 2007. – 136 с.
27. Самойлов В.О. Гетерогенность хемосенсорных систем / В.О. Самойлов. – Л.: Наука, 1983. – 224 с.
28. Самойлов В.О. Две молекулярные системы подвижности обонятельных жгутиков лягушки. / В.О. Самойлов, Е.В. Бигдай, Я.Н. Руденко, В.В. Бекусова, Б.А. Дудич // Биофизика. – 2008. — том 53, вып. 6. – с. 123-127
29. Самойлов В.О. Молекулярные машины опорно-двигательных аппаратов респираторных ресничек и обонятельных жгутиков. / В.О. Самойлов, Е.В. Бигдай, Э.В. Крыжановский, Б.А. Дудич, С.А. Панов, Д.Д. Смирнов, А.С. Нестеров // Биофизика. – 2013. – Т.58, вып.2. – С.269-275.
30. Терентьев П.В. Лягушка / П.В. Терентьев. – М.: Сов. наука, 1950. – 345 с.

31. Терентьев П.В., Дубинин В.Б., Новиков К.А. Кролик / П.В. Терентьев, В.Б. Дубинин, А.К. Новиков. – М.: Наука, 1952. – 364 с.
32. Anholt R. A partially purified preparation. of isolated chemosensory cilia from- the olfactory epithelium of the bullfrog, *Rana catesbeiana*/ R. Anholt, U. Aebi, S. Snyder // J. Neurosci. – 1986. – Vol. 6. – P. 1962-1969.
33. Anholt R.R. Molecular neurobiology of olfaction / R.R. Anholt // Crit. Rev. Neurobiol. – 1993. – Vol. 7, N. 1. – P. 1-22.
34. Asymmetry of inner dynein arms and inter-doublet links in *Chlamydomonas* flagella / K.H. Bui, H. Sakakibara, T. Movassagh, K. Oiwa, T. Ishikawa // J. Cell Biol. – 2009. – Vol. 186, N. 3. – P. 437-446.
35. Bhattacharyya B. Promotion of fluorescence upon binding of colchicine to tubulin / B. Bhattacharyya, J. Wolff // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. –1974. – Vol. 71, N. 7. – P. 2627-2631.
36. Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone filopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor/cofilin / S. Gehler, A.E. Shaw, P.D. Sarmiere, J.R. Bamberg, P.C. Letourneau // J. Neurosci. – 2004. – Vol. 24, N. 47. – P. 10741-10749.
37. Breipohl W. Freeze-etching studies on the ciliary necklace in the rat and chick. / W. Breipohl, A.S. Mendoza, F. Miragall // J Anat. – 1980. – Vol. 4. – P. 801-804.
38. Brokaw C.J. Calcium-induced asymmetrical beating of Triton-demembranated sea urchin sperm flagella. / C.J. Brokaw // J Cell Biol. – 1979. – Vol. 82. – P.401–411.
39. Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella / H. Bannai, M. Yoshimura, K. Takanashi [et al.] // J. of cell science. – 2000. – Vol. 113 – P. 831–839
40. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. / H.

Xu, N.T. Blair, D.E. Clapham. // J. Neurosci. – 2005. – Vol. 25, N. 39. – P. 8924-8937.

41. Common dynamical features of sensory adaptation in photoreceptors and olfactory sensory neurons / G. De Palo, G. Facchetti, M. Mazzolini, A. Menini, V. Torre, C. Altafini // Sci. Rep. – 2013. – Vol. 3. – P. 1251.

42. Dutcher S.K. Flagellar assembly in two hundred and fifty easy-to-follow steps. / S.K. Dutcher // Trends Genet. – 1995. – Vol. 11, N. 10. – P. 398-404.

43. Devanand D.P. Olfactory deficits in mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease on follow-up / D.P. Devanand [et al.] // American Journal of Psychiatry. – 2000. – Vol. 157. – P. 1399-1405

44. Everaerts W. Where is TRPV1 expressed in the bladder, do we see the real channel? / W. Everaerts, M.R. Sepulveda, T. Gevaert, T. Roskams, B. Nilius, D. De Ridder // Naunyn. Schmiedebergs Arch Pharmacol. – 2009. – Vol. 379. – P. 421–425.

45. Expression of odorant receptors in spatially restricted subsets of chemosensory neurones. / J. Strotmann, I. Wanner, J. Krieger, K. Raming, H. Breer. // Neuroreport. – 1992. – Vol. 3, N. 12. – P. 1053-1056.

46. Expression of mRNAs encoding for two different olfactory receptors in a subset of olfactory receptor neurons. / N.E. Rawson, J. Eberwine, R. Dotson, J. Jackson, [et al.] // J. Neurochem. – 2000. – Vol. 75, N. 1. – P. 185-195.

47. Farnum C.E. Axonemal Positioning and Orientation in 3-D Space for Primary Cilia: What is Known, What is Assumed, and What Needs Clarification / C.E. Farnum, N.J. Wilsman // Dev. Dyn. – 2011. – Vol. 240, N. 11. – P. 2405–2431.

48. Firestein S. Single Odor-sensitive channels in olfactory receptor neurons are also gated by cyclic nucleotides. / S. Firestein, F. Zufall, G.B. Shepherd. // Neuroscience. – 1991. – Vol. 77, N. 11. – P. 3565-3572.

49. Frings S. Current recording from sensory cilia of olfactory receptor cells in situ. II. Role of mucosal Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ ions / S. Frings, S. Benz, B. Lindemann // J. Gen. Physiol. – 1991. – Vol. 97, N. 4. – P. 725-747.

50. Goode B.L. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly / B.L. Goode, M.J. Eck // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – Vol. 76. – P. 593-627.
51. Goodman M.B. Sensation is painless. / M.B. Goodman. // *Trends Neurosci.* – 2003. – Vol. 26, N. 12. – P. 643-645.
52. Greek Theories of Elementary Cognition from Alcmaeon to Aristotle / J. Beare. – Oxford, U.K.: Clarendon Press, 1906. – P. 134.
53. In vivo determination of mouse olfactory mucus cation concentrations in normal and inflammatory states / S. Selvaraj, K. Liu, A.M. Robinson [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. 7–14.
54. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain / R.B. Ravelli, B. Gigant, P.A. Curmi [et al.] // *Nature.* – 2004. – Vol. 428, N. 6979. – P. 198-202.
55. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. / G. Tang, L. Wu, R. Wang. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2010. – Vol. 37, N. 7. – P. 753-763.
56. Jenkins P.M. Olfactory cilia: linking sensory cilia function and human disease. / P.M. Jenkins, D.P. McEwen, J.R. Martens. // *Chem. Senses.* – 2009. – Vol. 34, N. 5. – P. 451-464.
57. Holwill M.E. A physical model of microtubule sliding in ciliary axonemes / M.E. Holwill, P. Satir // *Biophys. J.* – 1990. – Vol. 58, N.4. – P. 905-917.
58. Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments / G. Karp // Hoboken, NJ: John Wiley and Sons. – 2005. – P. 346–358.
59. Katzung, B.G. Basic and Clinical Pharmacology / B.G. Katzung, Ed. // Apleton and Lange: Norwalk. – 1995. – P. 536-559.
60. Keller A. Human olfactory psychophysics / A. Keller, L. B. Vosshall // *Curr Biol.* – 2004. – Vol. 14, N. 20. – P. 875–878

61. Kerjaschki D. The central tubuli in distal segments of olfactory cilia lack dynein arms / D. Kerjaschki // *Experientia*. – 1976. – Vol. 32, N. 11. – P. 1459-1460.
62. Kosugi T. Negative chemotaxis to ammonia and other weak bases by migrating slugs of the cellular slime moulds. / T. Kosugi. // *Microbiology*. – 1989. – Vol. 135, N. 6. – P. 1589-1598.
63. Lidow M.S. Observations on axonemes and membranes of olfactory and respiratory cilia in frogs and rats using tannic acid-supplemented fixation and photographic rotation / M.S. Lidow, B.P. Menco // *J. Ultrastruct. Res.* – 1984. – Vol. 86, N.1. – P. 18–30.
64. Lindemann C.B. A model for flagellar motility / C.B. Lindemann, K.S. Kanous // *Int. Rev. Cytol.* – 1997. – Vol. 173. – P. 1-72.
65. Lindemann C.B. Structural-functional relationships of the dynein, spokes, and central-pair projections predicted from an analysis of the forces acting within a flagellum / C.B. Lindemann // *Biophys. J.* – 2003. Vol. 84, N. 6. – P. 4115-4126.
66. Lindemann C.B. Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible / C.B. Lindemann, K.A. Lesich // *J. Cell Science*. – 2010. – Vol. 123. – P. 519 -528.
67. Maier, U.H. Colchicine is formed by para para phenol-coupling from autumnaline / U.H. Maier, H.Z. Meinhart // *Tetrahedron Lett.* – 1997. – Vol. 38. – P. 7357-7360.
68. Mair R.G. Changes in morphology and physiology of olfactory receptor cilia during development. / R.G. Mair, R.C. Gesteland, D.L. Blank // *Neuroscience*. – 1982. – Vol. 7, N. 12. – P. 3091-3103.
69. Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. / O.I. Wagner, J. Lifshitz, P.A. Janmey, M. Linden, [et al.] // *J. Neurosci.* – 2003. – Vol. 23, N. 27. – P. 9046-9058.

70. Mitchell D.R. Speculations on the evolution of 9+2 organelles and the role of central pair microtubules. / D.R. Mitchell // *Biol. Cell.* – 2004. – Vol. 96, N. 9. – P. 691-696.
71. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis / G. Hajnóczky, G. Csordás, S. Das [et al.] // *J. cell calcium.* – 2006 – Vol. 40, N. 5-6. – P. 553–560.
72. Menini A. Olfaction: from odorant molecules to the olfactory cortex / A. Menini, L. Lagostena, A. Boccaccio // *News Physiol. Sci.* – 2004. – Vol. 19. – P. 101-104.
73. Moran D.T. The structure and function of sensory cilia. / D.T. Moran, J.C. Rowley // *J. Submicrosc. Cytol.* – 1983. – Vol. 15. – P. 157 - 162.
74. Model of calcium oscillations due to negative feedback in olfactory cilia / J. Reidl , P. Borowski, A. Sensse, J. Starke, [et al.] // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90, N. 4. – P. 1147-1155.
75. Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli / U. Wolfrum, X. Lui, A. Schmitt [et al.] // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 1998. – Vol. 40, N. 3. – P. 261–271.
76. Myosin-Va binds to and mechanochemically couples microtubules to actin filaments / T.T. Cao, W. Chang, S.E. Masters, M.S. Mooseker // *Mol. Biol. Cell.* – 2004. – Vol. 15, N. 1. – P. 151-161.
77. Nishida M. Regulation of redox homeostasis by hydrogen sulfide anion and its clinical application / M.Nishida, T. Sawa // *Seikagaku.* – 2013 – Vol.85, N. 11. – P. 996-999.
78. Olfactory epithelia exhibit progressive functional and morphological defects in CF mice. / B.R. Grubb, T.D. Rogers, H.M. Kulaga, K.A. Burns, [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, N. 2. – P. 574-583.
79. Parent C.A. A cell's sense of direction / C.A. Parent, P.N. Devreotes // *Science.* – 1999. – Vol. 284, N. 5415. – P. 765-770.

80. Pollard T.D. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments / T.D. Pollard, G.G. Borisy // *Cell*. – 2003. – Vol. 112, N. 4. – P. 453-465.
81. Reese T.S. Olfactory cilia in the frog / T.S. Reese // *J. Cell Biol.* – 1965. – Vol. 25, N.2. – P. 209–230
82. Radial spoke proteins of *Chlamydomonas* flagella. / P. Yang, D.R. Diener, C. Yang, T. Kohno [et al.] // *J. Cell. Sci.* – 2006. – Vol. 119, N. 6. – P. 1165-1174.
83. Ring S. Sensing the Mechanical State of the Axoneme and Integration of Ca Signaling by Outer Arm Dynein / S. Ring // *Cytoskeleton (Hoboken)*. – 2010. – Vol. 67, N. 4. – P. 207–213.
84. Risinger A. L. Microtubule Dynamics as a Target in Oncology / A. L. Risinger // *Cancer Treat Rev.* – 2009. – Vol. 35, N. 3. – P. 255–261.
85. Rhein L.D. Biochemical studies of olfaction: isolation, characterization, and odorant binding activity of cilia from rainbow trout olfactory rosettes. / L.D. Rhein, R.H. Cagan // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1980. – Vol. 77, N. 8. – P. 4412-4416.
86. Ross R.A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors / R. A. Ross // *Br. J. Pharmacol.* – 2003 – Vol. 140, N. 5 – P. 790–801.
87. Salathe M. Mode of Ca²⁺ action on ciliary beat frequency in single ovine airway epithelial cells / M. Salathe, R.J. Bookman // *J. Physiol.* – 1999. – Vol.520, N. 3. – P. 851-865.
88. Salathe M. Regulation of mammalian ciliary beating / M. Salathe // *Annu Rev Physiol.* – 2007. – Vol. 69. – P. 401–422
89. Satir P. Microtubule-based cell motility: the role of microtubules in cell motility and differentiation / P. Satir, J.S. Goltz, A.W.Wolkoff // *Cancer Invest.* – 1990. – Vol. 8, N. 6. – P. 685-690.
90. Satir P., Christensen S.T. Overview of structure and function of mammalian cilia // *Annu. Rev. Physiol.* 2007. Vol. 69. P. 377 - 400.

91. Schwob J. E. Neural Regeneration and the Peripheral Olfactory System / J. E. Schwob // The Anatomical Record – 2002. – Vol. 269, N. 1. – P. 33–49.
92. Shannon C.E. A Mathematical Theory of Communication//The Bell System Technical Journal, vol. 27, 1948.
93. Silflow C.D. Assembly and Motility of Eukaryotic Cilia and Flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii* / C. D. Silflow, P. A. Lefebvre // Plant Physiol. 2001 127(4): 1500–1507.
94. Skarda, C.A. How brains make chaos in order to make sense of the world / C.A. Skarda, W.J. Freeman // Behavioral and Brain Sciences. – 1987. – Vol. 10. – P. 161-195.
95. Story G.M. Feel the Burn / G.M. Story, L. Crus-Orengo // American Scientist. – 2008 – Vol. 95, N.4. – P. 326–333.
96. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. / G. Owsianik, D. D'hoedt, T. Voets, B. Nilius. // Rev. Physiol Biochem. Pharmacol. – 2006 – Vol. 156. – P. 61-90.
97. Thermo-TRP Channels: Biophysics of Polymodal Receptors / D. Baez-Nieto, J.P. Castillo, C. Dragicevic, O. Alvarez, R. Latorre // Transient Receptor Potential Channels / Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2011. – Vol. 704. – P. 469–490.
98. Thymosin beta 4 mRNA and peptide expression in phagocytic cells of different mouse tissues / M. Paulussen, B. Landuyt, L. Schoofs, [et al.] // Peptides. – 2009. – Vol. 10. – P. 1822-1832.
99. The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil / W. Everaerts, M. Gees, Y.A. Alpizar [et al.] // Curr. Biol. – 2011 – Vol. 21, N. 4. – P. 316–321
100. The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons / J. Reisert, P.J. Bauer, K-W. Yau, S. Frings // J. Gen. Physiol. – 2003. – Vol. 122. – P. 349–363.

101. The Neurobiology of Olfaction / A. Menini [editor]. – CRC Press, 2010. – P.128–132.
102. The Uni2 phosphoprotein is a cell cycle regulated component of the basal body maturation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* / B.P. Piasecki, M. LaVoie, L.W. Tam, P.A. Lefebvre, C.D. Silflow // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – Vol. 19, N. 1. – P. 262-273.
103. Theriot J. A., Actin microfilament dynamics in locomoting cells / J. A. Theriot, T.J. Mitchison // *J. nature.* – 1991. – Vol. 352, N. 6331. – P. 126–131.
104. Travis S.M. Regulation of axonemal Mg^{2+} -ATPase from *Paramecium* cilia: effects of Ca^{2+} and cyclic nucleotides / S.M. Travis, D.L. Nelson // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 966, N. 1. – P. 84-93.
105. Transient Receptor Potential Channels / M.S. Islam [editor] // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2011. – 704 p.
106. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. / N. Takahashi, D. Kozai, Y. Mori // *Front. Physiol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 324.
107. TRPV1 senses both acidic and basic pH. / A. Dhaka, V. Uzzell, A. Dubin, J. Mathur, M. Petrus, [et al.] // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29, N. 1. – P. 153–158.
108. Ultrastructural localization of olfactory transduction components : the G-protein subunit Golf and type III adenylyl cyclase / B.P.M. Menco, R.C. Bruch, B. Dau, W. Danno // *Neuron.* – 1992. – Vol. 8. – P. 441–453.
109. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor / W. Liedtke, Y. Choe, M. A. Marti-Renom [et al.] // *J. cell.* – 2000. – Vol. 103, N.3. – P. 525–535.
110. Vavylonis D. Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations / D. Vavylonis, Q. Yang , B. O'Shaughnessy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2005. – Vol. 102. – P. 24.
111. Venkatachalam K. TRP channels / K. Venkatachalam, C. Montell // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – Vol. 76. – P. 387-417.

112. Voet, D. Biochemistry / D. Voet, J.G. Voet // John Wiley and Sons, New York. – 1990. – P. 1223.

113. Ward S. Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. /S. Ward. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1973. – Vol. 70, N. 3. – P. 817-821.

114. Zhang C. Gap junctions in olfactory neurons modulate olfactory sensitivity / C. Zhang // BMC Neurosci. – 2010. – Vol. 11. – P. 108.

115. Zhang C. Mature olfactory receptor neurons express connexin 43 / C. Zhang, T.E. Finger, D. Restrepo // J. Comp. Neurol. – 2000. – Vol. 9, N. 426. – P. 1-12.