

На правах рукописи

ОГНЕВА Ирина Владимировна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ
ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЖГУТИКОВ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

03.00.02 – Биофизика
05.13.18 – Математическое моделирование, численные методы
и комплексы программ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2005

Актуальность проблемы

В обонятельных жгутиках сосредоточена сложная молекулярная система рецепции запахов. В их плазматической мембране локализованы рецепторные белки, с которыми связаны сигнальные системы обонятельных клеток, осуществляющие трансдукцию химического стимула в электрический сигнал. В современной мировой науке исследование молекулярных механизмов взаимодействия одорантов с рецепторами рассматривается как одна из актуальнейших проблем. Жгутики обладают подвижностью, которую обеспечивают как тубулин-динеиновая, так и актин-миозиновая системы. Однако роль двигательной активности обонятельных жгутиков в рецепции одорантов изучена недостаточно полно. Имеются лишь отдельные разрозненные наблюдения (А.А. Бронштейн, 1977), позволившие предположить, что характер движения жгутиков изменяется под действием одорантов. Сложные траектории и асинхронность колебаний затрудняют визуальные наблюдения за подвижностью в отсутствие и присутствии пахучих веществ и трактовку этих наблюдений. Усложняет проблему то, что жгутики данной обонятельной клетки под действием большинства одорантов реагируют только на один из них. При известной трудности количественной оценки параметров движения жгутиков посредством прижизненной световой микроскопии построение математической модели может внести существенный вклад в разрешение проблемы двигательной активности обонятельных жгутиков.

Представленные в современной литературе математические модели подвижности других типов жгутиков и ресничек – цилий и флагелл – не могут быть применены для описания двигательной активности обонятельных жгутиков ввиду принципиальных различий в характере их движений. При построении математической модели обонятельного жгутика следует учесть молекулярные механизмы его подвижности, которые обуславливают столь сложную траекторию движения.

Помимо выявления особенностей двигательной активности обонятельных жгутиков, необходимо также знать источник энергии, обеспечивающий эту подвижность в отсутствие и присутствии одорантов в окружающей среде.

Цель настоящего исследования: построить математическую модель движения обонятельных жгутиков и провести экспериментальный анализ их подвижности и ее энергообеспечения.

Задачи исследования

1. Построить математическую модель движения жгутиков обонятельных клеток.
2. Исследовать влияние одорантов на характер двигательной активности обонятельных жгутиков.
3. Изучить механизм энергообеспечения подвижности обонятельных жгутиков в отсутствие и присутствии одорантов.
4. В ходе анализа экспериментальных данных проверить адекватность построенной математической модели.

Положения, выносимые на защиту

1. Построена динамическая модель двигательной активности обонятельных жгутиков, адекватно отражающая биофизические процессы, лежащие в основе подвижности жгутиков.
2. Все изученные в работе одоранты, кроме β -меркаптоэтанола, подавляющего двигательную активность жгутиков, инициируют изменение характера их движений от неупорядоченного к упорядоченному.
3. Изменение характера движений жгутиков под действием одорантов (кроме β -меркаптоэтанола) сопровождается синтезом дополнительного пула АТФ.

Научная новизна исследования

1. Предложена математическая модель движения обонятельных жгутиков как деформируемого стрессора с заданными дополнительными несовместными деформациями в качестве воздействия.
2. Установлено, что при действии камфары, амилового спирта, этилового спирта, кедрового бальзама, ванилина, цинеола, амилацетата изменяется характер двигательной активности отдельных обонятельных жгутиков: неупорядоченные движения сменяются упорядоченными с преимущественной ориентацией навстречу потоку одоранта. Водный раствор аммиака активизирует неспецифическим образом подвижность обонятельных жгутиков, а β -меркаптоэтанол ее подавляет.
3. Показано, что действие одорантов, стимулирующих движения жгутиков, включает механизм энергообеспечения подвижности обонятельных жгутиков, связанный с синтезом АТФ вне дыхательной цепи митохондрий и гликолиза.

Научная и практическая значимость исследования

1. Построенная математическая модель и разработанный алгоритм ее реализации могут быть использованы для моделирования двигательной

активности других жгутиковых структур в биологических системах. Это дает возможность более глубокого анализа механизмов биологической подвижности.

2. Предложенная модель позволяет прогнозировать количественные характеристики реакции обонятельных жгутиков на действие различных одорантов. Это может быть полезным в медицине и парфюмерии при анализе и прогнозировании восприятия тех или иных ароматов.
3. Выявленные механизмы энергообеспечения двигательной активности жгутиков обонятельных клеток могут быть использованы при разработке методов (в том числе фармацевтических) коррекции нарушений в восприятии запахов.

Апробация работы

Основные материалы диссертационной работы были представлены на VI и VII Всероссийских конференциях «Фундаментальные Исследования в Технических Университетах» (Санкт-Петербург, 2002, 2003), школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2003), 3-й научно-практической конференции и школе семинаре «Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий» (Санкт-Петербург, 2003), IV Международной школе-семинаре «БИКАМП» (Санкт-Петербург, 2003), IV Международной конференции «Компьютерное моделирование 2003» (Санкт-Петербург, 2003), 1-м съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003), межвузовской научной конференции «XXXII Неделя науки СПбГПУ» (Санкт-Петербург, 2004).

Публикации: по теме диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 130 страницах машинописного текста; состоит из введения, пяти глав, обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы. Работа содержит 18 таблиц, 29 рисунков. Список литературы включает 80 наименований.

Объект, материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на жгутиках обонятельной выстилки травяной лягушки *Rana temporaria*. Животным разрушали головной и спинной мозг. Затем отделяли дорсальную поверхность головы посредством хирургических ножниц и удаляли с нее кожу, промывая поверхность раствором Рингера. На следующем этапе из полученной носовой части вырезали обонятельные бугорки и снимали с них эпителиальные пласты посредством

офтальмологического скальпеля. Полученные пласты под бинокулярным микроскопом разрезали с помощью бритвы на тонкие полоски. Их помещали в каплю раствора Рингера для холоднокровных таким образом, чтобы свободная рецепторная поверхность этих кусочков могла просматриваться затем в проходящем свете в световом микроскопе. Подложки из пластилина, расположенные между предметным и покровным стеклами, препятствовали сдавливанию препаратов и обеспечивали возможность быстрой смены омывающих их растворов проточной системой, создаваемой полосками фильтровальной бумаги в соответствии с рекомендациями А.А. Бронштейна (1977).

Обонятельный жгутик представляет собой тонкий цилиндрический вырост цитоплазмы, который покрыт плазматической мембраной. Внутри него расположена аксонема – система параллельных микротрубочек $(9 \times 2) + 2$. Длина жгутиков в осенне-зимний период составляет 20 – 50 мкм, а диаметр – 200 нм. Расстояние между жгутиками составляет у земноводных примерно 0,3 – 0,5 мкм. Аксонема жгутиков является механо-химической системой. Изгиб происходит за счет скольжения дублетов микротрубочек друг относительно друга. Если такое локальное смещение будет продвигаться вдоль жгутика, то может возникнуть волнообразное его движение. При движении жгутиков не происходит изменения их длины, поскольку жгутик нерастяжим. Жгутики двигаются в слизи, которой покрыта поверхность обонятельного эпителия.

Для экспериментального анализа двигательной активности жгутиков обонятельных клеток использовали установку для прижизненной телевизионной световой микроскопии, сопряженную с компьютером. В ходе исследования было проведено 390 экспериментов: 49 серий по 6 опытов минимум в каждой.

Одоранты, использованные в работе для стимуляции обонятельных рецепторов, выбирали в соответствии с общепринятой классификацией, предложенной Хенингом. В качестве источника гнилостного запаха использовали β -меркаптоэтанол, цветочного – ванилин, фруктового – амилацетат, пригорелого – амиловый и этиловый спирты, пряного – камфара и цинеол, смолистого – кедровый бальзам, едкого – раствор нашатырного спирта. Эксперименты проводили с тремя различными концентрациями одорантов: 10^{-8} М, 10^{-7} М, 10^{-6} М. Растворы одорантов готовили на растворе Рингера для холоднокровных. Растворы гидрофобных веществ (камфара, цинеол, ванилин, кедровый бальзам, ротенон, 2,4-динитрофенол, олигомицин) готовили на

основе раствора Рингера для холоднокровных, смешанного с 10^{-10} М этиловым спиртом.

При изучении энергетического обеспечения механизма двигательной активности обонятельных жгутиков на препараты воздействовали следующими агентами: ингибиторами переноса электронов по дыхательной цепи митохондрий (азидом натрия в концентрации 10^{-2} М, ротеноном в концентрации 10^{-5} М, малоновой кислотой в концентрации 10^{-2} М), ингибитором гликолиза (монойодуксусной кислотой в концентрации 10^{-3} М), разобщителями окисления и фосфорилирования (2,4-динитрофенолом в концентрации 10^{-4} М, трифторометоксикарбонилцианидфенилгидразоном (ФКЦФ) в концентрации 10^{-5} М), ингибитором H^+ -АТФсинтазы (олигомицином в концентрации 1 мкг/мл).

Одоранты и агенты вводились в среду с препаратом путем проточной системы, создаваемой полосками фильтровальной бумаги. Затем проточную систему убирали, выдерживали препарат в растворе одоранта или агента, а потом проток раствора Рингера возобновляли, удаляя таким образом воздействие.

Результаты проведенных экспериментов были представлены в виде видеофайлов. Для количественного анализа результатов экспериментов оценивали продолжительность инициированного движения жгутиков (время, в течение которого двигаются жгутики под действием одоранта на фоне азида натрия или ротенона).

Результаты исследований

Обоснование и разработка математической модели. Математическая модель жгутика формировалась на основе анализа литературных данных, дающих представление об ультраструктурной организации жгутиков и механизмах, обеспечивающих их подвижность.

Основные положения модели: 1) локальный прогиб жгутика происходит за счет заданной деформации от смещения дублетов микротрубочек; 2) в отсутствие внешних воздействий локальные моменты создаются при гидролизе АТФ динеином; 3) в модели учитывается внешнее воздействие.

В данной модели жгутик рассматривается как тонкое длинное тело цилиндрической формы с постоянным сечением, он нерастяжим, поперечные сдвиги отсутствуют, а при изгибе плоскость сечения остается перпендикулярной изогнутой оси. Движение рассматривается в пространстве относительно неподвижной декартовой системы координат (OXYZ). Ось OZ

направлена вдоль жгутика, то есть перпендикулярно эпителию. Напряженное состояние мало отличается от растяжения-сжатия в направлении OZ.

Модель строится на основании полной системы уравнений классической линейной теории упругости. Однако в эту систему вводится еще один член, а именно, тензор заданных деформаций – $\underline{\varepsilon}_*$, который фактически характеризует причину движения жгутика. В тензорных обозначениях (Работнов Ю.Н., 1988; Елисеев В.В., 1999) эта система имеет вид:

$$\begin{cases} \nabla \cdot \underline{\tau} + \underline{f} = 0 \\ \underline{\tau} = {}^4 \underline{A} \cdot (\underline{\varepsilon} - \underline{\varepsilon}_*) \\ \underline{\varepsilon} = \nabla \underline{U}^s \end{cases} \quad (1)$$

где $\underline{\tau}$ – тензор напряжений; \underline{f} – вектор объемных сил; $\underline{\varepsilon}$ – тензор деформации; ${}^4 A$ – тензор (4-го ранга) жесткостей; \underline{U} – вектор перемещения.

Относительная толщина жгутика достаточно мала (это утверждение справедливо для ресничек мерцательного эпителия, жгутиков сперматозоидов и обонятельных жгутиков), что позволяет вместо трехмерной модели с уравнениями (1) использовать одномерную модель стержня Бернулли-Эйлера-Кирхгофа. Переход от трехмерной модели к одномерной основан на двух независимых гипотезах – о распределении перемещений по сечению и о порядках напряжений:

$$\begin{aligned} \underline{U}(x, y, z, t) \approx \underline{u}(z, t) - \frac{\partial \underline{u}}{\partial z} \cdot \underline{r}, \quad \underline{u} \equiv u_x \underline{i} + u_y \underline{j}, \quad \underline{r} \equiv x \underline{i} + y \underline{j}, \\ \sigma_z \equiv \tau_{zz} \gg \tau_{zx}, \tau_{zy} \gg \tau_{xx}, \tau_{yy}, \tau_{xy}. \end{aligned} \quad (2)$$

Обозначено: \underline{u} – вектор прогиба (перпендикулярен оси OZ жгутика); $\underline{i}, \underline{j}, \underline{k}$, – орты декартовых осей OX, OY, OZ; \underline{r} – радиус-вектор в сечении.

Тогда уравнения системы (1) с учетом (2) имеют вид:

$$\begin{aligned} \sigma_z \approx E(\varepsilon_z - \varepsilon_*) \approx -E \left(\frac{\partial^2 \underline{u}}{\partial z^2} \cdot \underline{r} + \varepsilon_* \right), \\ \frac{\partial \underline{Q}}{\partial z} + \underline{q} = \rho \frac{\partial^2 \underline{u}}{\partial t^2} + b \frac{\partial \underline{u}}{\partial t}, \quad \frac{\partial \underline{M}}{\partial z} + \underline{k} \times \underline{Q} = 0, \end{aligned}$$

где b – коэффициент вязкого сопротивления слизи, ρ – масса жгутика на единицу длины

Задача с начальными и граничными условиями такова:

$$\alpha \frac{\partial^4 u}{\partial z^4} + \rho \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + b \frac{\partial u}{\partial t} = \underline{q} - \frac{\partial^2 \beta}{\partial t^2} \quad (3)$$

$$t = 0: \underline{u} = \underline{u}_0(z), \quad \frac{\partial \underline{u}}{\partial t} = \underline{v}_0(z); \quad z = 0: \underline{u} = 0, \quad \frac{\partial \underline{u}}{\partial z} = 0; \quad z = l: \underline{Q} = 0, \underline{M} = 0.$$

В случае покоя при $t = 0$: $\underline{u}_0 = 0$, $\underline{v}_0 = 0$.

Задача (3) решается методом собственных функций с разделением переменных:

$$\alpha \frac{\partial^4 u}{\partial z^4} + \rho \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + b \frac{\partial u}{\partial t} = 0, \quad u = P(z)T(t) \quad \Rightarrow \quad \frac{d^4 P}{dz^4} = \kappa^4 P, \quad \rho \frac{d^2 T}{dt^2} + b \frac{dT}{dt} + \alpha \kappa^4 T = 0;$$

$$P(0) = \frac{dP}{dz} \Big|_{z=0} = \frac{d^2 P}{dz^2} \Big|_{z=l} = \frac{d^3 P}{dz^3} \Big|_{z=l} = 0 \Rightarrow \kappa = \kappa_n, \quad P = P_n(z).$$

Собственные числа κ_n – это те значения κ , при которых однородная задача для P имеет нетривиальное решение. Решения P_n выражаются через функции Крылова.

Неоднородное уравнение

$$\alpha \frac{\partial^4 u}{\partial z^4} + \rho \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + b \frac{\partial u}{\partial t} = p(z, t) \quad (4)$$

решается с помощью разложения в ряд по P_n .

Уравнения для u_x и u_y имеют вид (4) – где: $p = q_x - \frac{\partial^2 \beta_x}{\partial z^2}$ и $q_y - \frac{\partial^2 \beta_y}{\partial z^2}$.

Коэффициент вязкого сопротивления b вычислен следующим образом. Сила вязкого трения на единицу длины определяется так:

$$\frac{F}{l} = C_d \frac{1}{2} \gamma v^2 a = b v,$$

где v – скорость движения жгутика. Коэффициент увлечения C_d имеет следующий вид: $C_d = \frac{C_0}{\Re}$, где $\Re = \frac{\gamma a v}{\eta}$ – число Рейнольдса, а $C_0 \approx 24$. Тогда: $b = 12\eta$.

Для описания движения жгутика необходимо составить расчетный алгоритм, который позволил бы при изменении исходных данных наблюдать за изменением характеристик движения. При составлении алгоритма ограничили число членов в разложении по формам – считали с тремя степенями свободы.

Исходные данные: длина жгутика – l ; радиус сечения жгутика – a ; масса жгутика на единицу его длины – ρ ; модуль Юнга жгутика – E ; динамическая вязкость слизи – η ;

Задаваемые функции:

- заданная деформация – $\varepsilon_*(r, \varphi, z, t)$;

Исходя из ультраструктурной организации жгутиков и механизмов, обеспечивающих их подвижность, заданную деформацию можно принять в следующем общем виде:

$$\varepsilon_*(r, \varphi, z, t) = B(t)N(z)\Omega(\varphi), \text{ где } \Omega(\varphi) = \begin{cases} 1, \varphi \in \left[0, \frac{2\pi}{9}k\right] \\ 0, \varphi \notin \left[0, \frac{2\pi}{9}k\right] \end{cases}, k = 1, \dots, 9$$

- внешнее воздействие – $q(t)$;

Алгоритм расчета:

$$1) \alpha = E \frac{\pi a^4}{4}; \kappa_n = \frac{\pi}{l} \cdot \left(n - \frac{1}{2}\right), \text{ где } n = 1, 2, 3;$$

$$b = 12\eta;$$

$$2) P_n(z) = \frac{2}{\sqrt{l}} K_3(\kappa_n z) - \frac{2}{\sqrt{l}} \frac{K_4(\kappa_n l)}{K_1(\kappa_n l)} K_4(\kappa_n z); \quad \frac{dP_n(z)}{dz} = \kappa_n \left(\frac{2}{\sqrt{l}} K_2(\kappa_n z) - \frac{2}{\sqrt{l}} \frac{K_4(\kappa_n l)}{K_1(\kappa_n l)} K_3(\kappa_n z) \right);$$

$$3) \xi_{1n} = \frac{-b + \sqrt{b^2 + 4\rho\alpha\kappa_n^4}}{2\rho}; \xi_{2n} = \frac{-b - \sqrt{b^2 + 4\rho\alpha\kappa_n^4}}{2\rho};$$

$$4) L_n \equiv \frac{\partial N(z)}{\partial z} \Big|_{z=l} P_n(l) - N(l) \frac{dP_n}{dz} \Big|_{z=l} - \int_0^l \frac{\partial^2 N(z)}{\partial z^2} P_n dz; \quad M_n \equiv \int_0^l P_n(z) dz;$$

$$5) H_x = E \frac{a^3}{3} \sin\left(\frac{2\pi}{9}k\right); H_y = E \frac{a^3}{3} \left(1 - \cos\left(\frac{2\pi}{9}k\right)\right), k = 1, \dots, 9;$$

$$6) d_{\text{внутр } n}(t) = \left[e^{\xi_{1n}t} \left(\int_0^t B(t) e^{-\xi_{1n}t} dt \right) - e^{\xi_{2n}t} \left(\int_0^t B(t) e^{-\xi_{2n}t} dt \right) \right];$$

$$d_{\text{внешн } n}(t) = \left[e^{\xi_{1n}t} \left(\int_0^t q(t) e^{-\xi_{1n}t} dt \right) - e^{\xi_{2n}t} \left(\int_0^t q(t) e^{-\xi_{2n}t} dt \right) \right];$$

$$7) \phi_{nx} = \frac{1}{\xi_{1n} - \xi_{2n}} \left[H_x L_n d_{\text{внутр } n}(t) + M_n d_{\text{внешн } n}(t) \right];$$

$$\phi_{ny} = \frac{1}{\xi_{1n} - \xi_{2n}} \left[H_y L_n d_{\text{внутр } n}(t) + M_n d_{\text{внешн } n}(t) \right];$$

$$8) u(z, t) = \sum_{n=1}^3 \phi_n(t) P_n(z); \quad \frac{\partial u(z, t)}{\partial z} = \sum_{n=1}^3 \phi_n(t) \frac{dP_n(z)}{dz};$$

$$9) \underline{U}(x, y, z, t) = u_x(z, t) \underline{i} + u_y(z, t) \underline{j} + \left(-\frac{\partial u_x(z, t)}{\partial z} x - \frac{\partial u_y(z, t)}{\partial z} y \right) \underline{k}.$$

Наличие алгоритма позволяет проводить вычисления и анализировать влияние различных параметров на характер двигательной активности различных цилиарных структур.

В данной работе алгоритм расчета, приведенный выше, был адаптирован к изучению подвижности обонятельных жгутиков.

В отсутствие одорантов обонятельные жгутики двигаются неупорядоченно – асинхронно, сгибаясь и разгибаясь с непостоянной скоростью и без определенного ритма. Из сказанного становится очевидным то, что заданные деформации, характеризующие причину движения жгутика, являются функциями независимых случайных величин.

Динеиновые «ручки» равномерно распределены по плоскости сечения обонятельного жгутика в проксимальном участке. Следовательно, любая из «ручек» с равной вероятностью может активировать гидролиз молекулы АТФ, благодаря АТФазной активности динеина. Пусть число k отражает номер динеиновой «ручки» в плоскости сечения.

Молекулы АТФ, которые впоследствии будут гидролизованы, поступают в произвольные моменты времени. Примем, что одновременно не может идти гидролиз более чем одной молекулы АТФ. Промежутки времени между следующими друг за другом событиями гидролиза в общем случае неодинаковы. Следовательно, частота гидролиза w является случайной величиной.

С наибольшей вероятностью молекула АТФ будет гидролизована первой (ближайшей от плоскости обонятельного эпителия) молекулой динеина, обладающего АТФазной активностью. При этом не имеет значения, вблизи какой именно микротрубочки это произойдет. По мере продвижения к вершине обонятельного жгутика вероятность провести гидролиз стремительно уменьшается. Именно это отражает вероятностный параметр χ .

Исходя из этих соображений, допустим, что заданная деформация для обонятельных жгутиков имеет вид:

$$\varepsilon_*(r, \varphi, z, t) = C \sin(\omega t) \cdot e^{-\chi z} \Omega(\varphi),$$

где w – частота гидролиза АТФ, c^{-1} ; χ – параметр, характеризующий вероятность гидролиза АТФ по длине жгутика, m^{-1} .

В данной математической модели воздействие одоранта на жгутик рассматривали как стимул, переключающий молекулярные механизмы подвижности с обеспечения режима рыскания (неупорядоченных колебаний) на целенаправленные упорядоченные движения. Молекулярные процессы, осуществляющие упорядоченные движения жгутика, мы условно назвали «хемотактильной силой». Для того, чтобы воздействие одоранта реализовалось, он должен напрямую или опосредованно запустить гидролиз АТФ и, как следствие, активацию его синтеза. Функция $q(t)$ определяется типом одоранта. Пусть ее аргументами являются постоянные параметры: q_0 и t_0 . Условия эксперимента создавались таким образом, что концентрация одоранта меняется

по кривой, близкой к параболе. Тогда: $q(t) = \lg q_0 \frac{t}{t_0} \left(1 - \frac{t}{t_0}\right)$.

Подставив заданные характеристические функции в явном виде в общий алгоритм расчета, получим алгоритм, позволяющий моделировать движение различных по своим размерам обонятельных жгутиков.

Для проверки адекватности математической модели экспериментальным данным рассмотрим три предельных случая и качественно сопоставим с результатами эксперимента:

1-й случай: в отсутствие внешнего воздействия единственной причиной, вызывающей движения жгутиков, являются активные внутренние деформации, обусловленные тубулин-динеиновой молекулярной системой подвижности – управляющими параметрами в этом случае являются аргументы функции заданных деформаций, которые представляют собой случайные величины: частота w , число k , параметр χ ;

2-й случай: при действии одорантов появляется вторая составляющая в механизме генерации движения, а именно – «хемотактильная сила», которая, по-видимому, отображает включение актин-миозиновой молекулярной системы подвижности; в связи с этим, управляющими параметрами, являются и вышеперечисленные случайные величины, и детерминированные q_0 и t_0 , зависящие от типа одоранта;

3-й случай: в случае, когда по каким-либо причинам единственной составляющей механизма генерации движения является «хемотактильная

сила», управляющими параметрами остаются только q_0 и t_0 , зависящие от типа одоранта.

Результаты экспериментального анализа подвижности жгутиков.

Приводимые далее экспериментальные результаты зафиксированы и сохранены в видеофайлах.

1-й случай

В отсутствие одорантов обонятельные жгутики двигаются неупорядоченно, сгибаясь в разные стороны. Эти данные, имеющиеся в литературе, подтверждены нашими наблюдениями и соответствуют первому предельному варианту модели. Предполагают, что неупорядоченные движения жгутика обусловлены взаимодействием микротрубочек, образованных тубулином, с динеином. Тубулин-динеиновая молекулярная система сосредоточена, очевидно, в основании обонятельного жгутика. Его дистальная часть движется пассивно, наподобие хлыста в руке человека. Такой «рукой», приводящей в движение обонятельный жгутик, может служить его часть, которая непосредственно прилежащая к апикальному полюсу обонятельной клетки.

2-й случай

Результаты проведенного в работе экспериментального исследования двигательной активности обонятельных жгутиков привели к выводу о принципиальных различиях в действии на них двух групп одорантов. Первую из них составляют вещества, вызывающие ощущения цветочного, фруктового, пригорелого (прогорклого), пряного (камфарного) и смолистого запахов. Под их действием изменяется характер двигательной активности жгутиков: от неупорядоченного к упорядоченному, причем упорядоченные движения приобретают только отдельные жгутики – по-видимому те, которые имеют рецепторные белки к тому или иному одоранту этой группы. Согласно данным, полученным Е.В. Бигдай (2004), такое упорядочение может происходить за счет работы актин-миозиновой системы в дистальном отделе жгутика, благодаря тому, что под действием одорантов происходит полимеризация G-актина и превращение его в F-актин с образованием актиновых нитей, с которыми взаимодействуют миозиновые структуры. Этот случай соответствует второму предельному варианту модели, в котором появляется «хемотактильная сила» как упорядочивающий фактор.

Вторую группу одорантов составляли вещества с острым (водный раствор аммиака) и гнилостным (β -меркаптоэтанол) запахами. Для них не найдены молекулярные рецепторы в обонятельных жгутиках. Есть основание считать, что эти своеобразные одоранты действуют на обонятельные клетки, проникая в них и воздействуя непосредственно на дыхательную цепь митохондрий. В ходе экспериментов по изучению механизма энергообеспечения подвижности обонятельных жгутиков при действии этих одорантов было отмечено, что водный раствор аммиака инициировал подвижность всех обонятельных жгутиков, находившихся в поле зрения микроскопа, а β -меркаптоэтанол подавлял двигательную активность обонятельных жгутиков и не инициировал их движений на фоне ингибиторов переноса электронов по дыхательной цепи.

3-й случай

Нами показано, что при действии одорантов на фоне азидата натрия и ротенона (в опытах по изучению механизма энергообеспечения) движения жгутиков, инициированные одорантами, также приобретают упорядоченный характер. Характер движений жгутиков, наблюдаемый в этих опытах, можно сопоставить, по нашему мнению, с результатами математического моделирования в третьем предельном случае.

Механизм энергообеспечения двигательной активности обонятельных жгутиков в различных условиях. Подавление синтеза АТФ в митохондриях за счет блокирования переноса электронов в дыхательной цепи азидом натрия в концентрации 10^{-2} М и ротеноном в концентрации 10^{-5} М приводило к прекращению подвижности обонятельных жгутиков в отсутствие одорантов. Такой же эффект вызывало разобщение окисления и фосфорилирования 2,4-динитрофенолом в концентрации 10^{-4} М и ФКЦФ в концентрации 10^{-5} М.

На фоне ингибиторов переноса электронов в дыхательной цепи (азидата натрия и ротенона) все изученные одоранты, за исключением β -меркаптоэтанола, инициировали подвижность жгутиков, которая не прекращалась при введении в среду малоновой кислоты в концентрации 10^{-2} М. По нашим данным, синтез АТФ при инициации движений под действием одорантов на фоне ингибиторов переноса электронов по дыхательной цепи не мог обеспечиваться гликолизом, поскольку введение монооксусной кислоты в концентрации 10^{-3} М не изменяло характера подвижности обонятельных жгутиков. На фоне разобщителей окисления и фосфорилирования (2,4-динитрофенол и ФКЦФ), а также олигомицина (ингибитора активности H^+ -

АТФсинтазы) все одоранты не инициировали подвижность жгутиков. Представленные данные могут свидетельствовать о том, что при появлении одорантов в среде появляется дополнительный пул молекул АТФ. Возможно, что их источником может быть H^+ -АТФсинтаза, локализованная вне митохондрий. Однако ее наличие в мембране обонятельных жгутиков еще никем не показано.

Экспериментальное определение параметров q_0 и t_0 предложенной нами модели. Параметры, введенные в модель, определены так: q_0 – концентрация одоранта, вводимого в среду с препаратом, а t_0 – средняя продолжительность инициированного движения жгутика под действием одоранта концентрации q_0 .

Для количественной оценки влияния различных факторов, характеризующих вводимый в среду одорант, на продолжительность инициированного движения обонятельных жгутиков были выбраны следующие параметры: концентрация одоранта и его молекулярная масса. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Сравнительная характеристика продолжительности инициированного движения жгутиков под действием различных одорантов

одорант	средняя продолжительность инициированного движения жгутиков, с ($M \pm m$)			молекулярная масса одоранта
	$10^{-8} M$	$10^{-7} M$	$10^{-6} M$	
этиловый спирт	8,4±0,4**	15,2±0,7**	18,7±0,5**	46,1
амиловый спирт	15,3±0,6**	23,0±0,9**	28,2±0,7**	88,2
амилацетат	32,6±0,8**	39,3±0,8**	43,9±0,8**	130,0
камфара	35,2±0,9**	41,6±0,9**	45,6±0,8**	152,2
ванилин	38,3±0,7**	45,7±0,7**	48,6±1,2**	152,3
цинеол	46,4±0,6**	53,0±0,9**	56,2±0,7**	154,3
водный раствор аммиака	8,6±0,6*	14,7±0,9**	17,8±0,9**	35
кедровый бальзам	67,3±0,8**	74,1±1,3**	79,4±1,0**	–

В ходе экспериментов было установлено, что для каждого одоранта с увеличением концентрации стимула время инициированного движения жгутиков также возрастает. Для численного анализа этой зависимости был применен регрессионный анализ. Результаты представлены в табл. 2.

Уравнения прямых регрессии для каждого одоранта

одорант	уравнение прямой регрессии
водный раствор аммиака (ММ = 35)	$t_0 = 45,9 + 4,6 \lg q_0$
этиловый спирт (ММ = 46,1)	$t_0 = 50,2 + 5,1 \lg q_0$
амиловый спирт (ММ = 88,2)	$t_0 = 67,5 + 6,4 \lg q_0$
амилацетат (ММ = 130,0)	$t_0 = 75,1 + 5,6 \lg q_0$
камфара (ММ = 152,2)	$t_0 = 77,2 + 5,2 \lg q_0$
ванилин (ММ = 152,3)	$t_0 = 80,2 + 5,1 \lg q_0$
цинеол (ММ = 154,3)	$t_0 = 86,2 + 4,9 \lg q_0$
кедровый бальзам	$t_0 = 115,9 + 6,1 \lg q_0$

Полученные уравнения прямых регрессии позволяют прогнозировать среднюю продолжительность движения жгутика в зависимости от концентрации одоранта и его молекулярной массы, что, в свою очередь, дает возможность моделировать движение жгутиков и проводить численные эксперименты.

Проверка адекватности математической модели. Для сопоставления с результатами опытов мы провели численные эксперименты по моделированию движения одного жгутика. В данной работе моделировали движение жгутика, обладающего следующими данными: длина жгутика – $l = 3 \cdot 10^{-5}$ м; радиус сечения жгутика – $a = 10^{-7}$ м; масса жгутика на единицу его длины – $\rho = 0,3 \cdot 10^{-10}$ кг/м; модуль Юнга жгутика – $E = 10^9$ Па; динамическая вязкость слизи – $\eta = 10^{-3}$ Па·с.

1-й случай

В ходе моделирования движения в отсутствие одорантов (рис. 1 и рис. 2) выяснено влияние управляющих параметров на подвижность жгутика.

$$k = 7; \chi = 0,9; w = 0,5; C = 0,1.$$

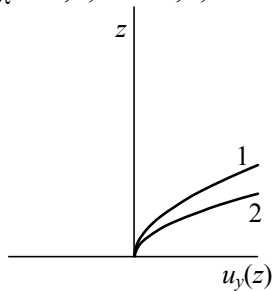


Рис. 1

$$1 - t_1 = 5 \text{ с}; 2 - t_2 = 10 \text{ с};$$

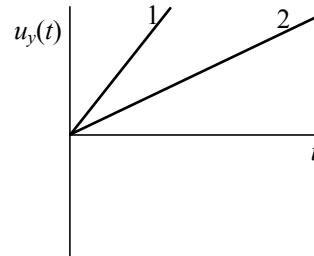


Рис. 2

$$1 - z_1 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ м}; 2 - z_2 = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ м}$$

Отформатировано: русский (Россия)

Отформатировано: русский (Россия)

Значение числа k определяет, в какую сторону отклоняется жгутик, и наряду с вероятностным параметром χ влияет на угол отклонения жгутика. Частота w сильнее других параметров влияет на скорость движения.

При постоянной смене значений случайных параметров имеет место неупорядоченное движение жгутиков, что соответствует первому случаю, наблюдаемому в эксперименте.

2-й случай

При действии различных одорантов (рис. 3) кривые практически полностью совпадают. Однако, по сравнению с кривой 2 на рис. 1 заметна существенная разница, обусловленная появлением слагаемых, связанных с «хемотактильной силой». Таким образом, под действием «хемотактильной силы» наблюдается переход от неупорядоченного движения жгутиков к упорядоченному. Кроме того, при введении в модель «хемотактильной силы» мы предполагали наличие дополнительного механизма синтеза АТФ, что и было отчасти подтверждено в экспериментальном исследовании.

$$k = 7; \chi = 0,9; w = 0,5; C = 0,1.$$

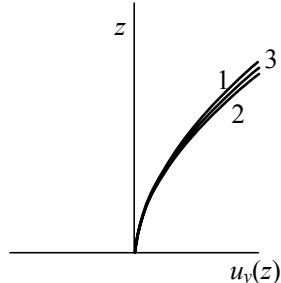


Рис. 3
 $t = 10$ с

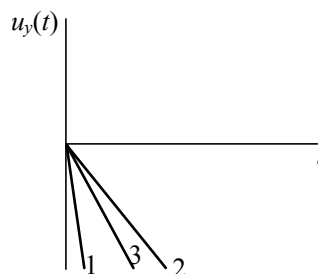


Рис. 4
 $z = 3 \cdot 10^{-5}$ м

- 1- $q_0 = 10^{-6}$ М, $t_0 = 18,7$ с (этиловый спирт);
- 2- $q_0 = 10^{-7}$ М, $t_0 = 39,3$ с (амилацетат);
- 3- $q_0 = 10^{-8}$ М, $t_0 = 38,3$ с (ванилин).

3-й случай

Появление в среде одорантов играет ключевую роль в подвижности жгутиков, когда функция заданных деформаций тождественно равна нулю. Движение жгутиков под действием одорантов является в этом случае упорядоченным (рис. 5 и 6), ввиду отсутствия влияния вероятностного параметра χ и числа k . Аналогичным образом жгутики двигались и при экспериментальном наблюдении за ними в ходе экспериментов, когда одоранты инициировали подвижность на фоне азида натрия и ротенона.

$$q_0 = 10^{-8} \text{ М}, t_0 = 38,3 \text{ с (ванилин)}$$

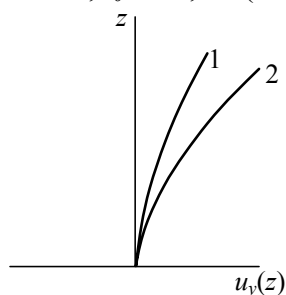


Рис. 5

1- $t_1 = 5 \text{ с}$; 2- $t_2 = 10 \text{ с}$

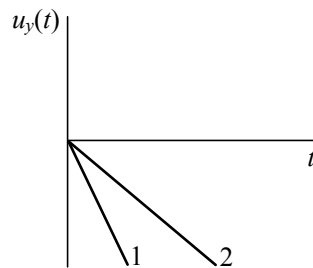


Рис. 6

1- $z_1 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ м}$; 2- $z_2 = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ м}$

Следовательно, результаты проведенных модельных экспериментов совпадают с качественной оценкой экспериментальных данных, что свидетельствует о работоспособности и адекватности модели и дает возможность использовать подобный подход как для прогнозирования влияния других одорантов на двигательную активность жгутиков, так и для моделирования движения других цилиарных структур.

Выводы

1. Математическая модель обонятельного жгутика как деформируемого стержня с заданными дополнительными несовместными деформациями в качестве воздействия, адекватна биофизическим процессам, обеспечивающим двигательную активность жгутика, и позволяет прогнозировать ее изменения под действием одорантов.
2. Под действием одорантов, вызывающих ощущения цветочного, фруктового, пригорелого (прогорклого), пряного (камфорного) и смолистого запахов, движения отдельных обонятельных жгутиков, устремляющихся навстречу стимулу, приобретают упорядоченный характер.
3. Водный раствор аммиака стимулирует упорядоченные движения обонятельных жгутиков, а β -меркаптоэтанол подавляет их двигательную активность.
4. Энергообеспечение неупорядоченной двигательной активности обонятельных жгутиков в отсутствие одорантов осуществляется АТФ, синтезируемым в митохондриях, тогда как упорядочение движений в присутствии пахучих веществ связано, по-видимому, с немитохондриальным синтезом АТФ.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Елисеев В.В., Огнева И.В., Самойлов В.О. Математическое моделирование движения жгутиков обонятельных клеток // Биофизика. – 2003. – Т. 48, вып. 5. – С. 884 – 890.
2. Огнева И.В., Елисеев В.В., Самойлов В.О. Численный анализ двигательной активности обонятельных жгутиков // Сборник тезисов школы-конференции «Биология – наука XXI века». Пущино, 2003. – С. 254.
3. Огнева И.В. Математическая модель цилиарных структур // Труды 4-ой Международной научно-технической конференции «Компьютерное моделирование 2003». СПб., 2003. – С. 176 – 177.
4. Огнева И.В., Бигдай Е.В., Самойлов В.О. Роль H⁺-АТФ синтетазы в двигательной активности обонятельных жгутиков // Труды СПбГПУ. Материалы IV Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах». СПб., 2002. – С. 283 – 284.
5. Огнева И.В. Нелинейная динамическая модель движения обонятельных жгутиков в различных условиях // Труды 4-ой Международной молодежной школы-семинара «БИКАМП'03». СПб., 2003. – С. 136 – 139.
6. Огнева И.В. Анализ подвижности обонятельных жгутиков как нелинейной динамической системы // Материалы научно-практической конференции «Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий». СПб., 2003. – С. 357 – 363.
7. Огнева И.В. Особенности механизма энергообеспечения двигательной активности обонятельных жгутиков при действии одорантов // Цитология. – 2003. – Т. 45, № 9. – С. 908.
8. Огнева И.В., Самойлов В.О. Результаты экспериментального анализа подвижности обонятельных жгутиков // Материалы межвузовской научной конференции «XXXII Неделя науки СПбГПУ». СПб., 2004. – С. 131 – 133.

Работа выполнена на кафедре физико-химических основ медицины государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН
Самойлов Владимир Олегович

Научный консультант:

доктор физико-математических наук, профессор
Елисеев Владимир Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник
Тимковский Андрей Леонидович

доктор технических наук, профессор
Болдырев Юрий Яковлевич

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный Университет».

Защита состоится «___» _____ 2005 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет» по адресу: 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29, в _____ ауд. _____ здания.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет».

Автореферат разослан «___» _____ 2005 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат физико-математических наук

Власова О.Л.