



УДК 576.53.6

Дегенеративные изменения и нейрогенез в обонятельном эпителии рыб после длительной хемостимуляции

И. В. Клименков^{1,2}, А. В. Натяганова¹, А. В. Курылев³, М. В. Пастухов⁴,
Н. П. Судаков⁵, Н. С. Косицын⁶

¹Лимнологический Институт СО РАН, Иркутск

²Иркутский государственный университет, Иркутск

³Региональный государственный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Иркутской области
Росстандарта, Иркутск

⁴Институт геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН, Иркутск

⁵Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН, Иркутск

⁶Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

E-mail: iklimen@mail.ru

Аннотация. С помощью электронно-микроскопических и светооптических методов установлено, что длительная хемостимуляция рыб нетоксичными водорастворимыми веществами (гетерогенная смесь пептидов и аминокислот) вызывает не только избирательную дифференцировку и гибель отдельных клеток периферического отдела обонятельного анализатора, но и запускает компенсаторные процессы их нейрогенеза.

Ключевые слова: хеморецепция, обонятельная клетка, обонятельный эпителий, дегенерация клеток, нейрогенез.

Введение

Ранее авторами было высказано предположение о том, что дифференцировка обонятельных (ольфакторных) рецепторных нейронов у животных может зависеть не только от гормональных перестроек в организме, но и от химической стимуляции молекулярных рецепторов, локализованных в мембранах моноспецифичных хемочувствительных клеток [2]. Согласно данным представлениям, стимулированные запаховыми молекулами обонятельные нейроны способны переходить в состояние дендритной нейросекреции, синтез рецепторных белков переключается при этом с мембраносвязанной на водорастворимую форму. Такие новосинтезированные белки могут связывать молекулы ольфакторных раздражителей непосредственно в обонятельной слизи, обеспечивая соответствующее специфическое ослабление хеморецепции – селективную аносмию. Эта гипотеза была сформулирована после обнаружения феномена дендритной нейросекреции, выявленной в обонятельных клетках у байкальских бычковых из сем. Cottidae в связи с их феромональной коммуникацией во время нереста [2; 3]. Подобные результаты были получены также в модельных экспериментах, в

которых такая трансформация клеток была вызвана у немногочисленных рецепторных нейронов путём хронической хемостимуляции рыб одностипным раздражителем – сахарозой [5]. Известно, что в ольфакторном эпителии рыб представлено около 100 белков-рецепторов [13], каждый из которых экспрессируется в отдельном нейроне и предопределяет его моноспецифичность. С учётом этих фактов для экспериментальной проверки данной гипотезы в качестве предъявляемых стимулов более целесообразно использовать не одностипные раздражители, а более разнообразный по структуре и молекулярной массе спектр запаховых молекул. Это могло бы существенно увеличить число активированных рецепторных нейронов и позволило создать более адекватные условия для их стимул-зависимой дифференцировки в клетки, дендритный участок которых преобразован для обеспечения нейросекреции. В связи с этим цель экспериментальных работ, результаты которых изложены в настоящей публикации, состояла в изучении степени пластичности как обонятельного эпителия в целом, так и его отдельных структурных элементов в связи с их длительной хемостимуляцией нетоксичной гетерогенной смесью водорастворимых веществ.

Материалы и методы

В первой серии экспериментов в качестве модельного объекта была использована каменная широколобка (*Paracottus knerii*, Cottidae). После переноса из естественной среды рыбы адаптировались в течение 7 суток в непроточных аквариумах объёмом 20 л с периодически обновляемой водой при температуре +5 °С. После адаптации в воду добавляли гетерогенную смесь аминокислот и пептидов, полученную в результате ферментативного гидролиза казеина (Fluka). Концентрация вносимых веществ поддерживалась на уровне 1–2·10⁻⁸ М в течение 10 суток. Контрольные рыбы содержались в аналогичных условиях без добавления действующих веществ. По истечении времени обонятельные розетки опытных и контрольных рыб фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида (Sigma-Aldrich) на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,3) и далее в 2%-ном растворе OsO₄ (Merck KGaA) на том же буфере. Затем образцы обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, после чего материал заливали в эпоксидную смолу Araldite 502 Kit (SPI) с добавлением катализатора DMP-30 (SPI). Срезы изготавливали на ультрамикротоме Ultracut R (Leica), которые далее исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Leo 906 E (Zeiss) при ускоряющем напряжении 80 kV. Микрофотографии получали камерой MegaView II и обрабатывали с помощью программного обеспечения Mega Vision.

Для оценки структурно-функциональной активности базальных клеток обонятельного эпителия анализировали морфологические характеристики их ядрышек у рыб из контроля и эксперимента. С этой целью на обыкновенном гольяне (*Phoxinus phoxinus*) и жемчужном гурами (*Trichogaster leeri*) проводили вторую серию аналогичных экспериментов с разделением рыб на контрольные и опытные группы. Из зафиксированных в укусно-метиловой смеси (1:3) обонятельных розеток получали воздушно-высушенные цитологические препараты, следуя технике «стряхивания-отпечатывания» [1]. Данный приём позволяет получать монослой ядер диссоциированных клеток на предметном стекле. Для выявления ядрышек препараты окрашивали с помощью азотно-кислого серебра по методу Ховелла и Блейка [9]. Микроскопию и фотодокументирование окрашенных цитологических препаратов проводили на микроскопе AxioStar (Zeiss), оснащённом ви-

деокамерой Pixera Penguin 600CL и обрабатывали с помощью компьютерной программы VideoTesT-Rasmer v. 5.0. На цифровых фотографиях измеряли площади ядрышек и ядер. Структурно-функциональную активность базальных клеток оценивали по значению ядрышкового индекса I_{nl} :

$$I_{nl} = S_{nl} / S_{Ns} \times 100,$$

где S_{nl} – площадь ядрышка (nl – сокращение от англ. *nucleolus*); S_{Ns} – площадь ядра (Ns – сокращение от англ. *nucleus*).

Компьютерную обработку числовых данных проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

Проведённые электронно-микроскопические исследования показывают, что используемые режимы хемостимуляции вызывают в обонятельном эпителии каменной широколобки избирательную дифференцировку рецепторных нейронов. Кроме характерных для контроля чувствительных клеток с пониженным уровнем развития внутриклеточных элементов (рис. 1, а) в эпителии выявляются также нейроны, у которых возрастает интенсивность ядерно-цитоплазматических отношений (рис. 1, б), увеличивается плотность свободных и связанных с каналами эндоплазматического ретикулума рибосом (рис. 1, в), активируется секреторная функция аппарата Гольджи. Апоикальные участки таких обонятельных клеток содержат секреторные пузырьки со светлым содержанием (рис. 1, г). Предполагается, что данные вершины принадлежат рецепторным клеткам, претерпевающим процессы стимул-зависимой дифференцировки в клетки секреторного типа, вызванной в результате их хронической хемостимуляции.

У других нейронов каналы эндоплазматического ретикулума фрагментированы и в некоторых участках расширены. В дендритном отростке они содержат полностью или частично набухшие митохондрии (рис. 2, а). Нарушение структуры митохондрий наблюдается также и в опорных элементах эпителия – в мерцательных и секреторных клетках. Наблюдаемые в эксперименте морфологические перестройки митохондрий могут происходить под воздействием на них сигнальных каскадов, активирующей программированную гибель клетки [15]. Такие цитологические преобразования в обонятельных клетках могут быть вызваны в результате их хронического стресса, развивающегося под влиянием длительной стимуляции

ольфакторным раздражителем. Известно, что набухание митохондрий сопровождается инактивацией происходящих в них процессов окислительного фосфорилирования, утратой способности к продукции АТФ и высвобождением в цитозоль белков-индукторов программированной гибели клетки. При необратимом характере описанных выше процессов дисфункция митохондрий в конечном итоге может приводить к апоптозу клеток [12]. Морфологическим подтверждением процессов избиратель-

ной гибели нервных клеток являются обнаруженные в базальных отделах эпителия факты выборочных дегенеративных изменений их центральных отростков – аксонов. У таких нейронов профили аксонов в разной степени расширены, лишены нейрофиламентов и имеют ярко выраженную пониженную плотность аксоплазмы. Это хорошо выделяет их на фоне центральных отростков сохранившихся рецепторных клеток (рис. 2, б).

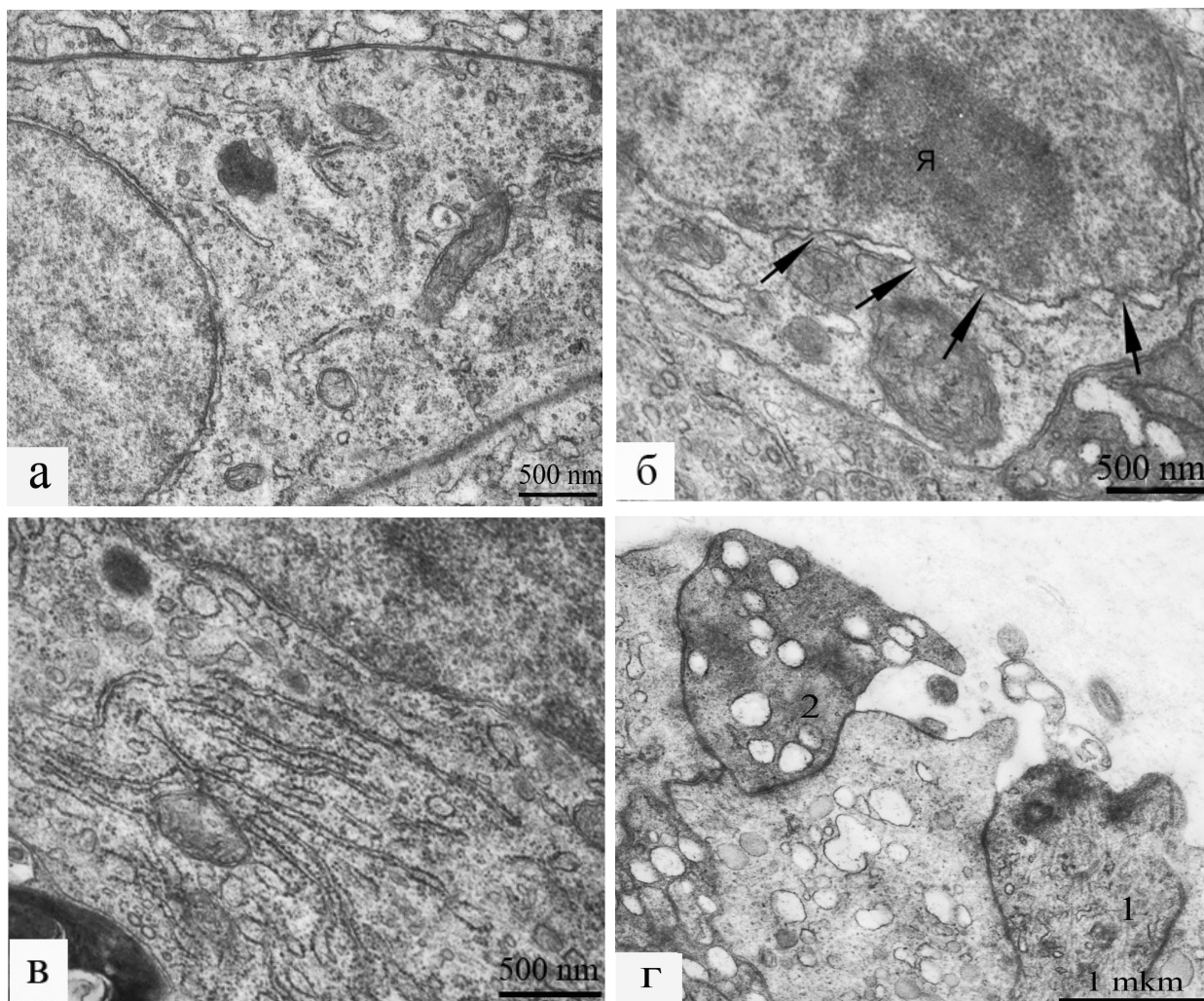


Рис. 1. Особенности ультраструктурной организации обонятельных нейронов у каменной широколобки (*Paracottus knerii*) в контроле (а) и после продолжительной хемостимуляции гетерогенной смесью пептидов и аминокислот (б – г); б – активация ядерно-цитоплазматических взаимоотношений (стрелками показаны ядерные поры), я – ядрышко; в – увеличение плотности рибосом в цитоплазме рецепторной клетки; г – вершины не изменённых рецепторных нейронов (1), вершины нейронов в фазу дендритной нейросекреции (2)

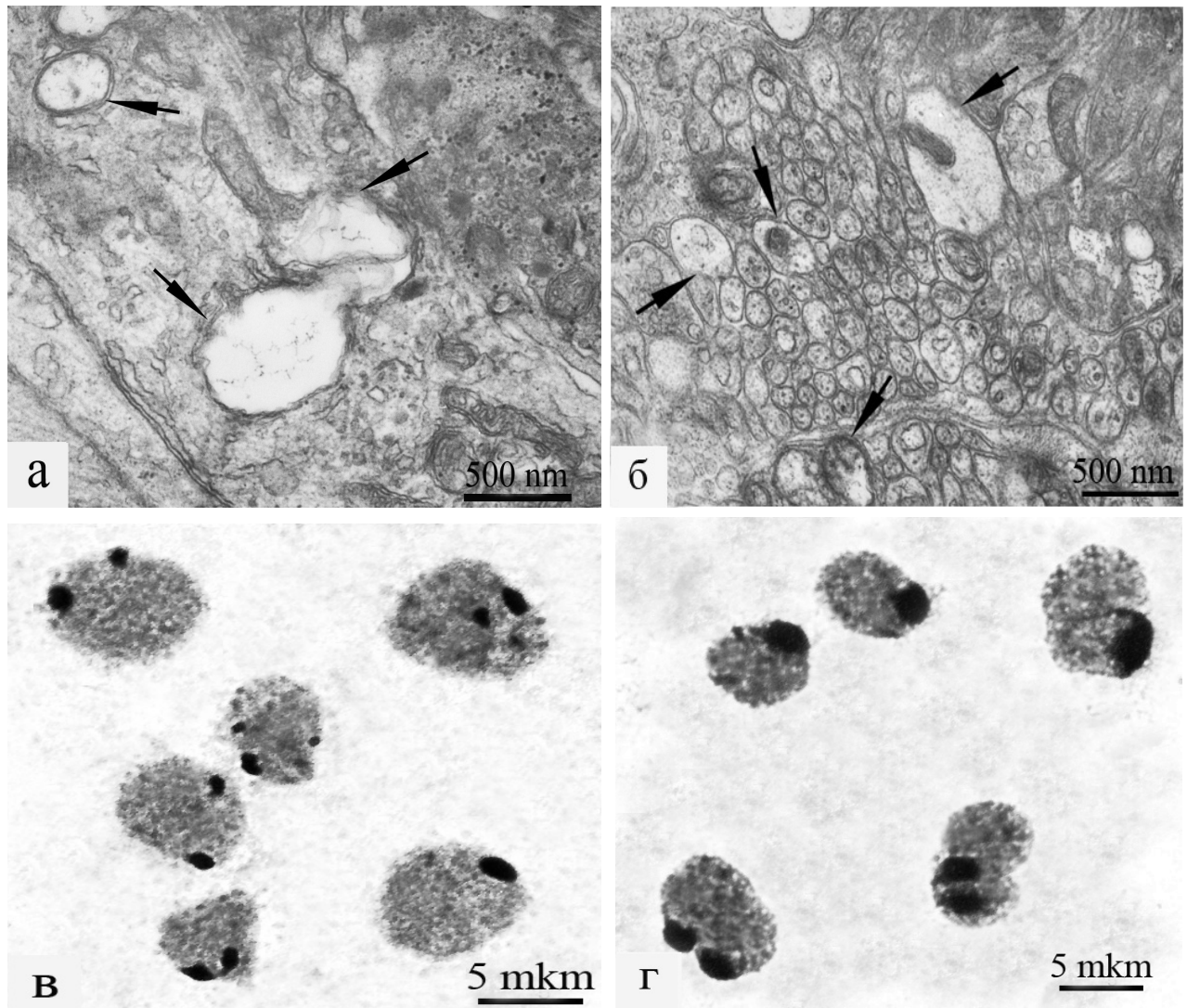


Рис. 2. Морфологические перестройки в обонятельном аппарате каменной широколобки (*Paracottus knerii*) (а, б) и жемчужного гурами (*Trichogaster leeri*) (в, г) в контроле и после продолжительной хемотимуляции гетерогенной смесью пептидов и аминокислот; а – эффект набухания митохондрий (показано стрелками) в дендрите хеморецепторного нейрона (эксперимент); б – избирательная дегенерация (показано стрелками) центральных отростков рецепторных клеток (эксперимент); в – базальные клетки обонятельного эпителия жемчужной гурами с низкими показателями ядрышкового индекса (контроль); г – базальные клетки жемчужной гурами с высокими значениями ядрышкового индекса (эксперимент)

Таким образом, показано, что содержание рыб в условиях длительной хемотимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов вызывает в периферическом отделе обонятельного анализатора ультраструктурные перестройки как рецепторных, так и глиальных клеток, часть из которых далее подвергается распаду.

В связи с выявленными фактами дегенеративных изменений клеток логичным было предположить, что в хеморецепторном эпителии опытных рыб могут быть активизированы также и компенсаторные процессы нейрогенеза. Как известно, образование новых (взамен

утраченных) клеток всегда имеет место в обонятельном аппарате животных и поддерживается за счёт митотической активности и дифференцировки локализованных здесь клеток – предшественников всех элементов эпителия [6; 8]. К настоящему времени установлено, что горизонтальные и шаровидные базальные клетки эпителия являются единственными мультипотентными прогениторами, из которых далее возникают как нервные, так и различные типы опорных клеток [4].

Для выявления уровня процессов нейрогенеза у контрольных и опытных рыб в качестве цитологического маркера мы использовали

морфологические параметры ядрышек клеток, относящихся к базальным отделам эпителия. Именно в этих участках реализуются процессы клеточного деления и дальнейшего развития новообразованных клеток. Известно, что ядрышки представляют собой структурное выражение активности рибосомных генов в интерфазных ядрах эукариотических клеток и увеличение их объёма является четким критерием возрастания их метаболизма при росте и дифференцировке [7]. В связи с этим, во второй серии экспериментов с помощью метода избирательной окраски ядрышек мы сравнивали степень их морфологического развития в ядрах базальных клеток у двух видов рыб (обыкновенный голянь и жемчужный гурами) в контроле и после длительной стимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов.

Проведённый цитологический анализ показал, что как в контроле, так и в эксперименте ядра малодифференцированных базальных клеток демонстрируют разную степень развития ядрышек. При этом у голяня ядрышковый индекс (I_{nj}) в этих клетках варьирует от $3,0 \pm 0,1$ % до $8,9 \pm 0,4$ %, а у гурами он находится в пределах от $4,6 \pm 0,2$ % до $11,5 \pm 0,6$ %. После хронического воздействия гетерогенной смесью аминокислот и пептидов в базальном эпителии у голяня и гурами происходит увеличение числа клеток с повышенной активностью, о чём свидетельствуют полученные данные. Так, у голяня в контроле среднее значение ядрышкового индекса в случайной выборке из 100 клеток составляет $3,9 \pm 0,5$ %, а в эксперименте оно достоверно ($p < 0,001$) возрастает до $5,5 \pm 0,9$ %. У гурами в контроле этот показатель в случайной выборке из 100 клеток равен $5,5 \pm 0,9$ %, а в эксперименте он достоверно ($p < 0,001$) увеличивается до $7,8 \pm 1,4$ % (рис. 2, в; г).

Исходя из полученных результатов, можно полагать, что возросшие значения ядрышкового индекса в клетках базальных слоев эпителия отражают существенное усиление происходящих в них процессов белкового синтеза. Это необходимо для обеспечения их роста и последующей дифференцировки в зрелые хеморецепторные и опорные клетки. Очевидно, что такая активация процессов нейрогенеза носит адаптивный характер и направлена на восстановление исходного количества клеток, необходимых для поддержания соответствующего уровня обонятельной рецепции.

Заключение

Наши эксперименты показывают, что процессы нейрогенеза в обонятельном эпителии животных могут быть активированы не только после аксотомии обонятельного нерва [14], механических или острых токсических воздействий [10; 11], но и после усиленных режимов воздействия химически нейтральными запаховыми стимулами.

Таким образом, с помощью электронно-микроскопических и светооптических методов установлено, что длительная хемостимуляция рыб нетоксичными водорастворимыми веществами вызывает не только избирательную дифференцировку и гибель отдельных клеток периферического отдела обонятельного анализатора, но и запускает компенсаторные процессы их нейрогенеза.

Работа поддержана проектом РФФИ № 11-04-01231-а

Литература

1. Баранов В. С. Метод стряхивания-отпечатывания – простой и надёжный способ приготвления прямых хромосомных препаратов из биоптатов хориона / В. С. Баранов // Цитология. – 1989. – Т. 31, № 2. – С. 251–253.
2. Косицын Н. С. Ультраструктурные перестройки рецепторных клеток обонятельного анализатора рыб в разные фазы репродуктивного поведения / Н. С. Косицын, И. В. Клименков // ДАН. – 1990. – Т. 311, № 3. – С. 739–742.
3. Косицын Н. С. Трансформация элементов цитоскелета рецепторных клеток обонятельного анализатора у рыб на разных этапах жизненного цикла / Н. С. Косицын, И. В. Клименков // ДАН. – 1994. – Т. 336, № 2. – С. 261–263.
4. Обухова Л. М. Роль базальных клеток обонятельного эпителия в нейрогенезе / Л. М. Обухова, И. И. Мухина // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 49–54.
5. Общие признаки стимул-зависимой дифференцировки обонятельных рецепторных нейронов и В-лимфоцитов иммунной системы / И. В. Клименков [и др.] // ДАН. – 2011. – Т. 436, № 2. – С. 273–275.
6. Graziadei P. P. Cell dynamics in the olfactory mucosa / P. P. Graziadei // Tissue Cell. – 1973. – Vol. 5. – P. 113–131.
7. Hadjiolov A. A. The nucleolus and ribosome biogenesis / A. A. Hadjiolov. – Wien, N. Y. : Springer-Verlag, 1985. – 268 p.
8. Harding J. Denervation in the primary olfactory pathway of mice. IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section / J. Harding [et al.] // Brain Res. – 1977. – Vol. 132. – P. 11–28.

9. Howell W. M. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions a protective colloidal developer: a 1-step method / W. M. Howell, D. A. Black // *Experientia*. – 1980. – Vol. 36. – P. 1014–1015.
10. Jang W. J. Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion / W. C. Jang, S. L. Youngentob, J. E. Schwob // *Comp. Neurol.* – 2003. – Vol. 460, N 1. – P. 123–140.
11. Leung C. T. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration / C. T. Leung, P. A. Coulombe, R. R. Reed // *Nat. Neurosci.* – 2007. – Vol. 10, N 6. – P. 720–726.
12. Li Z. Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques / Z. Li, D. Xing // *J. Exp. Bot.* – 2011. – Vol. 62, N 1. – P. 331–343.
13. Niimura Y. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods / Y. Niimura, M. Nei // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 6039–6044.
14. Samanen D. W. Replication and differentiation of olfactory receptor neurons following axotomy in the adult hamster: a morphometric analysis of postnatal neurogenesis / D. W. Samanen, W. B. Forbes // *J. Comp. Neurol.* – 1984. – Vol. 225, N 2. – P. 201–211.
15. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet / G. Loo [et al.] // *Cell Death Different.* – 2002. – Vol. 9. – P. 1031–1042.

Degenerate changes and neurogenesis in fish olfactory epithelium at their long hemostimulation

I. V. Klimenkov^{1,2}, A. V. Natyaganova¹, A. V. Kurylev³, M. V. Pastukhov⁴, N. P. Sudakov⁵, N. S. Kositsyn⁶

¹ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

² Irkutsk State University, Irkutsk

³ Regional State Center of Standardization, Metrology and Tests in Irkutsk Area, Irkutsk

⁴ Institute of Geochemistry SB RAS, Irkutsk

⁵ Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery ESSC SB RAMS, Irkutsk

⁶ Institute of Higher Nervous Activity & Neurophysiology RAS, Moscow

Abstract. Using electron and light optical microscopyc methods, we have demonstrated, that continuous chemostimulation of increased concentration of the nontoxic water soluble substances by fish (heterogenous mixture of peptides and amino acids) causes not only selective differentiation and apoptosis of particular cells from peripheral part of the olfactory analyzer, but also compensatory process of the cellular pool reconstruction through basal cells of epithelium.

Key words: chemoreception, olfactory cell, olfactory epithelium, cell degeneration, neurogenesis.

Клименков Игорь Викторович
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (395 2) 42–32–80, факс (395 2) 42–54–05
E-mail: iklimen@mail.ru

Натяганова Антонина Валентиновна
Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук
научный сотрудник
тел. (3952) 42–29–23
E-mail: avn61@mail.ru

Курьев Алексей Викторович
Региональный государственный центр
стандартизации, метрологии и испытаний
в Иркутской области Росстандарта
664011, г. Иркутск, ул. Чехова, 8
руководитель департамента
тел. (3952) 77–82–87, факс (3952) 24–26–33
E-mail: sdm_s57@mail.ru

Klimenkov Igor Viktorovitch
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph. D. in Biology, senior research scientist
Department of Cell Ultrastructure
phone: (395 2) 42–32–80, fax: (395 2) 42–54–05
E-mail: iklimen@mail.ru

Natyaganova Antonina Valentinovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology, research scientist

phone: (3952) 42–29–23
E-mail: avn61@mail.ru

Kurylev Aleksey Viktorovich
Regional State Center of Standartization,
Metrology and Tests
8 Chehov St., Irkutsk, 664011,
Head of department

phone: (395 2) 77–82–87, fax: (3952) 24–26–33
E-mail: sdm_s57@mail.ru

Пастухов Михаил Владимирович
Институт геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1 а
научный сотрудник
тел.: (3952) 51-14-42, факс: (3952) 42-66-00
E-mail: mpast@igc.irk.ru

Судаков Николай Петрович
Научный центр реконструктивной
и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН
664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
тел. (3952) 46-95-66, факс (3952) 46-95-66
E-mail: npsudakov@rambler.ru

Косицын Николай Степанович
Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии
174851, г. Москва, ул. Бултерова, 5 а
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
тел. (495) 334-70-50

Pastukhov Mikhail Vladimirovitch
Vinogradov Institute of Geochemistry SB RAS
1 a Favorsky St., Irkutsk, 664033
research scientist
phone: (3952) 51-14-42, fax: (3952) 42-66-00
E-mail: mpast@igc.irk.ru

Sudakov Nikolay Petrovitch
Scientific Center of Reconstructive
and Restorative Surgery of ESSC SB RAMS
100 Yubileiny, Irkutsk, 664079
Ph. D. in Biology, research scientist
phone: (3952) 46-95-66, fax: (3952) 46-95-66
E-mail: npsudakov@rambler.ru

Kositsyn Nikolay Stepanovitch
Institute of Higher Nervous Activity &
Neurophysiology RAS
5 a Butlerov St., Moscow, 174851
D. Sc. in Biology, Prof., Head of laboratory
phone: (495) 334-70-50