



УДК 611.86+812.86

Морфологические перестройки обонятельных рецепторных нейронов у рыб после их периодической стимуляции сахарозой

И. В. Клименков¹, Н. С. Косицын²

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

E-mail: iklimen@mail.ru

Аннотация. Статья посвящена исследованию адаптивных перестроек в обонятельном эпителии у рыб (*Barbus tetrazona tetrazona*, Bleeker) после их периодической стимуляции химическими агентами неферомональной природы. Предполагается, что хемочувствительные нейроны имеют аналогичные β -лимфоцитам иммунной системы механизмы дифференцировки: после фазы сенсibilизации они могут дифференцироваться в клетки секреторного типа, выделяя водорастворимые белки, специфичные к молекулам действующего вещества.

Ключевые слова: обонятельная клетка, β -лимфоцит, anosmia.

В последнее время в сенсорной нейрофизиологии возрастает актуальность вопросов, связанных с изучением фундаментальных основ адаптивного функционирования обонятельного анализатора в связи с его особой ролью у животных и человека при формировании пищевого, хемокommункативного и других сложных форм их поведения. В первую очередь, это касается изучения молекулярных и цитологических основ, которые обеспечивают хемочувствительность рецепторных клеток, являющихся разновидностью нервных клеток, специализированных для обеспечения первичных процессов хеморецепции очень широкого спектра молекул различной природы [8].

Ранее, используя природную модель естественного репродуктивного поведения эндемичных байкальских бычковых рыб (*Cottocomephorus grewingki*, Dyb) нами показано, что в период возрастания обонятельного восприятия половых феромонов в рецепторных нейронах наблюдаются морфологические признаки усиления хемочувствительности: активация ядерно-цитоплазматических взаимодействий, увеличение плотности свободных и связанных с каналами эндоплазматического ретикулума рибосом, появление хорошо структурированных микротрубочек. На следующем этапе нереста (по окончании интенсивной феромональной коммуникации) у самцов, приступающих к охране оплодотворенной икры, определенная часть рецепторных клеток теряет поверхност-

ный хемочувствительный аппарат (жгутики или микровиллы) и далее дифференцируется в клетки секреторного типа. У таких клеток в результате повышенной активности аппарата Гольджи дендритный отросток и видоизмененная вершина содержат большое количество везикул со светлым содержимым, которые встраиваются в поверхностную мембрану клетки и выделяют содержимое в обонятельную слизь [1; 2].

Впервые выявленный нами у рыб феномен трансформации рецепторных обонятельных клеток в клетки секреторного типа нуждается в дальнейшем изучении как в плане понимания механизмов, которые вызывают и обеспечивают этот процесс, так и в плане выяснения степени универсальности данного физиологического явления в рамках функционирования обонятельного эпителия у животных, принадлежащих разным систематическим группам.

Нами высказывалось предположение [2] о том, что связанная с обеспечением нереста динамика ультраструктурных перестроек обонятельных хеморецепторных клеток сходна с таковой у В-лимфоцитов иммунной системы в процессе их стимул-зависимой дифференцировки (как известно, β -клетки после стимуляции антигеном сенсibilизируются и далее могут трансформироваться в клетки, секретирующие специфичные к нему антитела [6]). Согласно нашим представлениям, активированные обонятельным раздражителем (антиге-

ном) рецепторные клетки на определенных этапах функционирования способны синтезировать не только рецепторные мембраносвязанные, но и водорастворимые белки, специфически связывающие данные химические агенты за пределами вершин чувствительных клеток. В соответствии с этой гипотезой, выявленные у бычковых рыб на завершающих этапах нереста видоизмененные чувствительные клетки с повышенным уровнем метаболизма и активной секрецией формируются из обонятельных клеток в результате их соответствующей химической (в данном случае феромональной) стимуляции. О феноменологическом сходстве механизмов функционирования обонятельных и иммунокомпетентных клеток говорят также и следующие факты: 1) мультигенность семейства генов, кодирующих молекулярные обонятельные рецепторы [5]; 2) моноспецифичность обонятельных клеток [7]; 3) способность рецепторных клеток существенно изменять уровень экспрессии генов, кодирующих хеморецепторы [9]; 4) свойственный для ольфакторных нейронов феномен альтернативного сплайсинга, который может сопровождать экспрессию генов [9].

Таким образом, на основании полученных нами морфологических данных, а также в связи с обсуждающимся в последнее время вопросом о возможности существования иммунных принципов функционирования обонятельных клеток [4] представляется актуальным на модельных объектах и произвольно выбранных неферомональных обонятельных стимулах экспериментально проверить принципиальную возможность стимул-зависимой дифференцировки обонятельных рецепторных клеток в клетки с повышенной хемочувствительностью и далее в клетки секреторного типа.

Материалы и методы

Экспериментальные работы проводились на аквариумной рыбке – суматранском барбусе (*Barbus tetrazona tetrazona*, Bleeker). В качестве произвольно выбранного обонятельного стимула неферомональной природы использовалась сахароза (мол. масса, 342 Д) в концентрации 10^{-9} М. Согласно предложенной нами гипотезе об иммуноподобных принципах морфофункциональной дифференцировки обонятельных рецепторных клеток необходимо было учитывать, что для стимул-зависимой трансформации В-лимфоцитов в плазматические клетки, секретирующие антитела, обычно требуются как минимум две разделенные во вре-

мени иммунизации животных. В связи с этим, экспериментальная группа животных подвергалась двухэтапному химическому воздействию: после двухнедельного содержания в чистой воде барбусы сначала двое суток выдерживались в растворе сахарозы, далее три недели содержались в чистой воде и на следующем этапе подвергались повторной аналогичной стимуляции в растворе сахарозы. В качестве контроля использовались животные, которые в течение месяца содержались в чистой воде.

Кормление рыб из обеих исследуемых групп осуществлялось обычным кормом один раз в сутки в специальном аквариуме с чистой водой. После произведенных экспериментов обонятельные розетки рыб фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида на 0,1М фосфатном буфере с последующей постфиксацией в 2%-ном растворе четырехоксида осмия и заливали в эпон. Срезы, полученные на ультрамикротоме «Ultracut R», («Leica», Австрия), контрастировали в цитрате свинца по Рейнольдсу и исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе Leo 906E («Zeiss», Германия).

Результаты и обсуждение

В обонятельном эпителии суматранского барбуса выявлены рецепторные клетки двух типов – жгутиковые и микровиллярные. Вершина жгутиковых клеток снабжена 4–5 ресничками, апикальный отдел у менее многочисленных микровиллярных клеток содержит либо несколько единичных, расширенных у основания отростков, либо несколько десятков более тонких, типичных для такого типа клеток, микровилл. Отличительной особенностью рецепторных клеток у барбусов контрольной группы является просветленный матрикс их цитоплазмы, хорошо выраженный на фоне более электроплотных опорных клеток. В приядерной зоне клеток обнаруживается слабо развитая сеть каналов местами фрагментированного шероховатого эндоплазматического ретикула с небольшим количеством связанных с ним рибосом. Аппарат Гольджи, как правило, занимает небольшую площадь и по ряду ультраструктурных признаков его функциональная активность незначительна.

Характерным признаком дендритного отростка обонятельных клеток рыб, длительно содержащихся в чистой воде, является наличие здесь редко встречающихся микротрубочек. Нам кажется, что более ограниченное представительство микротрубочек в теле хемочувстви-

тельных клеток у контрольных рыб является необходимым фактором поддержания их структурной целостности в период дефицита сенсорных сигналов. Кроме того, микротрубочки могут также отражать необходимый уровень готовности клеток к возможной последующей мобилизации их рецепторных свойств после соответствующей химической стимуляции. В целом, все выявленные нами вышеизложенные особенности ультраструктурной организации хеморецепторных клеток у барбусов, хронически содержащихся в чистой воде, свидетельствуют об их существенно пониженной функциональной активности в условиях отсутствия обонятельных раздражителей.

В сравнении с контролем, в экспериментальной группе после периодического выдерживания барбусов в растворе сахарозы в структуре определенной части обонятельных клеток выявлены существенные морфологические изменения. В таких клетках обнаруживаются признаки усиления ядерно-цитоплазматических взаимодействий: ядерная мембрана приобретает повышенную плотность пор (7–9 пор на 1 мкм^2), отчетливую структурированность гранулярного компонента приобретает ядрышко, которое обычно сближено с мембраной, как правило, в верхнем полюсе ядра. Характерной особенностью рецепторных клеток, периодически стимулированных раствором сахарозы, является хорошо развитый аппарат Гольджи. Обычно он занимает значительную площадь вблизи ядра и производит пузырьки со светлым содержимым диаметром 0,1–0,3 мкм. Несмотря на хорошо выраженную активность аппарата Гольджи, в большинстве исследованных нами метаболически активных хеморецепторных клетках такие пузырьки выявлялись только в непосредственной близости от производящей их органеллы. На всем протяжении дендрита между митохондриями располагаются пучки микротрубочек, достигающих базальных телец вершины клетки. Вышеизложенные морфологические особенности обонятельных клеток у опытной группы барбусов показывают высокий уровень их функциональной мобилизации после дозированной и периодической стимуляции раствором сахарозы.

На нашем материале в процессе детального изучения серийных срезов нейроэпителлия у каждой из экспериментальных рыб нами были обнаружены несколько клеток, которые содержали повышенное количество секреторных пузырьков. В исследованном обонятельном эпителии экспериментальных животных было вы-

явлено несколько морфологически отличных от контроля, редко встречающихся клеток с необычно высоким содержанием пузырьков, которые по ряду признаков мы можем отнести к обонятельным хемочувствительным нейронам, находящимся на той, или иной стадии стимул-зависимой дифференцировки. По совокупности морфологических признаков данные клетки можно считать чувствительными нейронами жгутикового типа, которые в результате воздействия однотипным обонятельным стимулом дифференцируются в клетки с секреторной функцией.

Заключение

На основании проведенных экспериментов с использованием ольфакторных стимулов неферомональной природы можно полагать, что наряду с другими механизмами, дифференцировка хемочувствительных клеток может также запускаться и самим обонятельным раздражителем после его комплементарного взаимодействия с молекулярными хеморецепторами, локализованными в мембранах моноспецифичных рецепторных клеток. Предполагается, что обонятельные нейроны в состоянии дендритной нейросекреции могут производить водорастворимую форму хеморецепторов, высокоспецифичных к молекулам действующего вещества, что может обеспечивать селективную аносмию животных, находящихся в условиях длительно действующих обонятельных раздражителей, характерных для очагов химических загрязнений. Такая специфическая аносмия может приводить к тому, что животные, сохраняя способность к пищевому и половому поведению, лишаются возможности различать токсические вещества в низких концентрациях, что может приводить к их интенсивному накоплению в организме и последующему переносу в другие трофические уровни.

Литература

1. Косицын Н. С. Ультраструктурные перестройки рецепторных клеток обонятельного анализатора рыб в разные фазы репродуктивного поведения / Н. С. Косицын, И. В. Клименков, Т. М. Дмитриева // ДАН СССР. – 1990. – Т. 113, № 3. – С. 739–741.
2. Косицын Н. С. Общность структурно-функциональных перестроек обонятельных рецепторных клеток и β -лимфоцитов иммунной системы / Н. С. Косицын, И. В. Клименков, А. В. Курылев // Морфология. – 1993. – Т. 105, вып. 7–8. – С. 35.
3. Косицын Н. С. Трансформация элементов цитоскелета рецепторных клеток обонятельного

анализатора у рыб на разных этапах жизненного цикла / Н. С. Косицын, И. В. Клименков // Докл. Академии наук. – 1994. – Т. 336, № 2. – С. 261–263.

4. Марков А. В. Гипотеза иммунологического тестирования партнеров – согласованность развития адаптаций и смены половых предпочтений / А. В. Марков, А. М. Куликов // Изв. РАН, Сер. биол. – 2006. – № 3. – С. 261–274.

5. Buck L. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition / L. Buck, R. Axel // Cell. – 1991. – Vol. 65. – P. 175–187.

6. Burnet F. M. The Clonal selection theory of acquired immunity / F. M. Burnet // The Abraham Flexner

Lectures, 1958. – Cambridge : Cambridge Univ. Press, 1959. – P. 49–80.

7. Chess A. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression / A. Chess [и др.] // Cell. – 1994. – Vol. 78. – P. 823–834;

8. Handbook of Olfaction and Gustation / Edited by Richard L. Doty. – Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2003. – 1121 p.

9. Young J. M. Odorant receptor expressed sequence tags demonstrate olfactory expression of over 400 genes, extensive alternate splicing and unequal expression levels / J. M. Young [et al.] // Genome Biol. – 2003. – Vol. 4, № 11. – P. R71.1–R71.15.

Morphological reorganizations olfactory neurons at fishes after their periodic stimulation by sucrose

I. V. Klimenkov¹, N. S. Kositzyn²

¹Institute of Limnology SB RAS, Irkutsk

²Institute of Higher Nervous Activity & Neurophysiology RAS, Moscow

Abstract. Article is devoted research of adaptive reorganizations in the olfactory analyzer at fishes (*Barbus tetrazona tetrazona*, Bleeker) after their periodic stimulation by non-pheromonal chemical agents. It is supposed that olfactory cells after chemical stimulation differentiates like the immune system β -lymphocytes: after sensibilisation period olfactory neurons differentiates into secretory cells producing odorant-binding proteins in the olfactory mucus.

Key words: olfactory cell, β -lymphocyte, anosmia.

Клименков Игорь Викторович
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник отдела
ультраструктуры клетки
664033, г. Иркутск, а/я. 278
тел. (395 2) 42–32–80, факс (395 2) 42–54–05
E-mail: iklimen@mail.ru

Klimenkov Igor Viktorovitch
Institute of Limnology SB RAS
664033, Irkutsk, 3, Ulan-Batorskaya St.
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

Косицын Николай Степанович
Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии
174851, г. Москва, ул. Бултерова, 5-а
доктор биологических наук, профессор
зав лабораторией ультраструктурных
и цитохимических основ условного рефлекса
тел. (495) 334–70–50

Kositzyn Nikolay Stepanovitch
Institute of Higher Nervous Activity &
Neurophysiology RAS
174851, Moscow, 5-a, Butlerova St.
D. Sc. in Biology, prof.
phone: (495) 334–70–50