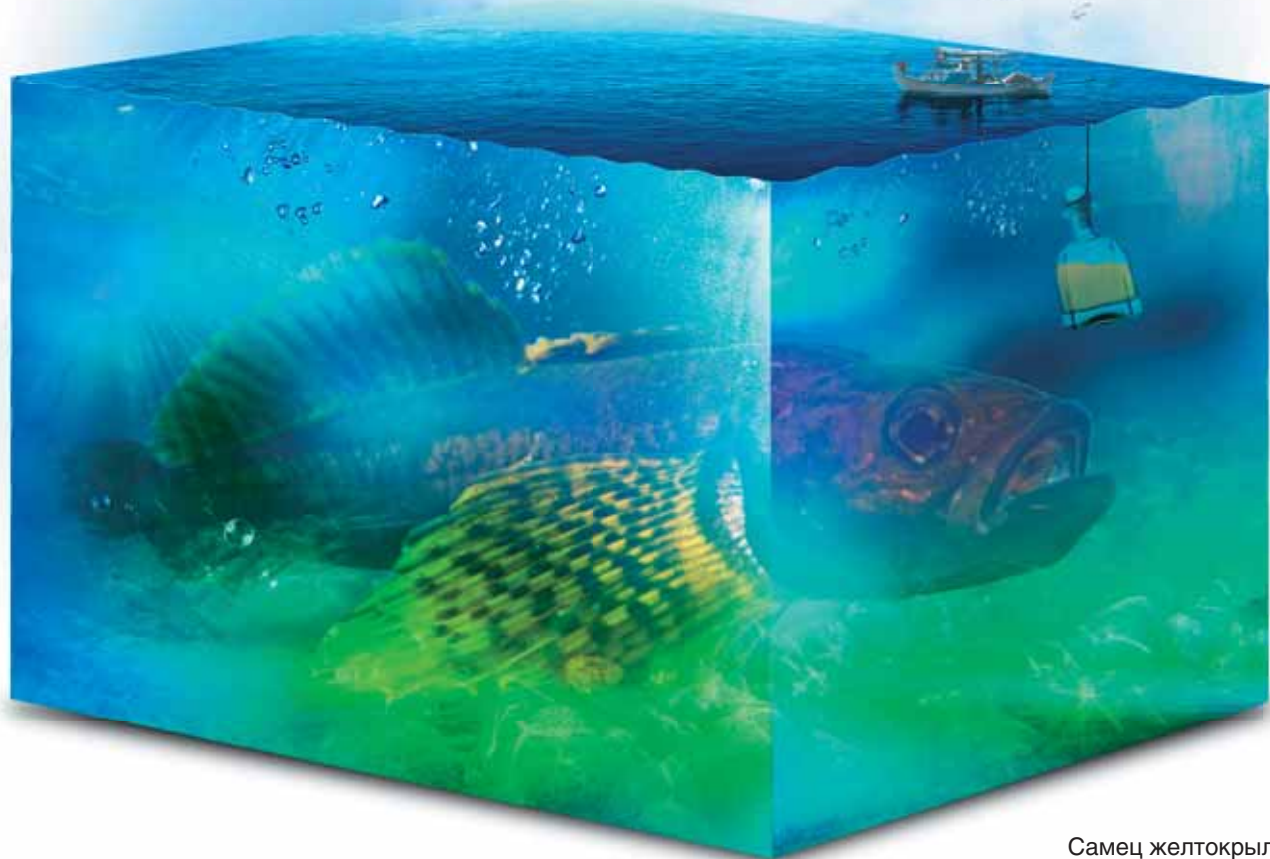


И. В. КЛИМЕНКОВ

ОТ ОБОНЯНИЯ РЫБ К ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

Нейробиологи, описывая способность нервных клеток к адаптации, используют уже укоренившееся в биологической литературе понятие «нейропластичность». Этот термин вовсе не означает, что нейроны способны изменяться как пластилин, перестраиваться они могут, но в определенных структурно-функциональных «рамках», за пределами которых клетка гибнет. Изучая нейропластичность, исследователи, с одной стороны, разгадывают загадки природы, а с другой – пытаются использовать это явление для решения человеческих, медицинских задач.



Самец желтокрылой широколобки (*C. grewingkii*) в брачном «наряде»

Ключевые слова: обоняние, запах, хеморецепторы, рецепторные белки, дендрит, нейросекреция, дендритная нейросекреция, желтокрылая широколобка, рыбы, Байкал.

Key words: olfaction, odor, chemoreceptors, receptor proteins, dendrite, neurosecretion, dendritic neurosecretion, yellowfin Baikal sculpin, fish, Baikal

© И. В. Клименков, 2016

Обоняние – древнейший орган чувств. Чувствительные к химическим веществам хеморецепторные клетки, с помощью которых мы чувствуем запахи, представляют собой биполярные нейроны. Это нервные клетки, имеющие, как и многие нейроны, один аксон – длинный отросток, направляющийся в мозг, и один дендрит – короткий отросток. Дендрит хеморецепторных клеток выступает во внешнюю среду своими чувствительными элементами – ресничками (жгутиками), в мембранах которых расположены мембраносвязанные рецепторные белки.

У многих животных хеморецепторные клетки достигли в процессе эволюции высочайшей специализации, фактически, физического предела «разрешающей способности» обонятельного аппарата и способны безошибочно идентифицировать отдельные молекулы и посылать информацию в мозг. Особенно важны химические сигналы, которые определяют пищевое, оборонительное и репродуктивное поведение, а недавно обнаружилось, что с помощью обоняния оцениваются и более «тонкие» биологические характеристики: социальный статус, физиологическое состояние и другие «персонифицированные» данные особей своего или чужого вида.

Но как эти нервные клетки приобретают такую высокую специализацию в процессе индивидуального развития? Каковы ресурсы надежности их работы? Эти вопросы важны не только для изучения сложного поведения животных, но и для решения некоторых медицинских задач, таких как борьба с болезнью Альцгеймера и проблемы трансплантологии.

Желтокрылые широколобки – половое поведение определяется запахом

Феномен нейропластичности предполагает как функциональные изменения клеток, так и структурные, которые можно увидеть под электронным микроскопом. Чтобы определить четкие морфологические, ультраструктурные критерии высокой или низкой чувствительности рецепторных клеток, нужна хорошая модель. Она была найдена при изучении хемокоммуникативного поведения одного из видов байкальских рыб – желтокрылых широколобок (*Cottocomephorus grewingkii*).

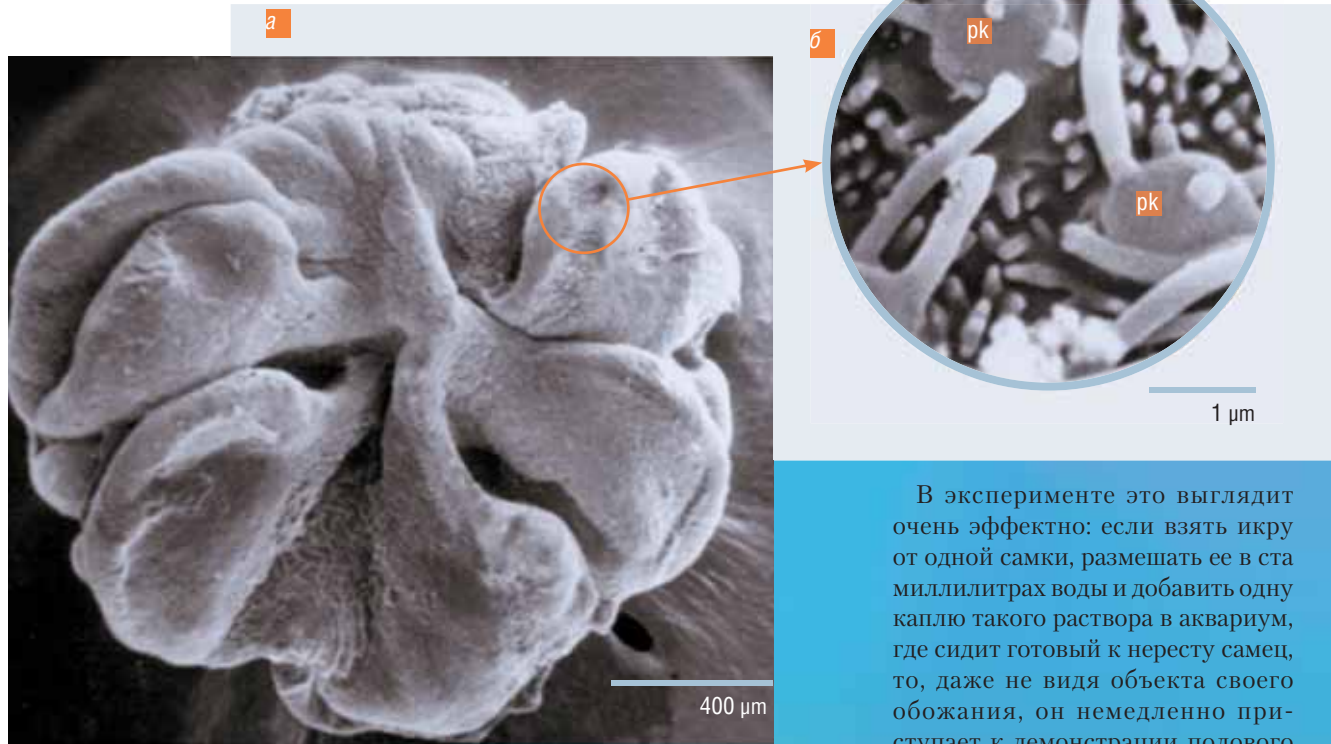
Оказалось, что при переходе к нересту самцы этих рыб приобретают очень высокую чувствительность к половому феромону самки. В яичнике самки зрелые икринки находятся в полостной (овариальной) жидкости, которая относительно долгое время поддерживает их в состоянии, готовом к оплодотворению. Овариальная жидкость богата биологически активными соединениями, которые называют феромонами – веществами, вызывающими определенные нейроэндокринные и поведенческие реакции у животного того же вида, что и особь, которая их выделяет.

Феромоны не только привлекают самца желтокрылых широколобок к самке, но и синхронизируют (с самкой!) созревание его половых продуктов. Более детальные исследования показали, что один из ключевых компонентов феромона самки – стероид 17-дигидроксипрогестерон, действует в очень низкой концентрации – всего 10^{-11} – 10^{-13} М.



КЛИМЕНКОВ Игорь Викторович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела ультраструктуры клетки Лимнологического института СО РАН (Иркутск), доцент Иркутского государственного университета. Автор и соавтор 60 научных работ

По материалам совместных исследований с к.б.н. Н.П. Судаковым (Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутский научный центр СО РАН, Иркутский государственный университет), н.с. А.В. Курьлевым (Иркутский государственный университет, Иркутск), к.б.н. М.В. Пастуховым (Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН, Иркутск) и д.б.н., проф. Н.П. Косицыным (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва).

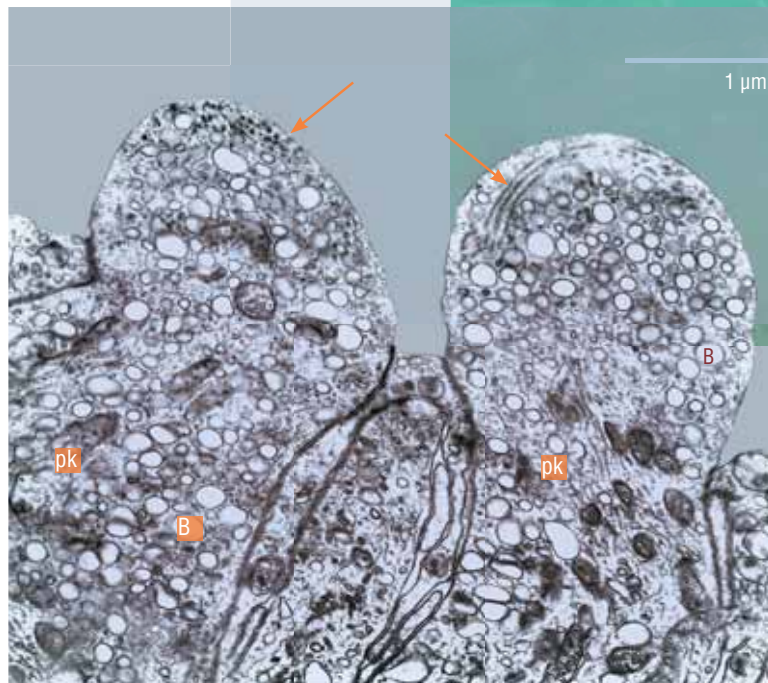


В отличие от человека, у рыб обонятельные клетки локализованы в специальном, похожем на цветок органе – обонятельной «розетке», собранной из 5–6 отдельных лепестков. На фото – обонятельная «розетка» желтокрылой широколобки (*C. grewingkii*); а – общий вид, б – увеличенный фрагмент эпителия с вершинами рецепторных клеток (рк) жгутикового типа. Электронная микроскопия

В эксперименте это выглядит очень эффектно: если взять икру от одной самки, размещать ее в ста миллилитрах воды и добавить одну каплю такого раствора в аквариум, где сидит готовый к нересту самец, то, даже не видя объекта своего обожания, он немедленно приступает к демонстрации полового поведения. Ведомый запахом, самец переворачивается и начинает мелко вибрировать телом, «вхолостую» выделяя половые продукты. Самки тоже активно реагируют на феромоны самца, которые он выделяет в воду с мочой.

То есть, достаточно совсем небольшой порции биологически значимых молекул, чтобы радикально изменить поведение рыбы. Характерно, что в этот период желтокрылки приобретают хорошо выраженный половой диморфизм. Голова самца становится угольно черной, а плавники – лимонно-желтыми: такая окраска помогает понравиться самкам и позволяет выдерживать жесткую конкуренцию

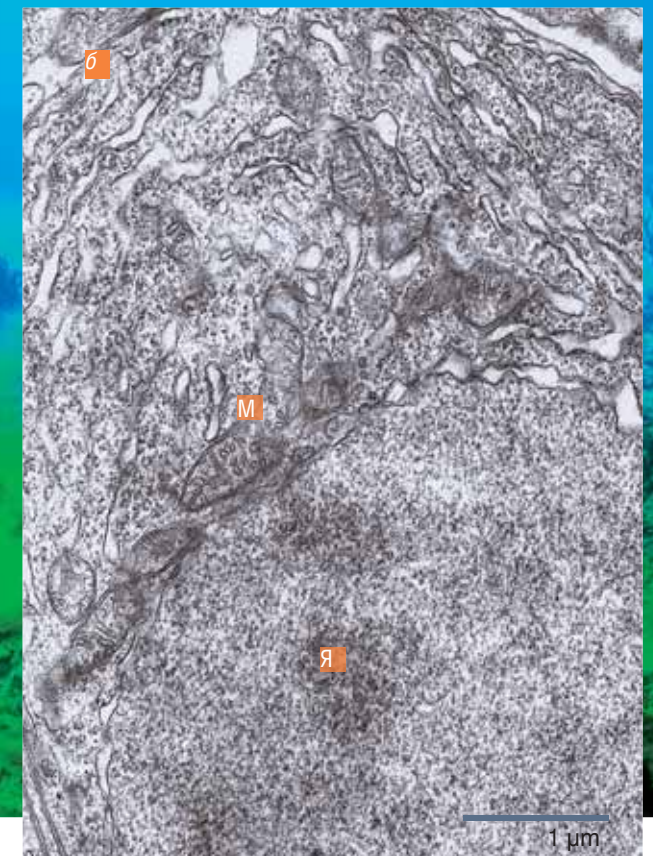
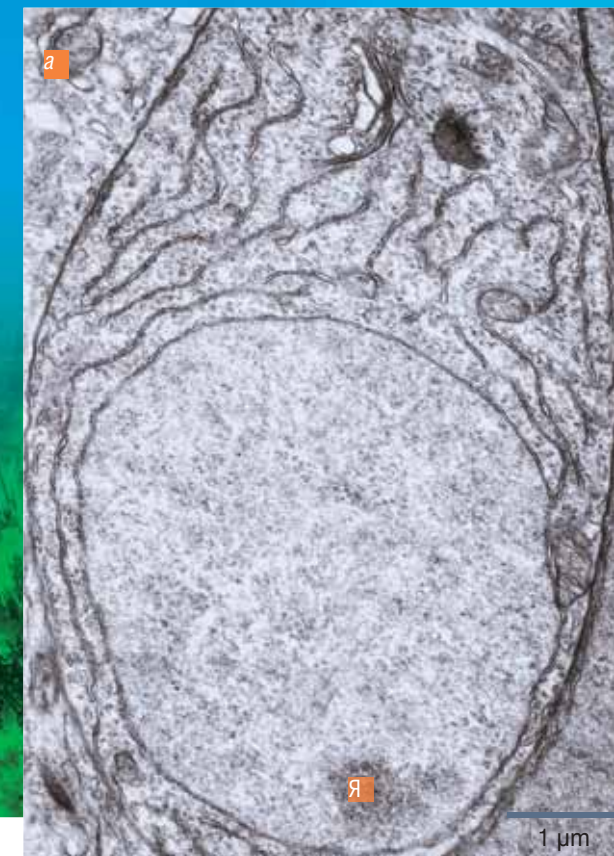
Рецепторные клетки (рк) желтокрылой широколобки в период нереста, в фазу дендритной нейросекреции. Реснички (отмечены стрелками) локализируются внутри дендритов. Видны многочисленные везикулы (В), которые транспортируются к вершине клетки, где встраиваются в мембрану, выделяя содержимое в обонятельную слизь



со стороны других претендентов на нее. Самки в этом отношении менее привлекательны – они, как это характерно для большинства видов рыб, во время нереста практически не изменяют окраску, т. е., для самца окраска полового партнера не имеет принципиального значения. Зато химические сигналы, исходящие от готовой к нересту самки, имеют первостепенную важность.

Таким образом, в репродуктивный период обонятельные клетки самцов желтокрылых широколобок каким-то образом перенастраиваются с восприятия пищевых сигналов, характерных для межнерестового сезона, на феромональные, без которых эти рыбы не могут размножаться.

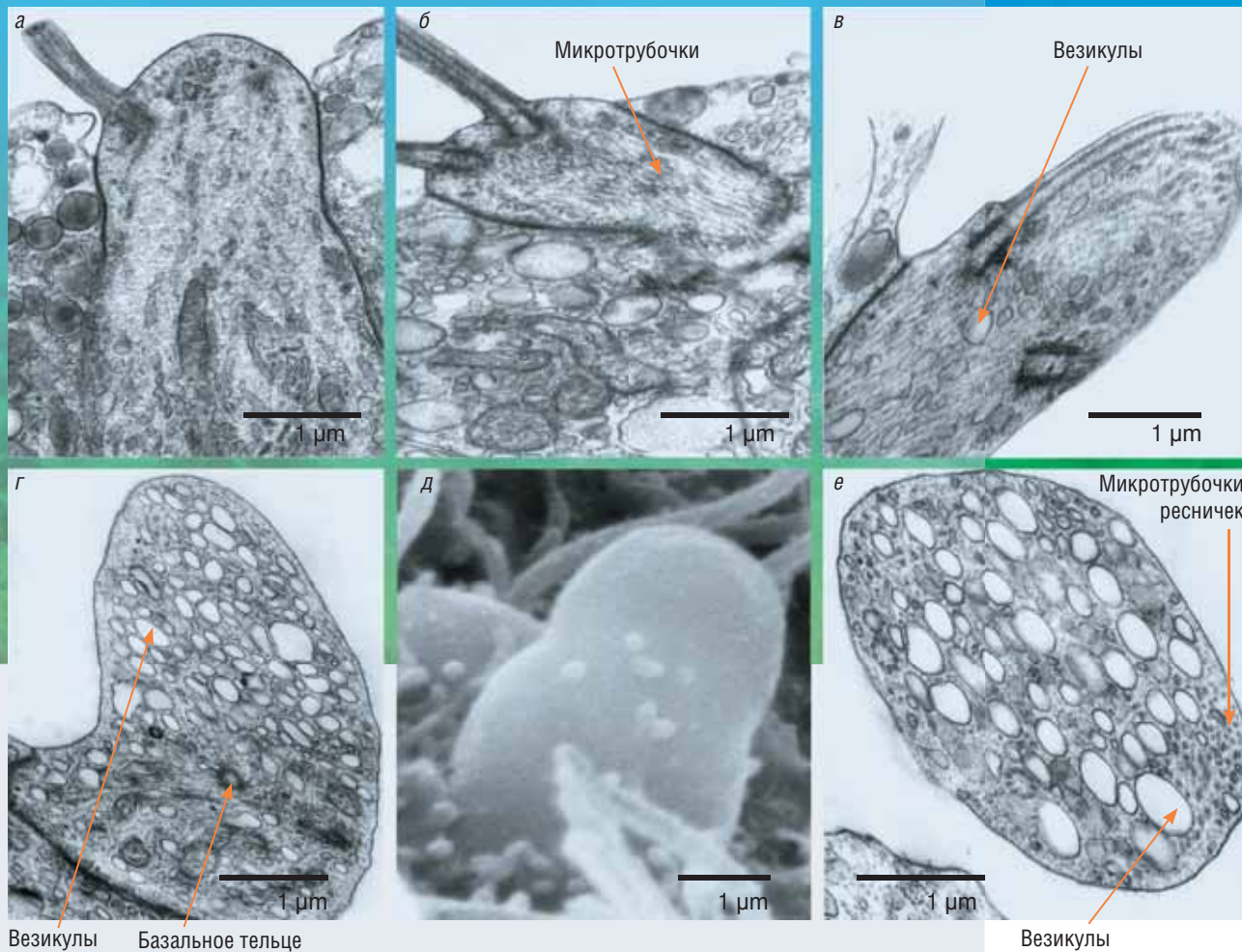
вблизи которых сосредотачиваются «энергетические станции» – митохондрии. Вследствие этого в цитоплазме возрастает и плотность рибосом – «молекулярных машин» для синтеза белка. В дендритах хеморецепторных клеток наблюдаются четко структурированные микротрубочки – элементы цитоскелета, транспортная система нейрона. Это важно, поскольку адаптивные изменения клеток должны сказываться на потребности в соответствующих ферментных системах, которые экстренно доставляются по микротрубочкам из тела клетки к рецептивному участку. Таким образом, мы обнаружили морфологические показатели, сопровожда-



Из обонятельных – в секреторные

Когда хеморецепторные клетки желтокрылых широколобок становятся чувствительными к феромонам, в них появляются ультраструктурные признаки возросшего метаболизма. Наблюдается усиление ядерно-цитоплазматических взаимодействий: активируется ядрышко, в ядерной мембране увеличивается плотность пор,

В сравнении с межнерестовым периодом (а) в репродуктивную фазу в обонятельных нейронах желтокрылой широколобки наблюдается активация ядерно-цитоплазматических взаимодействий (б). Я – ядрышко, где происходит синтез рибосом, обложено ядерной мембраной, которая приобретает повышенную плотность пор; М – митохондрии вплотную примыкают к ядерной мембране



ющие настройку обонятельных клеток на восприятие предельно низких концентраций химических агентов.

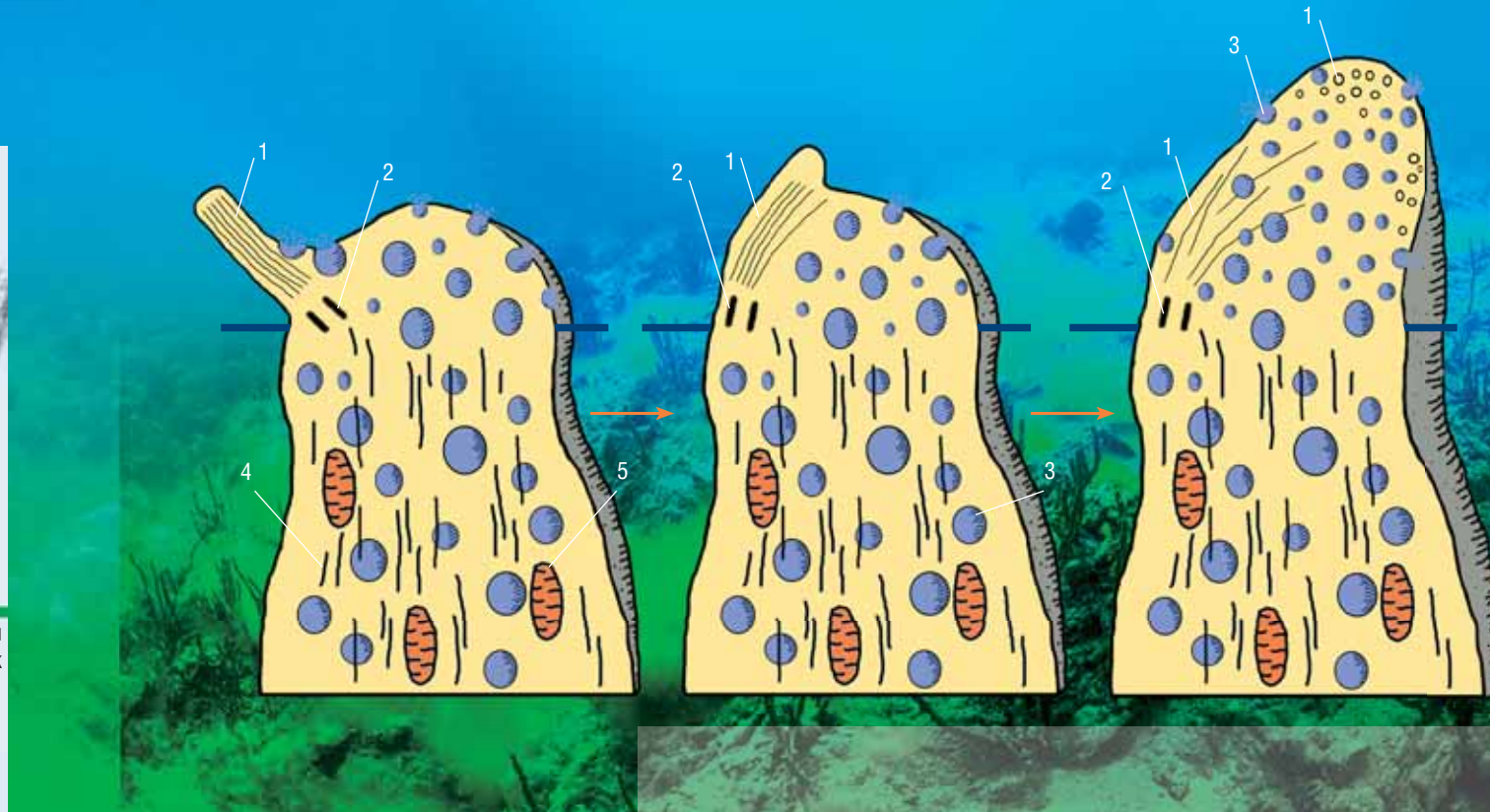
Надо признать, что эти структурные перестройки принципиально не отличаются от таковых у других нейронов центральной нервной системы, когда они находятся в режиме активной работы. Их обычно называют «реактивными свойствами нейрона», который при оптимальной функциональной нагрузке демонстрирует структурные признаки «напряжения» – адаптации к действующему раздражителю.

Но другие изменения оказались нетипичными для чувствительных клеток. При переходе самцов желтокрылок к родительскому поведению – охране икры – в некоторых рецепторных клетках на фоне усиленного белкового синтеза активизировался аппарат Гольджи – это система внутриклеточных мембранных структур, в которых созревают и накапливаются различные вещества, а затем транспортируются «по месту назначения». В клетках хорошо выявлялся направленный транспорт секреторных везикул к вершине клетки, где они встраивались в мембрану, выделяя содержимое в обонятельную слизь.

Ультраструктурные перестройки вершин рецепторных клеток желтокрылой широколобки в разные фазы жизненного цикла и репродуктивного поведения:

- а – межнерестовый период, клетка функционирует как обычная хеморецепторная клетка, воспринимающая пищевые сигналы;
- б – нерест, клетка перенастраивается на восприятие феромонов, при этом появляется упорядоченная система микротрубочек;
- в – ресничка погружена внутрь дендрита;
- г – вершина клетки в фазу дендритной нейросекреции. Базальное тельце – структура, от которой отходит ресничка, здесь оно прикрито большим количеством секреторных пузырьков;
- д – так выглядит вершина клетки без жгутиков;
- е – дезагрегация микротрубочек, погруженных внутрь клетки в процессе ее гибели после активного секреторного процесса.

Электронная микроскопия



В процессе описанной трансформации хеморецепторные клетки теряют свой поверхностный рецепторный аппарат – чувствительные реснички. Их опорный цитоскелет погружается в вершину дендрита, и у клетки, по-видимому, исчезает способность к хеморецепции. То есть, клетки перестают быть обонятельными – вместо этого они становятся секреторными!

В традиционные представления о функциональном предназначении обонятельных нейронов это не вписывается. Начиная с самых ранних работ (Schultze *et al.*, 1856) и до настоящего времени считается общепризнанным положение о том, что вершина хеморецепторной клетки всегда специализирована *только* для обеспечения хеморецепции. Кроме того, хорошо известно, что нейросекреция в любой нервной клетке, за некоторым исключением, осуществляется через аксон, который и передает информацию другой клетке, а не через дендрит.

Правда в ряде работ описывались отдельные элементы морфологических изменений, которые, судя

Схематическое изображение последовательных этапов структурной реорганизации вершины хеморецепторной клетки желтокрылой широколобки при ее переключении на режим дендритной нейросекреции: 1 – микротрубочки ресничек; 2 – базальное тельце; 3 – секреторные пузырьки; 4 – микротрубочки дендрита; 5 – митохондрии

ПОДОБНЫЕ ИММУННЫМ

Интересно, что динамика изменений, происходящих с хеморецепторными клетками под действием одорантного раздражителя, очень похожа на динамику изменений В-лимфоцитов иммунной системы в процессе их ответа на иммунный стимул. Это совсем не удивительно, поскольку и иммунная, и обонятельная системы решают одну и ту же задачу, связанную с распознаванием чужеродных молекул – антигенов.

О возможности существования иммунных принципов функционирования обонятельных клеток свидетельствует ряд важных свойств. Как и лимфоциты, обонятельные клетки моноспецифичны и имеют большое разнообразие (полиморфизм) генов, кодирующих одорант-связывающие рецепторы (Buck, Axel, 1991). К этому можно добавить еще два важных факта, полученных совсем недавно. Анализ генома человека показал, что промоторы (место начала синтеза цепи РНК) контролирующие экспрессию генов обонятельных рецепторов и белков главного комплекса гистосовместимости, также обладают очень высоким точечным полиморфизмом (Игнатъева и др., 2014). И еще одно неожиданное обстоятельство, которое говорит о пока малоизвестном эволюционном параллелизме обонятельной и иммунной систем: в прошлом году немецкие ученые обнаружили обонятельные и вкусовые рецепторы в мембранах иммунных клеток (Malki *et al.*, 2015).

В сравнении с донерестовым периодом (а), у желтокрылой широколобки во время репродукции существенно усилена дыхательная активность митохондрий (б). Окраска на ядерный материал (DAPI, синий) и митохондрии (MitoTracker® Orange); 3D-реконструкции; конфокальная микроскопия

Мы предположили, что протестимულიрованные хеморецепторные нейроны начинают производить не мембраносвязанную, а водорастворимую форму белков (Klimenkov *et al.*, 2014), которые связывают молекулы одоранта непосредственно в обонятельной слизи, обеспечивая адаптивную потерю обоняния – если рыба долго находится под воздействием запаха, она перестает его чувствовать.

Несмотря на привлекательность этой гипотезы, остается неясным, могут ли клетки переключаться с синтеза мембраносвязанной формы рецепторных белков на синтез секреторируемой формы с сохранением их специфичности, так как пока не известны механизмы, позволяющие собирать водорастворимую форму рецепторов. Возможно, в процессе дендритной нейросекреции нейроны переключаются на синтез каких-то других белков или коротких нейропептидов. Такая трактовка дает почву для развития «олигогенной» гипотезы кодирования рецепторных белков, согласно которой обонятельные клетки на разных этапах своего развития могут экспрессировать не один, а несколько генов, кодирующих рецепторы к одорантам (Mombaerts, 2004).

Нужно отметить, что морфологически обонятельные клетки с дендритной нейросекрецией сходны с нейросекреторными клетками гипоталамуса, которые «профессионально» синтезируют и выделяют вещества различной химической природы, участвующие

по всему, говорят о реорганизации обонятельных клеток в режим дендритной нейросекреции. Ключевые элементы таких перестроек – пузырьки со светлым содержимым в разных количествах – встречались в дендритах и вершинах рецепторных клеток у многих животных и даже у человека. Но в этих исследованиях не обнаруживалось существенного увеличения секреторной функции аппарата Гольджи, которое бы сопровождалось значительными перестройками вершины клетки. Поэтому обнаруженные в обонятельных клетках пузырьки до сих пор, к сожалению, не привлекали к себе большого внимания.

Не только во время нереста

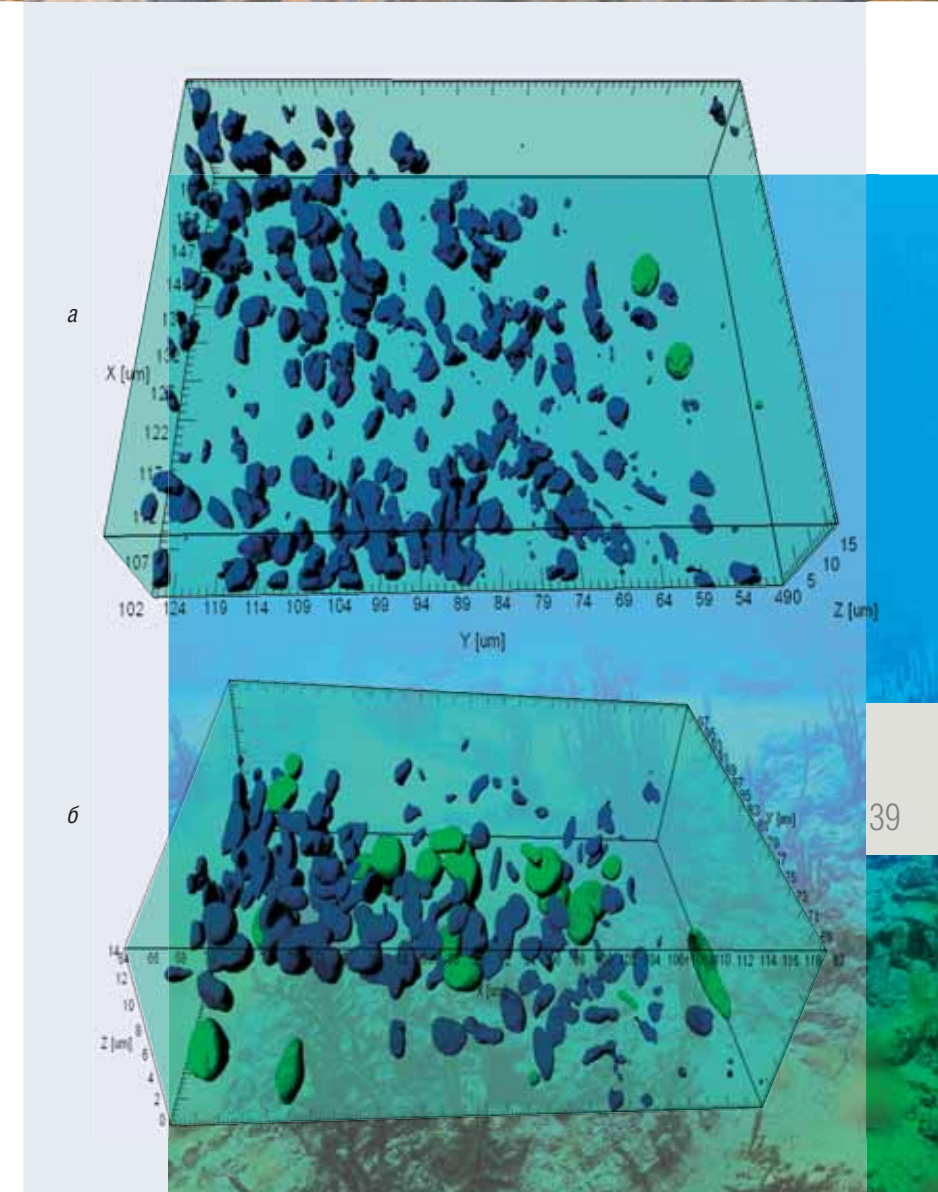
Дендритная нейросекреция происходит у рыб не только в нерестовый период. Сходные ультраструктурные перестройки обонятельных клеток наблюдаются, если рыбу подвергнуть длительному одорантному воздействию (воздействию запахом) нетоксичных водорастворимых веществ – мы использовали смесь аминокислот и пептидов.

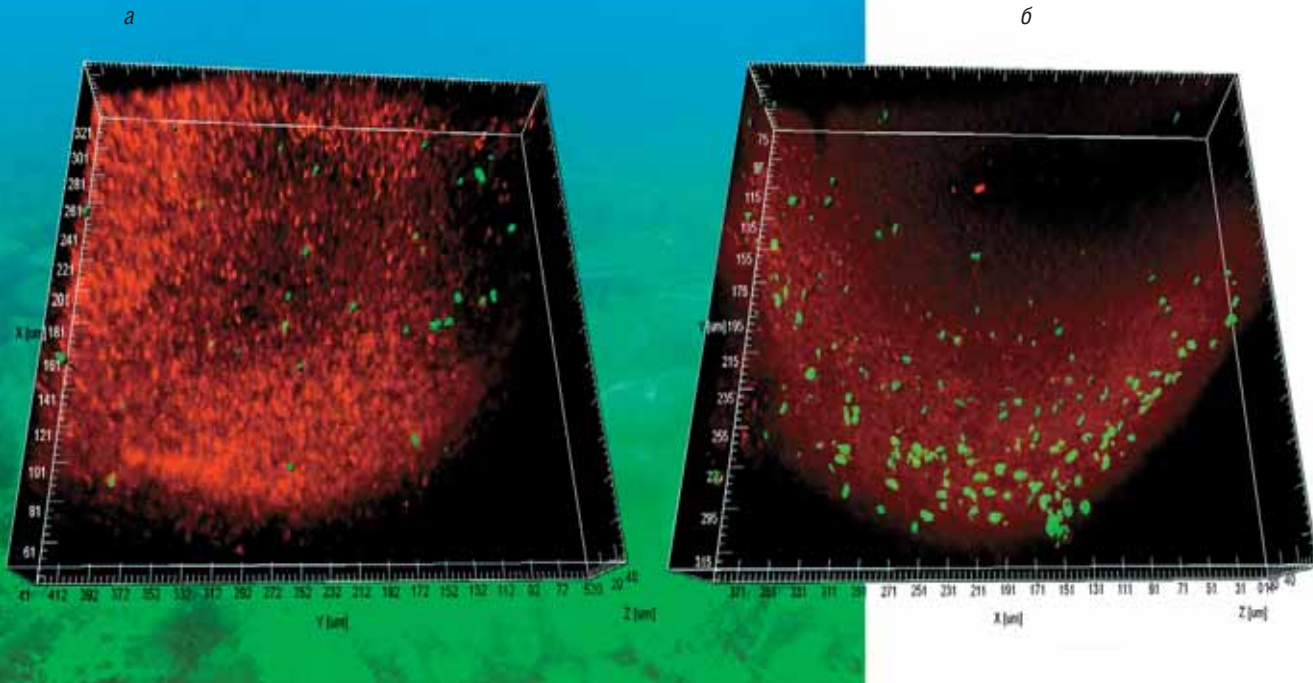


Большая широколобка (*Procottus major* Taliev, 1949)

В сравнении с контролем (а), после продолжительной хемостимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов в обонятельном эпителии у жемчужного гурами (*T. leeri*) наблюдается усиление процессов программируемой клеточной гибели (б). Метод Click-IT® TUNEL; ядра погибших клеток окрашены Alexa Fluor (зеленый); жизнеспособные – Hoechst (синий); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции

щие в обработке информации и в обеспечении нейропластичности. Наряду с аминокислотами и моноаминами сейчас в качестве таких веществ признаются нейропептиды, выделяемые как аксонами, так и дендритами нервных клеток (Leng, Ludwig, 2008). Нейропептиды могут действовать не только в области синапсов. Период полураспада у них продолжительный, они диффундируют в межклеточное пространство и могут влиять на более удаленные мишени (Son *et al.*, 2013). Поэтому, кроме быстродействующих нейромедиаторов, нейропептиды рассматриваются как одно из важных средств химической коммуникации в мозге. Так что феномен дендритной нейросекреции, характерный для некоторых типов клеток центральной нерв-





ной системы, вероятно, не является экстраординарным свойством и для обонятельных нейронов.

Компенсаторный нейрогенез и медицина

В процессе экспериментов выяснилось, что в ходе длительного воздействия запахом часть обонятельных клеток претерпевает нейродегенеративные изменения и погибает. Перед этим в таких клетках страдают митохондрии, усиливается образование свободных радикалов, что бывает при развитии патологических процессов. Приходится делать парадоксальный вывод: даже совершенно безобидные пахучие вещества, действующие в избытке, воздействуют на клетку как фактор стресса.

Мы предположили, что в таких условиях в чувствительном эпителии должны развиваться компенсаторные процессы нейрогенеза. И действительно, у экспериментальных рыб интенсивность пролиферативной активности была в 2,6 раза выше, чем в контрольной группе. То есть, образование новых клеток в сенсорном аппарате животных может активироваться не только после перерезки обонятельного нерва, механических или острых токсических воздействий, как это предполагалось, но и в ходе усиленной стимуляции запахом и последующих дегенеративных изменений.

Это явление очень важно с практической точки зрения. Сейчас остро стоит вопрос об источниках малодифференцированных нейтральных клеток, которые можно было бы культивировать и использовать как биологический «клей» для лечения травматических

Отдельные складки обонятельного эпителия у каменной широколобки (*Paracottus knerii*) в контроле (а) и после продолжительного воздействия гетерогенной смесью аминокислот и пептидов (б). Избирательная окраска ядер митотически активных клеток с помощью антител, меченых FITC к бромдезоксигуанидину (зеленый). Неделющиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции

повреждений нервной системы. Важнейшее требование к такому «клею» – генетическая совместимость с клетками человека, который нуждается в помощи. Решение задачи сопряжено со многими трудностями, включая проблемы этического характера. Возможно, байкальские широколобки смогут дать интересный материал не только в плане познания их биологии и механизмов приспособления к действию химических факторов среды, но и в плане использования полученных знаний для решения некоторых проблем восстановительной медицины. Обонятельный эпителий – единственный доступный источник аутологических малодифференцированных нейтральных клеток, которые можно использовать для трансплантации, для лечения заболеваний нервной системы (Викторов, 2006).

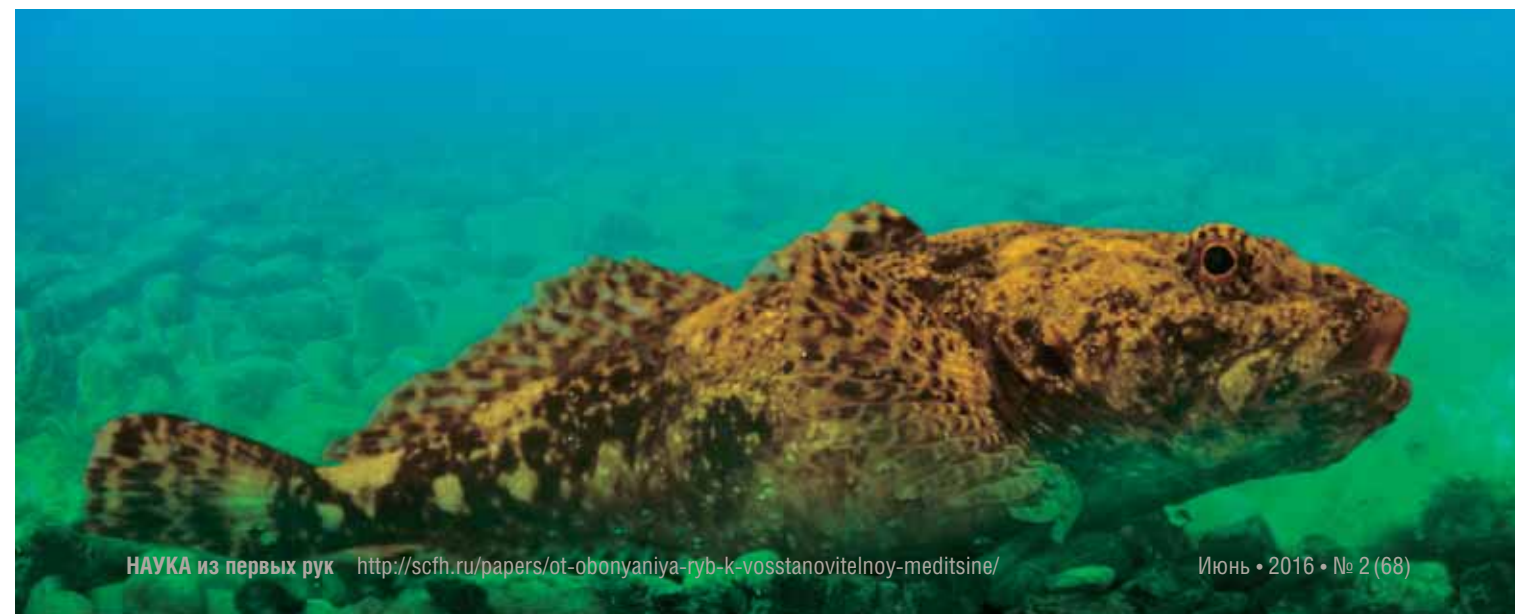
Теоретическая основа для этого есть: структурно-функциональные свойства обонятельного эпителия у рыб и человека принципиально ничем не отличаются, и нужно провести исследования на млекопитающих. Одорантную обработку эпителия лучше производить одорантом, находящимся в водорастворимой, а не летучей форме, вводя раствор в полость носа. Таким способом нейроны должны лучше активироваться и, соот-

ветственно, интенсивнее деградировать с последующей компенсаторной активацией деления стволовых клеток и формированием пула малодифференцированных нейтральных клеток, имеющих потенциал для использования в медицине. С практической точки зрения, взятие такой биопсии – несложная задача.

Другой аспект состоит в том, что обонятельная система вовлечена в развитие ряда социально значимых нейродегенеративных заболеваний – это болезнь Альцгеймера, паркинсонизм и некоторые другие. Известно, что деменция (нарушение высших функций мозга), как правило, с возрастом, сопровождается снижением количества хемочувствительных клеток и обонятельной дисфункцией. Если мы научимся неинвазивно стимулировать нейрогенез на уровне периферического отдела обонятельного анализатора, то количество утраченных клеток хотя бы частично может быть восполнено. Нельзя исключать того, что возросший сенсорный приток запахов каким-то образом сможет положительно воздействовать на центральные структуры мозга, с которыми связаны обонятельные клетки. Можно даже предположить, что именно этот феномен лежит в основе лечебного воздействия ароматерапии, зародившейся много веков назад в странах Востока.

В заключение хочется привести слова нашего коллеги, крупного специалиста в области нейробиологии, профессора Н. С. Косицына (Институт ВНД и НФ, Москва): «В этих исследованиях Байкал выступает даже не как уникальное, богатое эндемиками озеро, а как «метод», методологический подход, который дает нам естественные модели, на которых можно изучать сложные вопросы не только биологии, но и медицины».

Самец большеголовой широколобки (*Batrachocottus baicalensis* Dybowski, 1874)



Литература

- Викторов И. В., Савченко Е. А., Ухова О. В. и др. Мультипотентные стволовые и прогениторные клетки обонятельного эпителия // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2006. № 4. С. 185–19.
- Buck L., Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition // *Cell*. 1991. V. 65, N 1. P. 175–187.
- Ignatieva E. V., Levitsky V. G., Yudin N. S. et al. Genetic basis of olfactory cognition: extremely high level of DNA sequence polymorphism in promoter regions of the human olfactory receptor genes revealed using the 1000 Genomes Project dataset // *Front Psychol*. 2014. V. 5. Article 247. Published online.
- Klimenkov I. V., Kurylev A. V., Kositsyn N. S. et al. Olfactory Receptor Cells' Dendritic Neurosecretion Phenomenon // *World neurosurgery*. 2015. V. 83, N 3. P. 278–279.
- Leng G., Ludwig M. Neurotransmitters and peptides: whispered secrets and public announcements // *J. Physiol*. 2008. V. 586, N 23. P. 5625–5632.
- Malki A., Fiedler J., Fricke K. et al. Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes // *J. Leukoc. Biol*. 2015. V. 97, N 3. P. 533–545.
- Mombaerts P. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited // *Curr. Opin. Neurobiol*. 2004. V. 14, N 1. P 31–36.
- Schultze M. *Über die Endigungsweise des Geruchsnerven und der Epithelialgebilde des Nasenschleimhaut* // *Monatsber Deut Akad. Wiss. Berlin*. 1956. Bd. 21. S. 504–514.
- Son S. J., Filosa J. A., Potapenko E. S. et al. Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks // *Neuron*. 2013. V. 78, N 6. P. 1036–1049.