

ИЗМЕНЕНИЕ НАПРЯЖЕНИЯ КИСЛОРОДА В ОБОНЯТЕЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ КРЫСЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОДОРАНТОВ

© 2019 г. Е.В. Бигдай, Е.А. Безгачева, Е.П. Вовенко, В.О. Самойлов

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6*

E-mail: bigday50@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2019 г.

После доработки 16.04.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Представлены данные по изучению кислородного снабжения обонятельных клеток, необходимого для осуществления химической и механической трансдукций, компоненты которых локализируются в мембране обонятельных жгутиков, расположенных в слое обонятельной слизи. Исследования проводили на изолированном обонятельном эпителии самцов крыс линии Вистар без признаков ринита. Напряжение кислорода (pO_2) в обонятельной слизи измеряли микрополярографическим методом до действия смесью пахучих веществ из *n*-бутанола и амилового спирта и при ее стимуляции. Результаты показали, что в обонятельном эпителии существует почти четырехкратная разница напряжения кислорода между слизью и орошающим раствором, что может свидетельствовать об интенсивном диффузионном потоке кислорода в обонятельную слизь. Показано, что под действием одорантов pO_2 в слизи падает с $43,1 \pm 1,8$ мм рт. ст. до $35,9 \pm 1,8$ мм рт. ст. ($n = 53$). Снабжение химической и механической функции обонятельных жгутиков кислородом из обонятельной слизи может являться предпосылкой для высокой чувствительности и быстрой кинетики процессов обонятельной трансдукции.

Ключевые слова: обоняние, обонятельный эпителий, кислородные микроэлектроды, напряжение кислорода, одоранты.

DOI: 10.1134/S0006302919040173

Поддержание целостности живой структуры и выполнение любых видов полезной работы отдельных клеток, включая обонятельные, требует больших энергетических затрат. Потребление кислорода в обонятельном эпителии нуждается в количественной оценке в покое и при ольфакторной активности.

В опытах на амфибиях ранее нами было показано, что восприятие запахов сопровождается активацией клеточного дыхания [1]. Активность обонятельных клеток в значительной степени зависит от митохондриального окислительного метаболизма для удовлетворения связанных с этим потребностей в энергии. Между тем жгутики выполняют двойную сенсорную функцию, химическую и механическую [2], внося вклад в высокую чувствительность обонятельного анализатора. Обе эти функции нуждаются в достаточном обеспечении кислородом. Надо отметить, что для их механической активности энергия требуется как в отсутствие пахучего стимула, так и при его воздействии [3]. Однако исследований снабжения кислородом периферического отдела обонятельного анализатора нам найти не удалось.

В настоящее время используются различные методы для оценки потребления O_2 различными тканями, в том числе и центральными отделами обонятельного анализатора. Так, методом двухфотонной флуоресцентной прижизненной микроскопии картировали физиологические значения напряжения кислорода (pO_2) в покое у бодрствующих нестрессуемых мышей в двух областях мозга – в гломерулярном слое обонятельной луковицы и в соматосенсорной коре. Были установлены величины pO_2 в различных отделах обонятельного анализатора, кроме периферического [4].

Следует отметить некоторые особенности, связанные с доставкой кислорода к обонятельным клеткам. Известно, что транспорт газов в тканях осуществляется по механизму диффузии. Движущей силой этого транспорта является градиент напряжения O_2 между кровью капилляров и интерстицием. Напряжение кислорода влияет на диффузию, и пространственные различия pO_2 устанавливаются диффузионные градиенты, кото-

рые являются неотъемлемой частью транспорта газа в теле [5].

В составе обонятельной слизистой оболочки различают три основных компонента — эпителий, базальную мембрану и собственную пластинку слизистой оболочки, содержащую слизистые и серозные клетки, нервные пучки, пигментные клетки, лимфоидные клетки и кровеносные капилляры. Под эпителием лежит базальная пластинка (или базальная мембрана). Она обычно является четко определяемой однородной структурой [6].

Таким образом, в обонятельном эпителии кровеносные сосуды снабжают кровью базальную часть обонятельной выстилки, тогда как все процессы восприятия запаха осуществляются на апикальной поверхности в обонятельных жгутиках, которые погружены в обонятельную слизь. Сюда же обращены и булавы дендритов обонятельных клеток, которые увенчаны обонятельными жгутиками. Именно в булавах локализируются митохондрии, снабжающие процесс обонятельной трансдукции молекулами АТФ [7]. Булава содержит приблизительно две митохондрии; если предположить, что концентрация АТФ в жгутике составляет 1 мМ и скорость диффузии вдоль жгутика равна 10 мкм за 500 мс, то АТФ из митохондрий булавы не может обеспечивать энергетические нужды трансдукции, а также двигательную активность обонятельных жгутиков по всей их длине, что предполагает наличие дополнительного источника АТФ.

Таким источником является глюкоза в обонятельной слизи, концентрация которой здесь достигает 1 мМ. Кроме того, в жгутиках обонятельных нейронов и микровиллах опорных клеток крыс и жаб (*Caudiverbera caudiverbera*) локализуется переносчик глюкозы GLUT3, а в жгутиках крыс — и гликолитические ферменты. Удаление глюкозы и ингибирование гликолиза или окислительного фосфорилирования ослабляют реакцию на запах. Это свидетельствует о том, что гликолиз в жгутике и окислительное фосфорилирование в булаве вместе снабжают топливом хемо- и механотрансдукцию [8]. Таким образом, трансдукция запаха и механическая активность обонятельных жгутиков обеспечиваются АТФ, синтез которого связан с окислительным фосфорилированием в дендрите и гликолизом в жгутиках с использованием глюкозы, усваиваемой из слизи. Вероятно, именно так создаются условия для осуществления быстрой реакции и высокой чувствительности к обонятельному стимулу.

В таком случае время доставки кислорода к местам его потребления короче из обонятельной слизи, а не из капилляров, откуда кислороду у млекопитающих необходимо преодолеть расстояние порядка 150–300 мкм. При введении поля-

рографического электрода в мозг показано, что pO_2 в артериолах падает в два раза на расстоянии в 100 мкм от сосудов. Следовательно, от капилляров до обонятельных жгутиков оно может упасть в шесть раз, а по мнению авторов, для предотвращения гипоксии при постоянном увеличении активности нейронов требуется общее устойчивое увеличение оксигенации ткани, чего может не хватать при поступлении O_2 к обонятельным жгутикам из капилляров [9].

Одним из методов оценки скорости потребления кислорода тканями является полярографический метод, который использовали для оценки pO_2 в различных тканях. Однако транспорт O_2 к обонятельным клеткам до сих пор не изучен, хотя важно знать не только стационарный уровень его потребления как обонятельными клетками, так и собственной пластинкой слизистой оболочки, но и изменение в связи с активацией этих клеток под действием одорантов. Известно, что кровь является источником O_2 для тканей. Обонятельный эпителий подвергается прямому действию окружающей среды, включая атмосферный кислород. Поэтому логично предположить, что через обонятельную слизь может осуществляться его доставка непосредственно к обонятельным клеткам. Однако этот вопрос остается открытым до настоящего времени.

Цель нашего исследования заключалась в проверке предположения, что обонятельные клетки эпителия могут обеспечиваться кислородом путем его диффузии из атмосферы через обонятельную слизь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на обонятельной выстилке самцов крыс линии Вистар массой 200–250 г (из Биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН) в возрасте до четырех месяцев. Этот срок определялся тем, что начиная с него уменьшается общее количество рецепторных клеток в обонятельном эпителии этих животных [10]. В опытах использовали здоровых крыс без признаков ринита, так как при этом заболевании погибает большинство обонятельных клеток [10]. Эксперименты проводили в соответствии с нормами этики Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, которые согласуются с Директивой Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) по уходу и использованию лабораторных животных. Применение наркоза для проведения исследований на обонятельном эпителии не рекомендуется, поскольку он нарушает функциональное состояние рецепторных обонятельных нейронов. Поэтому животных умерщвляли посредством цервикальной дислокации.

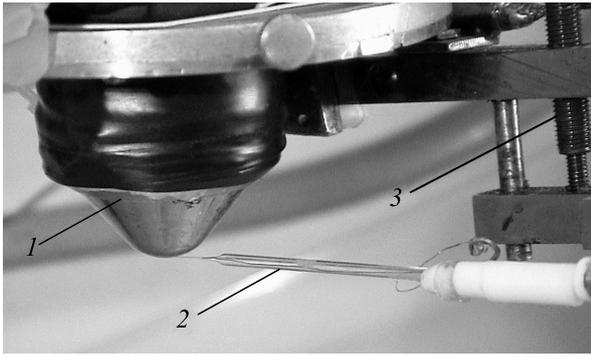


Рис. 1. Локальное измерение напряжения кислорода с помощью кислородного микроэлектрода. Кончик микроэлектрода (2), прикрепленный к 3D-микроманипулятору (3), располагается в центре фронтальной линзы контактного эпиобъектива (1) микроскопа [5].

У крыс обонятельный эпителий располагается в дорзальном носовом ходу в задней части раковин и прилежащей перегородке носа обонятельной области. После декапитации с головы снимали кожу, удаляли нижнюю челюсть и отсекали верхние резцы. Затем проводили сагиттальный разрез головы строго по срединной линии, чтобы не повредить обонятельную выстилку животного. Сагиттальный распил головы животного закрепляли в специально сконструированном фиксирующем устройстве, которое помещали под объектив микроскопа и на протяжении всего эксперимента перфузировали раствором Рингера для теплокровных следующего состава (в мМ): NaCl – 125,0, KCl – 2,5, MgCl₂ – 1,0, CaCl₂ – 2,5, NaH₂PO₄ – 1,3, HEPES – 20,0 D-глюкоза – 15,0 (pH 7,4) при комнатной температуре.

Напряжение кислорода измеряли посредством платиновых микроэлектродов, изолированных стеклом, имеющих выемку (реcess) на торце, с диаметром кончика 5–8 мкм (включая изоляцию). Электрод регистрирует ток, индуцируемый восстановлением O₂ на катоде, и величина этого тока пропорциональна pO₂ в сфере ткани, окружающей кончик (диаметр которой приблизительно в два раза больше кончика) [5]. Электроды калибровали в аэрированном орошающем растворе Рингера непосредственно перед началом измерения и периодически проверяли в каждой новой точке измерения. Обонятельный эпителий визуализировали с помощью микроскопа ЛЮМАМ К-1 (ЛОМО, Россия), оснащенного контактными эпиобъективами (рис. 1). Для визуализации фронтальная линза объектива непосредственно контактировала с обонятельной слизью (без надавливания), причем зазор между

линзой и поверхностью обонятельного эпителия в процессе эксперимента составлял около 60–70 мкм. Увеличение оптической системы составляло 150×, глубина просмотра эпителия – до 60–70 мкм.

Методику измерения локального pO₂ при непосредственном визуальном контроле за кончиком микроэлектрода адаптировали для измерений в зоне обонятельного эпителия препарата крысы. Измерения pO₂ проводили при температуре 23 ± 1°C. Показания pO₂ непрерывно регистрировали на ленте самописца КСП-4.

Фокусировку микроскопа проводили без смещения объектива относительно ткани с использованием специальной линзы, перемещаемой вдоль оптической оси внутри трубки микроскопа. Микроскопическое изображение просматривали на мониторе компьютера с использованием цифровой видеокамеры Moticam 2300 (Motic, Китай).

Орошение поверхности препарата проводили при помощи многоканального перистальтического насоса BT100-1L (LongerPump, Китай). Подачу калибровочного орошающего раствора и раствора, содержащего одорант (смесь амилового спирта и н-бутанола в концентрации 0,8 мМ), проводили по разным каналам. Скорости потоков обеих жидкостей были одинаковыми и составляли 1,8 ± 0,1 мл/мин.

Микроэлектроды, используемые в нашем исследовании, не были чувствительны к изменениям коэффициента диффузии кислорода в калибровочных и измерительных средах. После калибровки микроэлектрод под прямым визуальным контролем вводили в слой обонятельной слизи при помощи микроманипулятора. Измерение pO₂ проводили до стимуляции одорантами, на их фоне и после.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В задачу нашего исследования входила оценка изменений напряжения кислорода в обонятельной слизи в зоне обонятельного эпителия препарата крысы. pO₂ измерили в 53 локальных областях от семи животных. Результаты экспериментов показали, что напряжение O₂ в обонятельной слизи без действия одорантов («в контроле») составило 43,1 ± 1,8 мм рт. ст. (n = 53) в отличие от 157 ± 2 мм рт. ст. в калибровочном растворе. Это свидетельствует о высоком градиенте напряжения кислорода между атмосферным воздухом и обонятельной слизью в «контроле», который является движущей силой диффузии газа в обонятельную слизь и в конечном итоге в митохондрии

клеток обонятельного эпителия и определяет скорость поставки кислорода к тканям.

Поверхность эпителия весьма гетерогенна. Сюда обращены мерцательные клетки, способные перемешивать обонятельную слизь, а также обонятельные жгутики, которые обладают неупорядоченной подвижностью. Они создают площадь поверхности, во много раз превосходящую площадь обонятельных булав, увенчанных ими. Обонятельные жгутики внедрены в тонкий слой слизи, покрывающей эпителий, тем самым обеспечивая специализированный компартмент для жидкости, отделенный от интерстициальной жидкости барьером из плотных контактов [11]. Это, с одной стороны, требует хорошего снабжения кислородом, а с другой — также создает благоприятные условия для газообмена между слизью и обонятельными жгутиками.

Поэтому в отсутствие одорантов кислород, растворенный в слизи, вероятно, обеспечивает механические функции мерцательного и обонятельного эпителиев. С этим, возможно, связана большая разница между напряжением O_2 в калибровочном растворе и в обонятельной слизи, наблюдаемая в наших экспериментах. Известно, что обонятельный эпителий нуждается в поставках кислорода не только для поддержания жизнедеятельности и функциональной активности имеющегося клеточного состава, но и для непрерывного нейрогенеза [6]. Однако такой путь в наших экспериментах мы можем не учитывать, поскольку использовали изолированный эпителий, в котором процессы нейрогенеза, вероятно, отсутствуют.

Результаты наших экспериментов показали, что в 100% случаев под действием одорантов напряжение кислорода в обонятельной слизи снижалось (рис. 2).

Согласно закону Генри–Дальтона, концентрация растворенного в жидкости газа пропорциональна его напряжению. Следовательно, падение pO_2 в обонятельной слизи в присутствии обонятельного раздражителя может свидетельствовать об уменьшении содержания кислорода в ней. Это связано с тем, что высокий градиент pO_2 между слизью и митохондриями обонятельных клеток способствует поступлению в них этого газа, поскольку кислород служит в качестве терминального акцептора электронов при митохондриальном окислительном фосфорилировании, что является основной биохимической реакцией для генерации энергии в форме АТФ.

Это предположение подтверждается результатами экспериментов, проведенных нами ранее на лягушках (*Rana temporaria*). В них было показано, что при ингибировании клеточного дыхания обонятельные нейроны не реагируют на одоранты, а

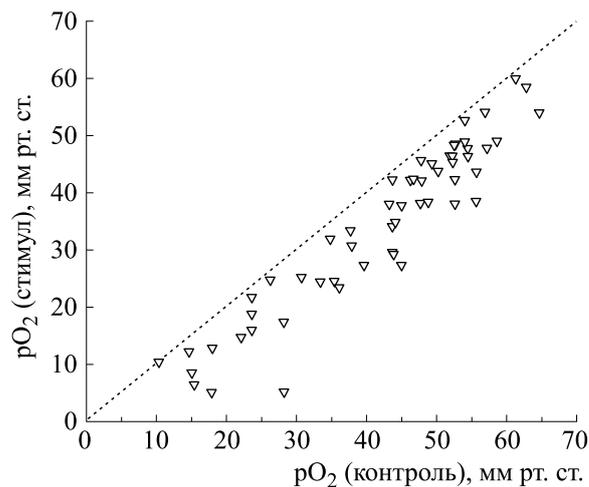


Рис. 2. Снижение напряжения кислорода в области обонятельного эпителия крысы под воздействием одорантов (смесь амилового спирта и н-бутанола в концентрации 0,8 мМ).

обонятельные жгутики прекращают свои движения [3,12].

Показано, что под действием одорантов pO_2 в слизи падает с $43,1 \pm 1,8$ мм рт. ст. до $35,9 \pm 1,8$ мм рт. ст. ($n = 53$). Однако оказалось, что величина этой реакции, выраженная в процентах от исходного уровня, в разных областях обонятельного эпителия была различной (рис. 3). Полученные реакции можно разделить на две группы с нормальным распределением с максимумами наиболее вероятных реакций в $(12,0 \pm 0,8)$ % и $(31,8 \pm 1,1)$ % относительно пер-

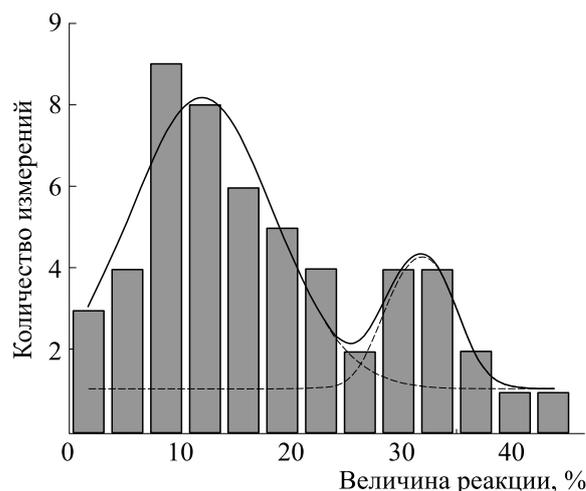


Рис. 3. Гистограмма распределения значений величины реакции на стимуляцию смесью амилового спирта и н-бутанола в концентрации 0,8 мМ. Пики нормальных распределений находятся в точках $(12,0 \pm 0,8)$ % и $(31,8 \pm 1,1)$ %.

воначального уровня, причем в наибольшем количестве локальных точек она достигала около 12% ($n = 39$).

Мы полагаем, что в основе такого разброса могут лежать следующие причины. Обонятельный эпителий, как уже отмечалось, представляет собой весьма гетерогенную структуру. В его апикальную область обращены вершины различных типов рецепторных клеток, случайным образом распределенных по эпителию. При этом не все из них являются зрелыми обонятельными нейронами, способными реагировать на одоранты. Количество созревших клеток в каждой локальной области может быть различным. Кроме того, в слой обонятельных клеток у млекопитающих инкорпорированы мерцательные клетки [6,7]. Следовательно, кончик микроэлектрода не всегда был размещен в зоне, обладающей наибольшим количеством зрелых рецепторных клеток, от чего, вероятно, и зависела величина реакции на стимуляцию.

Потребление кислорода в ответ на действие запахов зависит также от того, реагируют рецепторные клетки на стимуляцию или нет. Чем больше таких клеток, тем ответ будет интенсивнее. Известно, что на данный пахучий раздражитель реагируют лишь те зрелые обонятельные нейроны, в жгутиках которых локализуются специфические молекулярные рецепторы к нему. Обонятельные жгутики располагаются горизонтально в различных направлениях, образуя сложную сеть, которая выглядит как густой ворс, налагающийся на микровиллы опорных клеток [13]. Следовательно, величина реакции может зависеть от числа клеток, обонятельные жгутики которых экспрессируют рецепторы на данные одоранты. Чем их больше попадает под электрод, тем большее потребление кислорода мы можем зарегистрировать. Этим, вероятно, можно объяснить варьирование величины изменения напряжения кислорода, наблюдаемые в наших экспериментах.

Итак, кислород жизненно важен для живых клеток: он играет фундаментальную роль в их метаболизме. Однако простой диффузии молекул газов в ткани, а также нутриентов недостаточно для метаболических потребностей больших, сложных и активных многоклеточных организмов. Следовательно, необходимо обеспечить ткани и клетки оптимальными концентрациями кислорода.

Развито несколько стратегий, чтобы максимизировать захват и транспорт O_2 в органы. У млекопитающих кислород абсорбируется легкими. Из-за своей плохой растворимости он связывается с гемоглобином, который находится внутри эритроцитов. Хорошо организованная сосудистая сеть обеспечивает доставку оксигенированных эритроцитов к тканям. Макрососуды обеспе-

чивают быструю циркуляцию крови, а микрососуды, которые омывают каждый орган, обеспечивают локально оптимальную поставку O_2 . Высоко контролируемая оксигенация клеток жизненно важна, особенно для тканей с высокими метаболическими потребностями [4].

Так ли однозначно это происходит в обонятельном эпителии? Эксперименты на изолированных препаратах обонятельного эпителия позволяют предположить, что снабжение кислородом процессов хемио- и механотрансдукции не нуждаются в его поступлении из крови. Об этом свидетельствуют и данные о сохранении этих процессов, полученных на трупном материале [14]. Единственным непосредственным источником кислорода является обонятельная слизь, в которой он растворяется. Это предположение подтвердили результаты наших экспериментов. Наблюдаемое нами снижение напряжения кислорода в слизи без стимуляции одорантами и при их действии свидетельствует о потреблении обонятельными клетками O_2 , поступающего из нее. Это обеспечивает быстрое его поступление к обонятельным жгутикам, в которых локализуются компоненты хемио- и механотрансдукции, которые, как полагают, образуют функциональные элементы каскадов трансдукции, пространственно собранные в мультимерные комплексы, организованные с помощью поддерживающих белков, которые заякоривают сигнальные сети к мембране обонятельных жгутиков [11]. Химическая и механическая функции обонятельных жгутиков требуют больших энергетических затрат. Снабжение этих функций кислородом из обонятельной слизи может являться предпосылкой для высокой чувствительности и быстрой кинетики процессов обонятельной трансдукции. Таким образом, оксигенация обонятельного эпителия связана с высокой чувствительностью периферического отдела обонятельного анализатора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014–2020 годы (ГП-14, раздел 63).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Я. Н. Руденко, Е. В. Бигдай и В. О. Самойлов, Науч.-технич. ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета **50**, 90 (2007).
2. Е. В. Бигдай и В. О. Самойлов, Биофизика **63** (6), 1146 (2018).
3. Я. Н. Руденко, Е. В. Бигдай и В. О. Самойлов, Биофизика **52** (1), 88 (2007).
4. D. Lyons, Doctoral dissertation (Université Pierre et Marie Curie-Paris V, 2015).

5. M. Sharan, E. P. Vovenko, A. Vadapalli, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28** (9), 1597 (2008).
6. C. R. Chen, C. Kachramanoglou, D. Li, et al., *J. Neurol. Surg. B* **75** (5), 293 (2014).
7. А. А. Бронштейн, *Обонятельные рецепторы позвоночных* (Наука, Л., 1977).
8. P. S. Villar, R. Delgado, C. Vergara, et al., *J. Neurosci.* **37** (23), 5736 (2017).
9. A. Devor, S. Sakadžić, P. A. Saisan, et al., *J. Neurosci.* **31** (38), 13676 (2011).
10. J. W. Hinds, P. L. Hinds, and N. A. McNelly, *Anat. Rec.* **210** (2), 375 (1984).
11. J. Paysan and H. Breer, *Pflügers Arch.* **441** (5), 579 (2001).
12. Е. В. Бигдай, В. О. Самойлов, Я. Н. Руденко и др., *Вестн. Рос. Воен.-мед. академии* **1** (11), 29 (2004).
13. T. Nomura, S. Takahashi, and T. Ushiki, *Arch. Histol. Cytol.* **67** (2), 159 (2004).
14. В. О. Самойлов, Е. В. Бигдай, В. Э. Крыжановский и др., *Биофизика* **58** (2), 269 (2013).

Changes in Oxygen Uptake Rate in Rat Olfactory Epithelium under the Influence of Odorants

E.V. Bigday, E.A. Bezgacheva, E.P. Vovenko, and V.O. Samoilov

*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,
nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia*

This paper presents the results of a study focused on the oxygen supply to olfactory cells, which is required for olfactory signal transduction of chemical and mechanical stimuli triggered by olfactory receptors located in the membrane of sensory cilia that extend into the mucus layer covering the olfactory epithelium. Studies were conducted on olfactory epithelia isolated from male Wistar rats without rhinitis symptoms. The oxygen uptake rate in the mucus covering the olfactory epithelium was measured by a micropolarographic method prior to a response to odor molecules, a n-butanol and amyl alcohol mixture, and during activation of olfactory receptors. The results showed that oxygen uptake rate was almost 4-fold higher between the mucus covering the olfactory epithelium and the odor solution, suggesting an intense O₂-diffusion through the olfactory mucus. It has also been shown that under the action of odorants, pO₂ in mucus decreased from 43.1 ± 1.8 mmHg to 35.9 ± 1.8 mmHg. The oxygen supply to olfactory flagella from the olfactory mucus in response to chemical and mechanical stimuli might be a prerequisite for high sensitivity and fast kinetics of olfactory transduction processes.

Keywords: smell, olfactory epithelium, oxygen microelectrodes, oxygen uptake rate, odorants