

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ИРКУТСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

КЛИМЕНКОВ ИГОРЬ ВИКТОРОВИЧ

**АДАПТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ В СИСТЕМЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО
ОТДЕЛА ОБОНЯТЕЛЬНОГО И СЛУХОВОГО АНАЛИЗАТОРОВ У РЫБ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:

д.б.н., профессор Н.С. Косицын

Новосибирск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Структурно-функциональные особенности обонятельного эпителия у позвоночных.....	18
1.1.1 Рецепторные клетки.....	18
1.1.2 Опорные клетки.....	24
1.1.3 Базальные клетки.....	26
1.2 Нейрогенез в обонятельном эпителии.....	28
1.3 Периферические механизмы регуляция обонятельной рецепции.....	32
1.4 Адаптация обонятельной системы к продолжительному воздействию запахов.....	38
1.5 Химическая коммуникация рыб.....	40
1.6 Морфо-функциональные особенности слухового саккулярного аппарата у рыб.....	44
1.6.1 Ультроструктурная организация саккулюса.....	44
1.6.2 Функциональная характеристика слуха у рыб.....	53
1.6.3 Роль слуха в поведении рыб.....	54
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ.....	55
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	59
2.1 Методологические подходы, используемые для решения поставленных задач.....	59
2.2 Методы микроскопии.....	68
2.2.1 Электронная микроскопия.....	68
2.2.2 Атомно-силовая микроскопия топографии отолитов.....	69
2.2.3 Световая микроскопия ядрышек обонятельных клеток...	70
2.2.4 Лазерная конфокальная микроскопия.....	70

2.2.5	Анализ изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии и статистическая обработка данных.....	73
2.3	Отбор проб.....	75
2.4	Краткая характеристика объектов исследования.....	78
2.4.1	Общие сведения о рогатковидных видах рыб, использованных для сравнительно-морфологического изучения периферического отдела обонятельного и слухового анализаторов.....	78
2.4.2	Общие сведения о сиговых видах рыб, использованных для изучения саккулярного аппарата органа слуха.....	82
ГЛАВА 3	УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У ЖЕЛТОКРЫЛКИ В МЕЖНЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД.....	84
3.1	Рецепторные клетки.....	87
3.2	Опорные и базальные клетки.....	92
3.3.	Пространственная организация актиновых микрофиламентов в обонятельном эпителии у рыб сем. Cottoidei.....	94
3.3.1	Межклеточные плотные контакты.....	94
3.3.2	Особенности структурной организации актиновых микрофиламентов плотных контактов у некоторых видов рыб сем.Cottoidei.....	97
ГЛАВА 4	ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У ЖЕЛТОКРЫЛКИ В НЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД.....	106
4.1	Рецепторные клетки.....	106
4.2	Структурные особенности мерцательных и секреторных	

	опорных клеток у рыб во время нереста.....	131
ГЛАВА 5	СТИМУЛ-ЗАВИСИМАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И НЕЙРОГЕНЕЗ В ОБОНЯТЕЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ У РЫБ.....	136
5.1	Феномен дендритной нейросекреции в хеморецепторных клетках.....	136
5.2	Ультраструктурные перестройки рецепторных клеток после продолжительного воздействия гетерогенной смесью аминокислот и пептидов.....	142
5.3	Сравнительные аспекты дендритной нейросекреции.....	148
5.4	Цитохимические перестройки в клетках ольфакторного эпителия при продолжительной одорантной стимуляции рыб.....	150
5.5	Активация нейрогенеза в обонятельном эпителии у рыб после продолжительной хемостимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов	166
5.6	Активация ядрышек в базальных (стволовых) клетках эпителия.....	167
5.7	Оценка пролиферативной активности клеток в обонятельном эпителии у контрольных рыб с помощью BrdU.....	172
5.8	Оценка пролиферативной активности клеток в обонятельном эпителии у экспериментальных рыб после их длительной одорантной стимуляции гетерогенной смесью смесью аминокислот и пептидов.....	184
5.9	Прикладные аспекты использования методов активизации процессов нейрогенеза в обонятельном эпителии.....	194
5.10	Цитохимические особенности дифференцировки	

	рецепторных клеток и их миграции в обонятельном эпителии.....	197
5.11	Структурные особенности незрелых обонятельных нейронов, дендриты которых не взаимодействуют с внешней средой.....	199
5.12	Структурные особенности молодых нейронов после установления контакта дендритов с поверхностью обонятельного эпителия.....	207
ГЛАВА 6	ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА НА ОЛЬФАКТОРНЫЙ ЭПИТЕЛИЙ РОГАТКОВИДНЫХ РЫБ СЕМЕЙСТВА COTTIDAE.....	224
ГЛАВА 7	АДАПТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО АППАРАТА У ГЛУБОКОВОДНЫХ РЫБ ОЗЕРА БАЙКАЛ.....	233
7.1	Общие закономерности адаптации ольфакторного аппарата рогатковидных рыб с разной стратегией пищевого поведения к глубоководному образу жизни.....	250
ГЛАВА 8	СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУХОВОГО САККУЛЯРНОГО АППАРАТА У РОГАТКОВИДНЫХ (СЕМ. COTTIDAE) И СИГОВЫХ (СЕМ. COREGONIDAE) РЫБ ОЗЕРА БАЙКАЛ.....	259
8.1	Морфологическая характеристика саккулюса у рогатковидных рыб.....	259
8.1.1	Ультраструктура сенсорных клеток и особенности их топографического расположения в саккулярном эпителии.....	259
8.1.2	Особенности дирекционной чувствительности саккулюса.....	267
8.2.	Морфологическая характеристика саккулюса у сиговых рыб.....	274

8.2.1 Ультраструктура сенсорных клеток и особенности их топографического расположения в саккулярном эпителии.....	274
8.2.2 Особенности дирекционной чувствительности саккулюса.....	285
8.3 Структурная специфика саккулярных отолитов у байкальских рыб.....	290
8.3.1 Особенности формирования отолитов на примере рогатковидных рыб разных экологических групп.....	291
8.4 Оценка акустической чувствительности у байкальских рогатковидных и сиговых рыб.....	299
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	303
ВЫВОДЫ.....	310
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	312

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

НСК – нейросекреторная клетка

ОЛ – обонятельная луковица

GAP-43 – белок ассоциированный с развитием нейронов

GBC – шаровидная базальная клетка

GBC-1, GBC-3, GBC-5 – маркеры дифференцировки шаровидных базальных клеток.

GBCinp – транзитная шаровидная базальная клетка

НВС – горизонтальная базальная клетка

ICAM1 – внутриклеточная молекула адгезии 1

K18 – кератин18

MHC – главный комплекс гистосовместимости

NCAM – молекула адгезии нейронов

NST – тубулин, специфичный для нейронов

OMP – обонятельный маркерный белок

ORN – обонятельный сенсорный нейрон

ORN_i – незрелый обонятельный нейрон

ORN_{mi} – нейроны микровиллярного типа

Reep6 – рецептор, ассоциированный с протеином 6

RTP1 и RTP2 – трансмембранные белки, обеспечивающие транслокацию и функционирование обонятельных рецепторов

SUS4 – синтаза сахарозы

TRPC2 – катионный ионный канал, обеспечивающий деполяризацию микровиллярной клетки

VR гены – семейство генов, кодирующих рецепторы в микровиллярных клетках вомероназального органа

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из важнейших задач является изучение фундаментальных механизмов адаптивного функционирования обонятельного (ольфакторного) анализатора животных в связи с его особой ролью при формировании пищевого, репродуктивного и других сложных форм их поведения. В первую очередь, эти вопросы касаются расшифровки механизмов, которые обеспечивают процессы хеморецепции на уровне периферического отдела обонятельной системы [Buck, Axel, 1991; Young *et al.*, 2003; Doty, 2015]. Попытки выявить корреляции между структурой рецепторных нейронов, их чувствительностью и реализацией конкретных форм поведения животных не дали пока однозначных результатов [Hamdani *et al.*, 2008; Behrens *et al.*, 2014; Ahuja, Korsching, 2014]. В связи с этим, одной из актуальных проблем является поиск морфо-функциональных критериев разных уровней чувствительности рецепторных нейронов у животных на ключевых этапах их жизненного цикла, когда у них существенно изменяется спектр воспринимаемых биологически значимых веществ [Hamdani *et al.*, 2008; Dmitrieva, Kozlov, 2010; Bettini *et al.*, 2012]. Недостаточно изученными являются также процессы нейрогенеза, происходящие в ольфакторном эпителии в ходе естественной жизни животных, а также после продолжительного воздействия на них физико-химических факторов различной природы [Cowan, Roskams, 2002; Yanagi *et al.*, 2004; Mackay-Sim, 2010; Doty, 2015]. Среди наиболее принципиальных аспектов изучения нейрогенеза важное место занимают вопросы о ранних стадиях развития рецепторных клеток, путях их миграции и позиционирования на завершающих стадиях дифференцировки. Данные о топографическом расположении новообразованных клеточных элементов в эпителии напрямую связаны с дискуссией о возможности пространственного кодирования восприятия запахов на уровне сенсорного отдела обонятельного

анализатора у млекопитающих [Buck, 1996; Scott, Brierley, 1999; Coppola *et al.*, 2013], рыб [Thommesen, 1982] и насекомых [Vosshall *et al.*, 1999].

Большой интерес представляет также выявление приспособительных свойств хеморецепторных нейронов не только при разном химизме окружающей среды, но и в условиях действия широкого спектра гидростатических давлений. Особенно это касается процессов формирования адаптивного поведения у гидробионтов, которые в ходе эволюции освоили различные водные горизонты. Работы, посвященные этим проблемам, как правило, не охватывают глубоководных рыб в связи с ограниченностью их доступа, или затрагивают только общие анатомические сведения [Wagner, 2002; Herring, 2002]. Изучение обонятельной системы животных с экстремальными по глубине условиями существования может способствовать выявлению цитологических и молекулярных механизмов, позволяющих им приобретать устойчивость к гипоксии, что обеспечивает гидробионтам сохранность хемосенсорного поведения при переменных режимах гидростатических давлений.

Экспериментальные работы, выполненные в последнее время на млекопитающих, показывают, что восприятие химических сигналов интегрировано с функционированием других сенсорных модальностей, в частности со слуховой системой, что позволяет животным более полно анализировать доступную информацию о внешней среде [Budinger, Scheich, 2009; Wesson, Wilson, 2010; Kulahci *et al.*, 2014]. Возможно, что такая интеграция может реализовываться и у рыб, которые, как известно, широко используют обонятельные и акустические сигналы для обеспечения различных форм поведения [Павлов, Касумян, 1991; Лычаков, 1994; Popper *et al.*, 2005; Kasumyan, 2009; Ladich, 2014; Marusov, Kasumyan, 2016].

Особенности структурно-функционального устройства органа слуха у рыб изучены менее детально, чем у млекопитающих. Это связано с тем, что морфологическая организация слухового аппарата у рыб отличается большим разнообразием [Popper *et al.*, 2000; Сапожникова и др., 2007; Schulz-

Mirbach, Ladich, 2016], что отражается на более сложном характере пространственного кодирования первичного восприятия звуков (Platt, Popper, 1984; Smith *et al.*, 2011]. Слабо изученными являются механизмы закладки и дальнейшего формирования отолитов, а также ультраструктурная специфика и пространственная локализация чувствительных клеток в составе сенсорной макулы у рыб, адаптированных к разному образу жизни и экологии.

Для изучения адаптивных особенностей в системе периферического отдела обонятельной и акустической систем мы использовали представителей разных видов байкальских рыб. Чистая вода Байкала создает возможность использовать это озеро в качестве одного из уникальных природных полигонов для получения данных базового уровня, что невозможно при изучении сенсорных систем гидробионтов из других, как правило, более загрязненных водоемов. Таким образом, существенные отличия образа жизни у различных видов байкальских рыб можно использовать в качестве естественной модели для выявления морфо-функциональных адаптаций обонятельного и слухового анализаторов у гидробионтов, эволюционно приспособленных к жизнедеятельности в разных экологических условиях.

Цель работы: выявить цитохимические перестройки в сенсорных отделах обонятельной и акустической систем у рыб в связи с их экологией, поведением и спецификой сенсорной нагрузки.

Задачи:

1. Охарактеризовать адаптивные цитохимические перестройки клеток обонятельного эпителия у рогатковидных рыб (сем. Cottidae) на разных этапах их жизненного цикла и репродуктивного поведения.
2. Оценить соотношение процессов апоптоза и нейрогенеза, а также другие цитохимические показатели клеток обонятельного эпителия у рыб в контроле и после продолжительного воздействия одорантов нетоксичной природы.

3. Исследовать морфологические особенности ранних стадий дифференцировки хеморецепторных нейронов, обеспечивающие их миграцию в эпителии и дальнейшее созревание.
4. Выявить структурно-функциональные особенности клеток обонятельного эпителия у некоторых байкальских пелагических и бентосных рогатковидных рыб в связи с разными стратегиями их пищевого поведения.
5. Охарактеризовать специфику морфологической организации саккулярного аппарата органа слуха у прибрежных и пелагических видов рыб озера Байкал.
6. Определить диапазоны акустической чувствительности у разных видов сиговых (сем. Coregonidae) и рогатковидных байкальских рыб в связи с их экологией и поведением.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Впервые установлено, что сенсорный аппарат пелагических рыб показывает существенно большую, чем у бентосных, структурно-функциональную устойчивость к гипобарической гипоксии, что, по-видимому, является результатом их гипоксического прекондиционирования, возникающего в ходе постоянных вертикальных миграций рыб в процессе пищевого поведения.

Показано, что у рыб в репродуктивный период в обонятельных рецепторных клетках возникают ультраструктурные перестройки, которые направлены как для восприятия феромонов во время химической коммуникации половых партнеров, так и на последующее выключение этой функции в фазу перехода рыб к родительскому поведению.

Впервые описан феномен трансформации рецепторных нейронов в клетки с дендритной нейросекрецией, что свидетельствует об их способности к изменению функциональных свойств.

Впервые обосновывается положение о том, что цитоскелет в дендритах рецепторных клеток формируется не только при значительных функциональных нагрузках в период нереста, но и в условиях низкого содержания в воде химических агентов. При одорантной депривации хорошо организованная система микротрубочек дендритов может быть необходимым фактором поддержания их структурно-функциональной целостности.

Впервые показано, что длительная хемотимуляция рыб нетоксичными водорастворимыми веществами вызывает избирательную дифференцировку и программированную гибель отдельных клеток периферического отдела обонятельного анализатора, что приводит к компенсаторному усилению процессов нейрогенеза.

Установлено, что в ходе нейрогенеза в обонятельном эпителии рыб формируются пространственно разграниченные домены из молодых клеток, которые могут участвовать в рецепции одорантов в качестве отдельных морфо-функциональных единиц.

Показано, что актиновые микрофиламенты выполняют важную роль как на ранних, так и на завершающих этапах структурной дифференцировки рецепторных клеток. В процессе миграции молодого нейрона значительная доля его ядерного материала проникает внутрь дендрита, в примембранном слое которого формируется плотный актиновый кортекс. Благодаря этому клетка принимает наиболее удобную форму для перемещения в межклеточном пространстве. После установления связи терминали дендрита с внешней средой в примембранном слое F-актина формируется пора, через которую от одорант-связывающих рецепторов может проходить первый внутриклеточный сигнал, необходимый для стабилизации экспрессии гена, кодирующего обонятельные рецепторы.

Впервые на взятых из естественной среды оз. Байкал представителях ихтиофауны показано, что саккулярные макулы у рыб из разных таксономических групп, занимающих одинаковые экологические ниши,

имеют идентичные морфотипы волосковых клеток и их поляризацию, что обеспечивает сходство их дирекционной акустической чувствительности.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ультраструктурные перестройки рецепторного аппарата обонятельного эпителия у рыб обеспечивают различную функциональную специализацию этих клеток, необходимую для реализации их репродуктивного поведения.
2. Деструкция ядра, вакуолизация мембранных структур и деграция митохондрий являются характерными нейродегенеративными нарушениями клеток обонятельного эпителия у глубоководных бентосных рыб при гипобарической гипоксии. Такие изменения несвойственны для пелагических рыб, адаптированных к изменениям гидростатических давлений в результате их периодических вертикальных пищевых миграций.
3. Одорант-зависимый апоптоз рецепторных клеток обонятельного эпителия у рыб компенсаторно активизирует процессы естественного нейрогенеза. Ранние этапы дифференцировки обонятельных нейронов сопровождаются примембранной полимеризацией актиновых микрофиламентов, что обеспечивает реорганизацию органелл клеток, необходимую для их миграции, упорядоченного позиционирования в виде доменов и дальнейшего созревания.
4. Морфологическая организация саккулярных волосковых клеток органа слуха и их дирекционная чувствительность у прибрежных и пелагических видов рыб озера Байкал в большей степени определяются особенностями их экологической ниши, чем принадлежностью к той или иной таксономической группе.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на Всесоюзной конференции "Морфо-функциональные исследования нейронов и синапсов» (Пушино, 1990), Всероссийской нейрогистологической конференции, посвященной

памяти члена-корреспондента АН СССР и АМН СССР Н.Г. Колосова (Санкт-Петербург, 1994), Всероссийской конференции "Восстановительная неврология-3" (Москва, 1995), 4th IBRO World Congress of Neuroscience (Kyoto, 1995), Schloessmann Seminar on "Nanostructures in Biology, Chemistry and Physics" (Elmay, Germany 1996); III-ем международном симпозиуме "Ancient Lakes: speciation, development in time and space, natural history" (Irkutsk, 2002), Международном междисциплинарном симпозиуме "От экспериментальной биологии к превентивной и интегративной медицине" (Судак, Украина, 2007), XV-ой Международной конференции по нейрокибернетике (ICNC-09, Ростов-на-Дону, 2009), III-ем Съезде физиологов СНГ (Ялта, 2011), Международных междисциплинарных конгрессах "Нейронаука для медицины и психологии" (Судак, Украина, 2012, 2013), Международных конференциях Хромосома-2012, 2015 (Новосибирск, 2012, 2015), Первой Международной Сибирской конференции по нейробиологии (Иркутск, 2013), научно-практическом семинаре "Инновационные технологии Carl Zeiss" (Новосибирск, 2013), XIIth International Symposium on the biology and management of Coregonid fishes (Иркутск, 2014), II-ой Всероссийской конференции: «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2015), XIV-ом Конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018).

Вклад автора. Автором обоснованы и поставлены цели и задачи исследования, определены подходы к их решению, разработаны методы проведения наблюдений и экспериментов, интерпретированы полученные результаты, сформулированы основные выводы и научные положения. Фамилии соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Публикации. По теме диссертации опубликована 21 работа в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных исследований на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 370 страницах, содержит 123 рисунка, включая 31 схему, 4 таблицы и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы из 548 цитируемых источников.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность коллегам, внесшим существенный вклад в эту работу: к.б.н., доценту Н.П. Судакову (ИНЦ хирургии и травматологии, г. Иркутск), к.б.н. М.В. Пастухову (Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН, г. Иркутск), к.б.н. Ю.П. Сапожниковой, к.б.н. В.М. Яхненко, А.В. Натягановой (ЛИН СО РАН, г. Иркутск), а также директору Байкальского музея ИНЦ, к.г.н. В.А. Фиалкову, зав. аквариумным комплексом Байкальского музея ИНЦ В.В. Пастухову и руководителю уникальной научной установки «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» ЛИН СО РАН, к.б.н. О.Ю. Глызиной. За большую помощь в техническом обеспечении работ выражаю глубокую признательность гл. спец. А.В. Курылеву, гл. спец. А.П. Лопатину, гл. спец. В.Ф. Старостину, гл. спец. В.И. Егорову, вед. инж. М.М. Масленниковой, гл. спец. К.Ю. Арсентьеву (ЛИН СО РАН, г. Иркутск) и гл. спец., к.х.н. В.А. Уманцу (ИНЦ хирургии и травматологии, г. Иркутск). Слова особой благодарности выражаю моему научному консультанту – д.б.н., профессору Н.С. Косицыну (Институт ВНД и НФ РАН, г. Москва), а также, д.б.н., профессору Т.М. Дмитриевой и д.б.н., профессору Ю.П. Козлову (РУДН, г. Москва), моим учителям, благодаря которым были инициированы работы по изучению сенсорных систем у гидробионтов озера Байкал. За ценные советы, консультации и обеспечение работ выражаю признательность д.б.н., профессору Е.В. Лихошвай и академику М.А. Грачеву (ЛИН СО РАН, г. Иркутск). Благодарю также коллективы отдела «Ультроструктуры клетки» ЛИН СО РАН и кафедры физико-химической биологии Иркутского госуниверситета (зав., д.б.н.,

профессор В.П. Саловарова) за помощь при проведении исследований и теплую рабочую атмосферу.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В последнее десятилетие обонятельное восприятие рассматривается в качестве результата сложной мультимодальной интеграции сенсорных сигналов, источником которых является не только сам хеморецепторный аппарат, но и другие органы чувств. Известно, что как вкусовые [Welge-Lüssen *et al.*, 2009], так и визуальные [Demattè *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2011] раздражители могут существенно модулировать восприятие запахов. В частности, цветовая гамма, сопутствующая химическому воздействию, не только облегчает его идентификацию [Gottfried, Dolan, 2003] и дифференцировку [Stevenson, Oaten, 2008], но и значительно увеличивает интенсивность его восприятия [Seo *et al.*, 2011]. В нейрофизиологических экспериментах факт наличия таких кросс-адаптаций обоняния недавно выявлен и в отношении акустических сигналов в слуховой коре у млекопитающих [Kulahci *et al.*, 2014]. С помощью электрофизиологических методов показано, что область первичной проекции обонятельной луковицы (ОЛ) – обонятельный бугорок переднего мозга также является местом прямой мультимодальной психофизической конвергенции между запахами и звуками [Wesson, Wilson, 2010]. Предполагается, что и другие зоны высших центров обработки сигналов о запахах могут участвовать в конвергентном анализе обонятельных и акустических сигналов [Budinger, Scheich, 2009]. Результаты сравнительного анализа эмбрионального развития этих двух сенсорных систем также показывают, что их интеграция закладывается еще на ранних этапах развития. Обонятельные и ушные плагоды в сочетании с мигрирующими стволовыми клетками нервного гребня с помощью сигнальных молекул *согласованно* генерируют узкоспециализированные подтипы нервных клеток, которые воспринимают звук, положение и перемещение в пространстве, запахи и феромоны на протяжении всей жизни животных [Katoh *et al.*, 2011; Maier *et al.*, 2014]. Все эти данные говорят о том, что восприятие химических сигналов у животных может быть

интегрировано с функционированием других сенсорных модальностей, в частности со слуховой системой, что позволяет животным более полно анализировать доступную информацию о внешней среде. Это также касается рыб, как прибрежных, так и глубоководных, которые обитают в условиях низкой освещенности, либо при полном отсутствии визуальных ориентиров. Ранее факты сенсорной пластичности у рыб выявлены по отношению к пищевым сигналам при повреждении или полном блокировании функции одной из сенсорных систем [Девицина, Марусов, 2007; Касумян, Марусов, 2007]. Таким образом, совместное изучение обонятельной и акустической систем на разных уровнях их организации, включая сенсорный отдел, может лечь в основу более целостных представлений о механизмах структурно-функциональных адаптаций животных к действию факторов внешней среды.

1.1 Структурно-функциональные особенности обонятельного эпителия у позвоночных

У филогенетически разных животных чувствительный отдел обонятельного анализатора представляет собой псевдомногослойный столбчатый эпителий, состоящий из клеток трех типов: рецепторных, опорных и базальных (**рис. 1**). Принадлежность клеток к определенному типу определяется по их морфологическим особенностям, наличию тех или иных специфических антигенных детерминант (маркеров) и местоположению в толще эпителия [Бронштейн, 1977; Graziadei, Graziadei, 1979; Schwob, 2002; Brann, Firestein, 2014; Doty, 2015].

1.1.1 Рецепторные клетки

Рецепторные клетки являются первичночувствующими биполярными нейронами, сома которых находится в толще эпителия. Тела клеток имеют веретеновидную форму с поперечным диаметром 5–8 мкм. В перикарионе

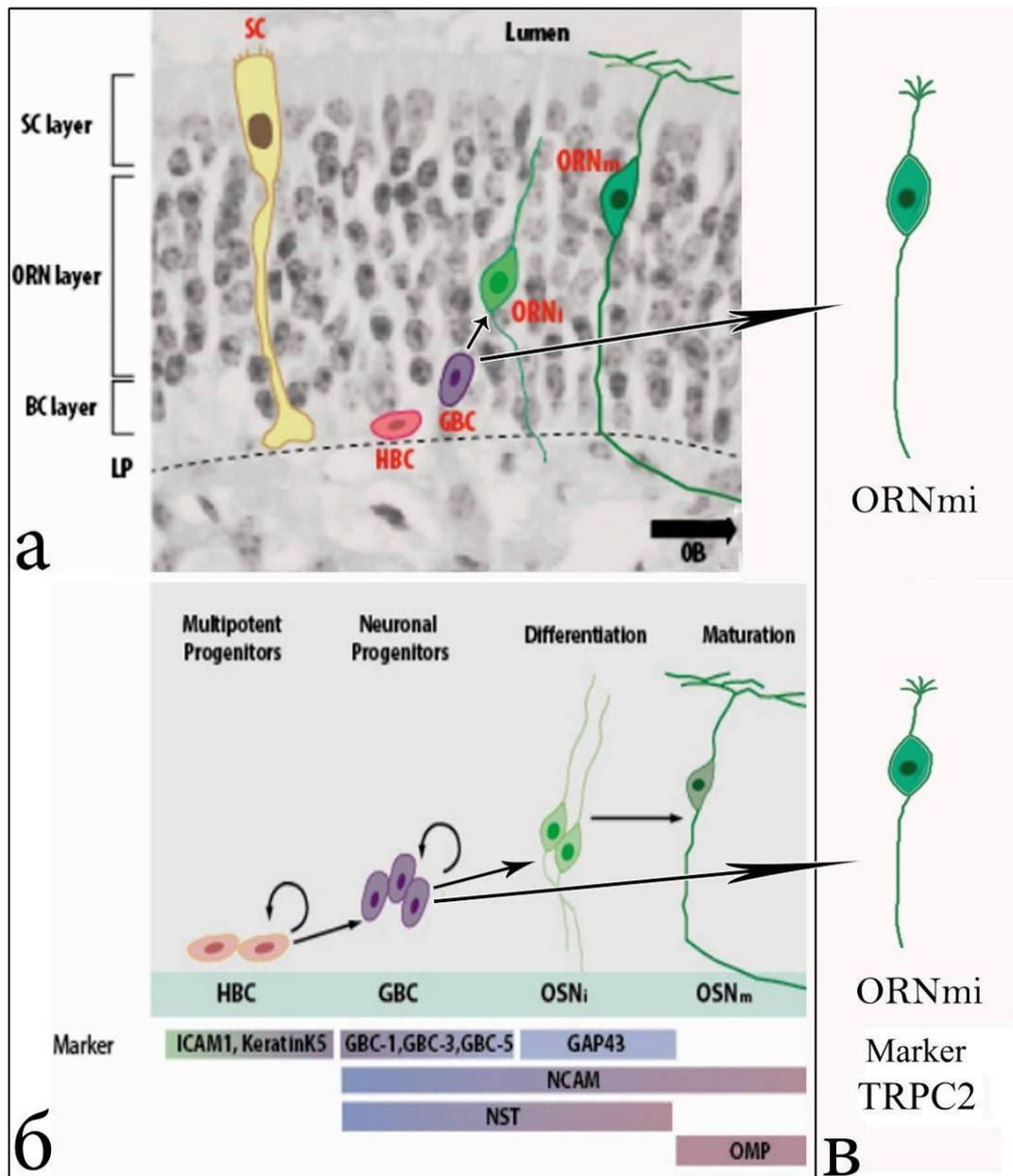


Рисунок 1. Обобщенная картина расположения клеточных элементов (а) и их дифференцировки из базальных клеток (б) в обонятельном эпителии у позвоночных [Im, Moon, 2015; Sato *et al.*, 2005 (в)]. Условные обозначения: SC – опорная клетка; ORN – обонятельные рецепторный нейрон; BC – базальная клетка; HBC – горизонтальная клетка, GBC – шаровидная клетка; ORNi – растущий нейрон, ORNm – зрелый нейрон жгутикового типа; ORNmi – нейрон микровиллярного типа; ICAM, KeratinKS, GB1, GB-3, GB-5, GAP43, NCAM, NST, OMP, TRPC2 – цитохимические маркеры клеток; стрелками показаны направления дифференцировки.

локализуются каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума, аппарат Гольджи, митохондрии, мультивезикулярные тельца, свободные розетки рибосом и другие органеллы. Тело нижней части клетки, резко сужаясь, образует аксон, который в совокупности с другими аксонами аналогичных клеток входит в состав безмякотного обонятельного нерва, связывающего рецепторные клетки с ОЛ переднего мозга. От верхнего полюса тела клетки отходит дендрит (периферический отросток), диаметр которого составляет 1–3 мкм. В цитоплазме дендрита обычно располагаются фрагменты гладкого эндоплазматического ретикулума, митохондрии и микротрубочки. Апикальный участок рецепторных клеток (обонятельная булава) может иметь выросты двух разновидностей – жгутики (реснички) или микровиллы, не имеющие микротубулярного аппарата. По этому признаку их подразделяют на клетки жгутикового и микровиллярного типа. Цитохимическим маркером зрелых клеток, несущих реснички, является цитоплазматический olfactory marker protein (OMP), участвующий в трансдукции химических сигналов, а для нейронов с микровиллами – катионный ионный канал TRPC2, обеспечивающий деполяризацию клетки [Sato *et al.*, 2005].

Как и у других позвоночных, зрелые сенсорные нейроны рыб моноспецифичны и экспрессируют только один тип рецепторов [Sato *et al.*, 2007]. У разных видов рыб представлено от нескольких десятков до 150 функционально активных генов, кодирующих рецептивные белки [Saraiva, Korsching, 2007; Alioto, Ngai, 2006]. Обнаружение пахучих веществ опосредуется различными типами G-белков, сопряженных с рецепторами. Структура обонятельных рецепторов жгутиковых клеток отличается от таковых у микровиллярных клеток, представленных также и в вомероназальном органе [Yoshihara, 2009].

С помощью Patch Clamp метода [Sakmann, Neher, 1983] у разных видов рыб удалось выявить репертуар лигандов, которые связываются с

данными типами молекулярных рецепторов. В частности, у канального сомика жгутиковые и микровиллярные клетки реагируют на аминокислоты [Hansen *et al.*, 2003]. Ресничные клетки также воспринимают экстракты мочи, содержащие желчные кислоты, которые могут быть вовлечены в обнаружение сигнала тревоги [Døving, Lastein, 2009]. Эксперименты, проведенные на сомах с использованием ретроградного транспорта меченых молекул в ОЛ, показали, что микровиллярные клетки могут связывать не только аминокислоты, но и нуклеотиды [Hansen *et al.*, 2003].

В связи с развитием методов иммуоцитохимии и прижизненной визуализации функциональной активности клеток в последнее время у рыб стали выделять новые морфотипы рецепторных нейронов. Кроме уже упомянутых сенсорных клеток жгутикового и микровиллярного типа недавно была обнаружена еще одна, как правило, менее многочисленная в эпителии разновидность чувствительных элементов – крипт клетки [Hansen, Zeiske, 1998; Hansen, Finger, 2000; Ferrando *et al.*, 2010]. Отличительная особенность крипт клеток состоит в том, что их тела обычно располагаются в самом верхнем слое эпителия и имеют сферическую или грушевидную форму (**рис. 2**). В толще эпителия они обычно полностью окружены телами одной или двух опорных клеток, с которыми они формируют локальные щелевые контакты, обеспечивающие устойчивость клеток к механическим напряжениям [Schmachtenberg, 2006]. Кроме того, крипт клетки не имеют выраженных дендритов, а их рецептивный участок снабжен как ресничками, так и микровиллами. Как уже говорилось выше, данный тип клеток представляет собой самую немногочисленную группу рецепторных нейронов. Например, у форели и скумбрии на их долю приходится только 2 % клеток от общего числа нейронов, тогда как микровиллярные и жгутиковые составляют 8 и 90 % соответственно [Schmachtenberg, 2006]. У некоторых видов рыб эти клетки выявляются не только у взрослых особей, но и на 2–3 сутки их развития

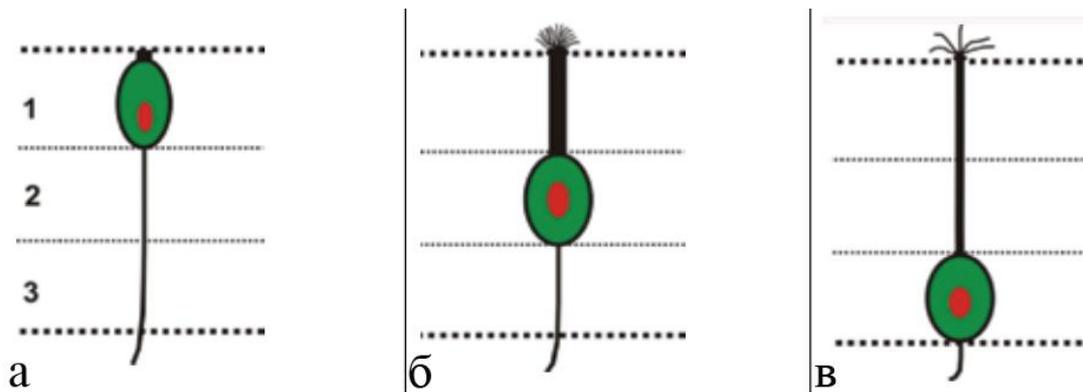


Рисунок 2. Типы рецепторных клеток в обонятельном эпителии у нототениевых рыб [Patle, Baile, 2014]. А – крипт клетка (тело располагается в верхнем слое эпителия) с укороченным дендритом; б – клетка микровиллярного типа (средний слой эпителия) с широким периферическим отростком; в – клетка жгутикового типа (нижний слой эпителия) с длинным периферическим отростком.

[Camacho *et al.*, 2010]. Характерно, что плотность и глубина расположения крипт клеток в эпителии нестабильна и может изменяться в зависимости от сезона [Hamdani *et al.*, 2008] и в репродуктивный период [Bettini *et al.*, 2012]. Чтобы определить функциональную специализацию этих клеток, в настоящее время предпринимаются попытки выявить в них специфические маркеры, не встречающиеся в других типах обонятельных нейронов [Ahuja *et al.*, 2013]. В частности, показано, что они экспрессируют G-белки Gα_o и Gα_q, аденилатциклазу III и глиальный маркерный белок S-100. Тем не менее, отмечается, что эти белки могут быть представлены не во всех крипт клетках [Hansen *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004; Vielma *et al.*, 2008].

Для того, чтобы выявить спектр запаховых веществ, воспринимаемых крипт клетками, в настоящее время ведутся интенсивные работы по идентификации их одорант-связывающих рецепторов. Недавно проведенные исследования показывают, что у данио-рерио эти клетки экспрессируют рецепторы из семейства VR генов, характерных для вомероназального органа [Oka *et al.*, 2012]. Для определения спектра одорантной чувствительности крипт клеток представляют интерес исследования по выявлению нейронных проекций этих клеток в центральных структурах

мозга. Так, установлено, что у карася аксоны нейронов второго порядка (образующие синапсы с крипт клетками) связаны с обонятельной корой через медиальный тракт, который передает сенсорную информацию, связанную с воспроизведением [Hamdani, Døving, 2007]. На основании этих фактов авторы последней работы предполагают, что крипт клетки обеспечивают селективное восприятие половых феромональных сигналов, участвующих в химической коммуникации рыб во время нереста. Недавно с помощью метода Patch Clamp и прижизненной визуализации ионов Ca^{2+} удалось показать, что у макрели и у молоди форели различные субпопуляции крипт клеток реагируют на аминокислоты, желчные кислоты, либо феромональные сигналы [Schmachtenberg, 2006; Vielma *et al.*, 2008; Bazaes, Schmachtenberg, 2012]. При этом у зрелых особей форели большинство крипт клеток отвечало только на репродуктивные феромоны, что говорит о том, что профиль их ответов существенно зависит от половой зрелости и пола рыбы [Bazaes, Schmachtenberg, 2012]. Кроме того, эксперименты на данио-рерио с ретроградным мечением крипт клеток путем инъекции флуоресцентного красителя в ОЛ показали, что данные клетки посылают свои аксоны только в одну гломерулу (клубочек) ОЛ. Это свидетельствует о существовании специализированной «меченой линии», объединяющей запаховые сигналы от всех представленных в эпителии крипт клеток в одной гломеруле ОЛ [Ahuja *et al.*, 2013]. В ходе изучения ольфакторного аппарата данио-рерио в пределах эпителия были выявлены также другие «крипт-подобные» клетки, которые посылали свои аксоны в другой клубочек [Braubach *et al.*, 2012; Ahuja *et al.*, 2014], что не соответствует принципу сходимости аксонов в одной гломеруле [Mombaerts, 2006]. Оказалось, что эти необычные клетки, названные из-за их характерной формы "каппе" нейронами, экспрессируют $G_{\alpha\ s/olf}$ белки и не производят специфических маркеров, свойственных для жгутиковых, микровиллярных и крипт клеток.

Все эти исследования показывают, что обонятельные рецепторные клетки рыб отличаются значительным структурно-функциональным

многообразием, они взаимодействуют с различными клубочками, что вероятно предопределяет сложные процессы кодирования запахов, которые осуществляются уже на уровне периферического отдела обонятельной системы.

1.1.2 Опорные клетки

В обонятельном эпителии рецепторные нейроны перемежаются с опорными (поддерживающими, обкладочными) элементами, которые выполняют функцию глиальных клеток [Getchell, 1986]. Тела опорных клеток обычно имеют цилиндрическую форму, причем их апикальные участки формируют основную площадь поверхности эпителия (**рис.1**). Нижняя часть клеток, сужаясь, продолжается в глубину эпителия, где контактирует с базальной мембраной. Различают несколько типов опорных клеток. Например, у многих костистых рыб имеются секреторные и мерцательные клетки. Функциональная специфика опорных клеток еще слабо изучена. Секреторные элементы производят гранулы, содержимое которых при выделении становится составной частью обонятельной слизи. Поверхность мерцательных клеток снабжена многочисленными жгутиками, локомоторная активность которых способствует перемешиванию слизи [Бигдай, 2012; Самойлов, 2013]. Обнаружено, что опорные клетки проявляют фагоцитарную активность в отношении погибших обонятельных нейронов, что свидетельствует об их участии в процессах нейрогенеза [Carr *et al.*, 1991]. В электрофизиологических исследованиях показано, что кроме названных функций поддерживающие клетки участвуют в формировании электрогенных свойств сенсорного эпителия [Getchell, 1986]. Установлено, что они производят множественные вариации цитохрома P450s, глутатион S-трансферазу и другие ферменты, включённые в метаболизм чужеродных соединений, выполняя функцию детоксикации ядовитых соединений, присутствующих во внешней среде, с

которым соприкасается эпителий [Débat *et al.*, 2007]. Активность ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, была выявлена также в сенсорном аппарате у радужной форели [Starcevic, Zielinski, 1995], а также у представителей разных видов млекопитающих [Gu *et al.*, 2000]. Предполагается, что опорные клетки могут участвовать также в секреции дефенсин и дефенсинподобных пептидов, которые обладают антибактериальными, противовирусными и противогрибковыми свойствами, обеспечивая защиту эпителия от чужеродных антигенов [Laudien *et al.*, 2011]. Работы, выполненные недавно, указывают на то, что вещества, выделяемые опорными клетками в обонятельную слизь, могут участвовать в метаболизме запаховых веществ и таким образом существенно влиять на первичные процессы хеморецепции [Dahl, 1988; Nagashima, Touhara, 2010]. Таким образом, вещества, попадающие в обонятельную слизь, еще до их взаимодействия с чувствительными клетками могут подвергаться значительной химической модификации так, что рецепции подвергаются не исходные молекулы, а их метаболиты. Кроме того, оказалось, что клубочковые паттерны активации в ОЛ приобретают радикальные отличия в присутствии ингибиторов ферментов, содержащихся в составе обонятельного секрета. Эти факты значительно повышают функциональную значимость ольфакторной слизи, компоненты которой непосредственно вовлечены в первичные процессы хеморецепции. Кроме связывания и химических превращений молекул одорантов, вещества, выделяемые секреторными клетками, могут обеспечивать очень широкий спектр других функций, напрямую не связанных с процессами трансдукции. Эти исследования наглядно демонстрирует сложность секрета, покрывающего обонятельный эпителий, который может включать в себя не только вещества, опосредующие процессы хеморецепции, но и потенциальные маркеры для характеристики патофизиологических состояний обонятельного аппарата при различных функциональных состояниях.

1.1.3 Базальные клетки

Базальные клетки образуют самый нижний ядерный слой эпителия и содержат органеллы, свойственные для малодифференцированных клеток. Основываясь на их морфологии [Graziadei, Monti-Graziadei, 1979] и экспрессии специфических клеточных маркеров [Holbrook *et al.*, 1995; Goldstein, Schwob, 1996; Getchell *et al.*, 2000], их подразделяют на два разных типа клеток: горизонтальные и шаровидные. Горизонтальные клетки непосредственно располагаются на базальной мембране и формируют с ней контакты по типу полудесмосом [Holbrook *et al.*, 1995]. Они взаимодействуют с аксонами рецепторных клеток перед их проникновением через базальную мембрану. В просвечивающем электронном микроскопе горизонтальные клетки характеризуются повышенной электронной плотностью, имеют уплощенную форму с удлинённым ядром и хорошо окрашиваются толуидиновым синим. Это единственные клетки эпителия, экспрессирующие специфические цитокератины K5 и K14 [Holbrook *et al.*, 1995]. Долгое время считалось, что горизонтальные клетки в основном находятся в состоянии покоя и только периодически могут переходить к асимметричному делению, возобновляя исходную горизонтальную клетку и производя шаровидную клетку. Причем, существовало мнение, что усиление их пролиферативной активности может возникнуть только в результате обширных повреждений эпителия, вызванных различными причинами [Leung *et al.*, 2007]. В последние годы представления о функциональных свойствах горизонтальных клеток подверглось существенному пересмотру. Показано, что так же, как и нейрональные стволовые клетки, они могут производить все типы клеток эпителия [Mackay-Sim, 2010; Iwai *et al.*, 2008].

Кроме того, недавно установлено, что определенные субпопуляции горизонтальных клеток снабжены так называемыми "первичными ресничками", с помощью которых они взаимодействуют с терминальными

ножками опорных клеток, контактирующих с базальной мембраной. Получены экспериментальные доказательства о том, что посредством таких ресничек горизонтальные клетки получают информацию от глиальных клеток о структурно-функциональном состоянии эпителия и в случае его повреждения активируются компенсаторные процессы нейрогенеза [Joiner et al., 2015]. В настоящее время появляется все больше данных, указывающих на то, что "первичные реснички" играют очень важную роль в обеспечении механизмов клеточной пролиферации и регуляции клеточного цикла [Irigóin, Badano, 2011]. Показано, что кроме ольфакторного эпителия они непосредственно участвуют в нейрогенезе и дифференцировке прогениторных и глиальных клеток в субвентрикулярной зоне гиппокампа [Tong et al., 2014]. Обсуждается вопрос о том, что такой опосредованный ресничкой контакт между горизонтальными и опорными клетками по своей функциональной специфике может быть аналогичен "иммунному синапсу" между рецепторами Т-лимфоцитов и белками главного комплекса гистосовместимости в антиген-представляющих клетках [Bromley et al., 2001].

Шаровидные базальные клетки располагаются над горизонтальными клетками, имеют округлую форму, пониженную плотность цитоплазмы и слабо окрашиваются толуидиновым синим [Graziadei, Monti-Graziadei, 1979]. В отличие от горизонтальных клеток, они не экспрессируют цитокератины. Как и горизонтальные, шаровидные клетки являются региональными мультипотентными клетками: они активно пролиферируют в течение всей жизни животного и могут производить все типы нервных и не нервных клеток эпителия [Schwob, Jang, 2006]. Популяция этих клеток неоднородна, что предопределяется экспрессией различных факторов транскрипции и специфических мембраносвязанных белков, идентифицируемых с помощью моноклональных антител [Goldstein, Schwob, 1996]. Начиная со времени выявления морфологических признаков, отличающих эти два типа базальных клеток [Graziadei, Graziadei, 1979], до настоящего времени не прекращается дискуссия о фенотипических детерминантах их дифференцировки в

жизненном цикле животных в норме и при действии повреждающих агентов внешней среды [Fletcher et al., 2011; Krolewski et al., 2012].

1.2 Нейрогенез в обонятельном эпителии

В изучении адаптивных механизмов функционирования клеток обонятельного аппарата актуальными являются вопросы, связанные с исследованием процессов их дегенерации и нейрогенеза. Первоначально считалось, что нейрогенез в обонятельной выстилке должен быть ограничен эмбриональным и ранним постнатальным этапами развития животных. Однако, уязвимость сенсорных нейронов к действию факторов окружающей среды делает нейрогенез жизненно важным свойством, необходимым для непрерывного поддержания у животного различных форм одорант-зависимого поведения. Таким образом, наличие регенеративных свойств в эпителии было выявлено также у животных и в зрелом возрасте.

Первые доказательства существования нейрогенеза у взрослых животных были получены с помощью световой микроскопии у крыс, кроликов и обезьян в 30х – 40х годах прошлого века, когда разрабатывались способы разрушения органа обоняния, чтобы заблокировать транспорт вируса полиомиелита в мозг [Smith, 1938]. Последующие исследования выявили наличие регенеративных свойств эпителиа у многих других видов животных [Graziadei, Graziadei, 1979; Kondo *et al.*, 2010], включая рыб [Westerman, Baumgarten, 1964; Julliard *et al.*, 1993; Yanagi *et al.*, 2004; Bayramli *et al.*, 2017].

Необходимо отметить, что значительная часть работ, посвященных вопросам нейрогенеза, выполнена на млекопитающих. Это связано с тем, что обонятельная выстилка рассматривается в качестве одного из доступных источников аутологических стволовых клеток, что открывает перспективы для ее использования в решении проблем восстановительной медицины [Im, Moon, 2015; Викторов, 2007]. Начиная с самых ранних работ и до настоящего

времени исследования процессов возобновления клеток в эпителии развиваются в двух аспектах: в ходе естественной жизни животного, или после различных вариантов повреждения обонятельного анализатора на разных уровнях его организации. С этой целью в основном используются следующие подходы: введение токсичных веществ в полость носа, удаление ОЛ (бульбэктомия), перерезка обонятельного нерва, а также метод сенсорной депривации, широко используемой при изучении других сенсорных систем [Cowan, Roskams, 2002] (рис. 3).

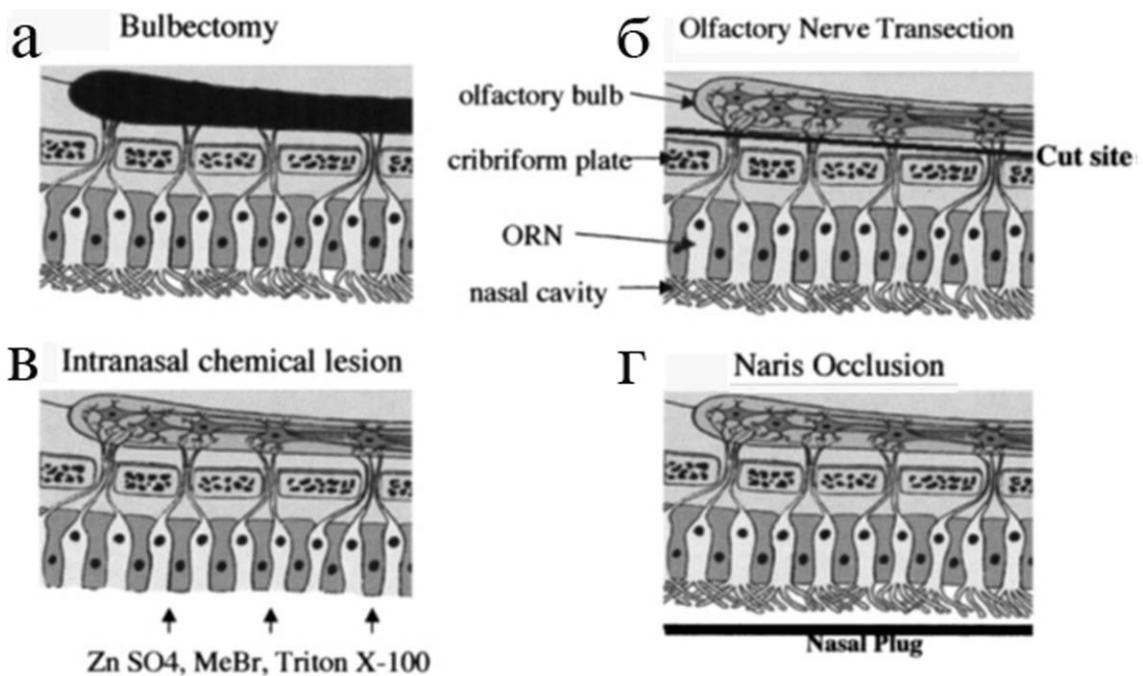


Рисунок 3. Методы изучения регенеративных свойств в обонятельном эпителии животных [Cowan, Roskams, 2002]. А – удаление обонятельной луковицы; б – перерезка обонятельного нерва; в – интраназальное введение токсичных веществ; г – сенсорная депривация, блокирующая приток воздуха

В последнее время разрабатываются и другие, менее травматичные и более селективные методы абляции хеморецепции, например, путем получения трансгенных животных, нервные клетки которых содержат рецептор для токсина дифтерии, что позволяет избирательно выключать

нейроны при их взаимодействии с дифтерийным токсином [Chen *et al.*, 2005].

Как указывалось выше, стволовые клетки, локализованные в базальных отделах эпителия, генерируют опорные и сенсорные клетки на протяжении всей жизни животного. Характерно, что нейрогенез в ольфакторном аппарате редко сопровождается образованием опухоли [Bailey, Barton, 1975], что говорит о наличии здесь надежных механизмов регуляции [Nicolay *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2007]. Показано, что у молодых животных естественная скорость возобновления нейронов существенно выше, чем у взрослых [Huard, Schwob, 1995; Kondo *et al.*, 2010]. Продолжительность жизни клеток также зависит от возраста: у молодых особей она составляет примерно 30 суток [Graziadei, Graziadei, 1979], тогда как с возрастом она может быть увеличена до 90 суток [Maskay-Sim, Kittel, 1991] или даже до года [Hinds, *et al.*, 1984]. На морских свинках показано, что скорость, с которой новообразованные нейроны мигрируют от базальной мембраны через толщу эпителия, также изменяется с возрастом. У неполовозрелых особей BrdU-меченые клетки мигрировали в средний слой обонятельного эпителия через 24 часа, и только через 5 суток у взрослых с выраженной экспрессией нейрон-специфических белков межклеточной адгезии N-CAM. Характерно, что число и расположение погибших клеток (определенных методом TUNELL) с возрастом никак не изменялось, что говорит о том, что замедление процессов нейрогенеза никак не сказывается на скорости их естественной гибели [Higuchi *et al.*, 2005].

Из модельных экспериментов следует, что естественные темпы нейрогенеза, свойственные для интактных животных, могут быть существенно активизированы после применения различных форм сенсорной депривации. Так, увеличение пролиферации клеток наблюдалось после деструктивных изменений эпителия в результате воздействия токсическими агентами (Triton X100, ZnSO₄, MeBr) [Schwob *et al.*, 1995; Frontera *et al.*, 2016], перерезки аксонов [Schwob, 2002], или удаления ОЛ [Carr, Farbman, 1993; Makino *et al.*, 2009].

После искусственного повреждения эпителия в большинстве представленных методик анатомическое [Schwob *et al.*, 1995] и функциональное [Blanco-Hernández *et al.*, 2012] восстановление клеток обычно проявляется в течение 45 дней, а исходные паттерны экспрессии рецепторов возобновляются в течение 90 дней [Iwema *et al.*, 2004]. Тем не менее, измерение плотности вновь образующихся клеток и ширины эпителия показывают, что его прежние морфологические параметры полностью не восстанавливаются. Это связано с тем, что после дегенеративных изменений количество пролиферативно активных клеток становится существенно меньше, чем у контрольных животных, вследствие чего число рецепторных клеток снижается на треть [Suzukawa *et al.*, 2011].

Исследования дегенеративных изменений и нейрогенеза у рыб изучены менее детально [Yanagi *et al.*, 2004], тем не менее, отмечается [Becker, Becker, 2008], что цитологические и молекулярные механизмы, которые лежат в основе обонятельного нейрогенеза у рыб, также могут быть интересны в плане перспективы их использования в медицине при разработке методов лечения нейродегенеративных заболеваний. Установлено, что как и млекопитающие, рыбы способны регенерировать эпителий в течение жизни, а также в ответ на его повреждения. Причем, степень индуцированного поражения и соответствующих ему морфо-физиологических перестроек обонятельного аппарата, обычно видоспецифичны [Hansen *et al.*, 1999; Ducray *et al.*, 2002]. В частности, у обыкновенного саргана после перерезки обонятельного нерва в эпителии возникает две волны компенсаторного нейрогенеза [Cancalon, 1983]. Основная фаза регенерации начинается через 12 дней (после прорастания аксонов в ОЛ) и сопровождается возобновлением 50–70 % аксонов от их исходного количества. После этого наступает вторая, более быстрая фаза восстановления клеточного состава эпителия, которая происходит в семь раз быстрее, чем первая и приводит к восстановлению 3–5 % аксонов. Последующие сравнительно-физиологические исследования показали, что скорость регенерации эпителия у рыб существенно зависит от

длины обонятельного нерва, который соединяет чувствительные клетки с ОЛ. Так, у данио-рерио с более коротким, чем у саргана, обонятельным нервом, после обработки T-X100 происходило более ускоренное восстановление эпителия – в течение 5 дней [Iqbal, Vurd-Jacobs, 2010]. Об этих же, сходных временных рамках восстановительного нейрогенеза, говорят работы, выполненные на гуппи: после токсического воздействия Cu^{2+} прежние морфологические показатели эпителия (с учетом экспрессии гистохимических маркеров зрелости нейронов) проявлялись на десятые сутки [Bettini *et al.*, 2006].

Анализ литературы показывает, что нейрогенез в обонятельном эпителии является высокоэффективным регулируемым процессом, направленном на сохранение его структурно-функциональной целостности, что необходимо для поддержания у животных необходимого уровня обонятельного восприятия. В связи с этим, в последнее десятилетие исследования нейрогенеза в основном сосредоточены на выявлении регуляторных механизмов, которые обеспечивают его надежную регенерацию. Главным образом, решение этих проблем сфокусировано на изучении многочисленных факторов транскрипции, от которых зависят основные пути клеточной дифференцировки и их пространственное расположение [Rawson, Gomez, 2002; Im, Moon, 2015].

1.3 Периферические механизмы регуляция обонятельной рецепции

Социальные взаимоотношения, в частности, взаимодействия между гидробионтами в нерестовый период, опосредованные биологически активными соединениями, сопровождаются изменениями экспрессии генов, которые выявляются на разных уровнях обработки сенсорной информации – в сенсорном эпителии, в ОЛ и в соответствующих зонах коры головного мозга [Harden *et al.*, 2006]. В отличие от веществ, которые могут непрерывно участвовать в регуляции социальных контактов, восприятие половых

феромонов происходит только в фазу их готовности к вымету половых продуктов. Как говорилось выше, в это время с помощью обоняния осуществляется идентификация физиологического статуса подходящих брачных партнеров и синхронизация развития их половых продуктов. Таким образом, в сравнении с донерестовым сезоном, в период размножения на обоняние рыб ложится повышенная функциональная нагрузка. Об этом же свидетельствуют эксперименты с искусственной депривацией ольфакторного восприятия половых феромонов. Показано, что окклюзия обонятельных розеток, или перерезка обонятельных трактов, передающих сенсорную информацию в передний мозг, блокирует репродуктивное поведение рыб [Kawaguchi *et al.*, 2014], сохраняя при этом отдельные формы социального поведения [Uchida *et al.*, 2005].

Попытки выявить взаимосвязь между морфологическими особенностями периферического отдела обонятельного анализатора и уровнем его функционального развития на разных этапах жизненного цикла и воспроизводства стали активно предприниматься еще с начала 60х годов прошлого века в связи с развитием методов электронной микроскопии. Решение данной проблемы осложнено не только структурным многообразием этого органа у разных видов рыб, но и его широкими адаптивными возможностями [Yamamoto, Ueda, 1979; Kasumyan, 2004]. Согласно классификации, предложенной Фришем [Frish, 1941], рыб (как других животных) в связи с уровнем развития их обонятельной системы разделяют на макро- и микросматиков. Морфологические аспекты такого разграничения у рыб рассмотрены во многих работах [например, Дорошенко, Девицина, 2009]. Для рыб-макросматиков характерно хорошо развитое обоняние, которое обеспечивается большой площадью поверхности, занимаемой рецепторными клетками, а также наличием разнообразных морфологических приспособлений, обеспечивающих не только защиту сенсорного аппарата, но и ритмичную подачу тестируемой среды. В отличие от этого, рыбам-микросматикам с более низким уровнем

хемочувствительности свойственны мелкие обонятельные розетки, состоящие обычно из нескольких складок, причем, ток воды осуществляется пассивно – во время движения рыбы.

В связи с многовариантными особенностями структурного развития хеморецепторного аппарата у разных видов рыб на сегодняшний день нет единой точки зрения о том, какая существует связь между числом/типами рецепторных клеток, их плотностью, способами взаимного расположения и уровнем обонятельной чувствительности. Предполагается, что повышенная чувствительность свойственна рыбам, сенсорный эпителий которых не прерывается индифферентными участками [Holl, 1965; Yamamoto, Ueda, 1979]. Другие исследования, выполненные, в частности на белом амуре в ходе его онтогенетического развития, не выявили у него таких прямых зависимостей [Пащенко, Касумян, 2015].

Восприятие половых феромонов сопровождается изменениями электроольфактограммы и, как отмечалось выше, развитием каскада нейроэндокринных перестроек, которые ведут к высвобождению нейропептидов и изменению уровня стероидных гормонов в крови [Almeida *et al.*, 2012]. Исследования, проведенные на рыбах и других позвоночных, показывают, что стероиды и нейропептиды могут оказывать значительное регуляторное влияние на восприятие запахов и их эффекты обычно имеют межполовые различия, а также зависят от репродуктивной зрелости животного [Moffatt, 2003; Doty, Cameron, 2009]. Это связано с тем, что клетки обонятельного эпителия, как и высшие отделы обработки информации об одорантах, являются мишенью для стероидных гормонов у позвоночных [Segovia, Guillamon, 1993], включая рыб. Причем, как показано на карповых, размер и сложность морфологической организации эпителия коррелирует со степенью их половой зрелости [Schreibman *et al.*, 1985]. В частности, обнаружено, что в ходе полового созревания гидробионтов в сенсорном аппарате увеличивается популяция бокаловидных слизистых клеток. Позднее, на этих же рыбах с помощью отведения ольфактограммы от

поверхности эпителия удалось показать, что инъекция андрогенов значительно усиливает электрические ответы на простагландины и стероиды – вещества, предполагаемые в качестве феромонов [Stacey, Cardwell, 1995]. Аналогичные работы, выполненные на лососевых [Waring et al., 1996] и окунеобразных [Belanger et al., 2004], также указывает на то, что пороговое значение и величина реакции на эти вещества существенно зависят от степени их половой зрелости. Причем, отмечается, что у лососевых перед наступлением нерестового периода достоверно увеличивается объем ОЛ, что косвенно может говорить об увеличении количества рецепторных клеток в эпителии [Jarrard, 1997].

В цитохимических исследованиях, проведенных на карасях, установлено, что локализация чувствительных к феромонам крипт клеток в разное время года существенно изменяется, причем, летом – при переходе к нересту – их тела перемещаются к более поверхностным слоям эпителия [Hamdani et al., 2007]. Как полагают авторы, эти наблюдения демонстрируют наличие прямой взаимосвязи между циркулирующими в крови гормонами и восприятием половых феромонов.

Повышение чувствительности рецепторных клеток во время размножения может быть также обусловлено влиянием на них терминального нерва. Так, у американского протоя в сравнении с нерепродуктивной фазой развития, в нерестовый период большинство обонятельных нейронов реагировало на воздействие гонадотропного релизинг гормона, который находится в клетках и волокнах терминального нерва и оказывает на них нейромодуляторное влияние [Zhang, Delay, 2007].

Существует мнение, что функциональный настрой рецепторных клеток может зависеть от их контактов друг с другом в пределах эпителия [Бронштейн, 1976]. Полагают, что клетки, которые примыкают друг к другу телами, дендритами или их терминалями, могут формировать функциональные единицы, что может усиливать их рецептивные свойства. Такие случаи группового расположения обонятельных нейронов были уже

давно описаны у рыб [Дорошенко, 1984; Девицина, эль-Саиед эль-Аттар, 1988], хвостатых амфибий [Graziadei, Graziadei, 1976] и у некоторых видов млекопитающих [De Lorenzo, 1970], однако до настоящего времени их функциональные особенности не охарактеризованы.

Специальные исследования, проведенные на грызунах, показали, что после инъекции стероидных гормонов в дополнительной обонятельной системе (вомероназальном органе) усиливается экспрессия V2R рецепторов, что говорит о наличии непосредственной связи между уровнем гормонов, количеством одорант-связывающих рецепторов и формированием полового диморфизма, предопределяющего тип полового поведения. При этом важно отметить, что никаких изменений объема, либо каких-либо других ультраструктурных изменений в эпителии выявить не удалось [Alekseyenko *et al.*, 2006].

В последние 10–15 лет в связи с развитием методов прижизненной окраски клеток и синхронной регистрации их функциональной активности предпринимаются попытки сопоставить их свойства с конкретной фазой развития животного или влиянием на них различных веществ, включая половые феромоны. В этом отношении интересны работы, проведенные на насекомых, которые убедительно демонстрируют, что достаточно изменения работы одного гена, чтобы радикально изменить профиль их «феромон-зависимого» полового поведения. Показано, что искусственно вызванный у самцов дрозофилы альтернативный сплайсинг гена *fru* по женскому типу полностью блокирует его мужской тип ухаживания и сексуальное поведение [Demir, Dickson, 2005]. Причем, такая измененная экспрессия данного гена наблюдалась в нервных цепочках, которые были задействованы в мужском ухаживании. Среди этих клеток экспрессия обнаруживалась в сенсорных клетках слуховой, вкусовой и обонятельной системы, необходимой для восприятия половых феромонов [Stockinger *et al.*, 2005]. Основным феромоном самок у дрозофил является 7,11-heptacosadiene и 7,11-nonacosadiene. Авторы этого исследования полагают, что в восприятии

данного феромона участвуют сенсорные нейроны, в которых экспрессируется мужской тип экспрессии гена *fru*. Весомым основанием для такого утверждения является то, что данное подмножество нейронов (*fruGAL4ORNs*) иннервирует клубочки, которые у самцов по размеру существенно больше, чем у самок; во-вторых, избирательная блокировка функционирования этих клеток у самца значительно ухудшает его поведение ухаживания. Характерно, что никаких ультраструктурных отличий у этих специализированных нейронов выявлено не было. Из этих наблюдений делается важный вывод о том, что при первичном запуске хемочувствительности к половому феромону в рецепторных нейронах сколько-нибудь значимых морфологических перестроек может и не наблюдаться. Главным фактором переключения клеток на рецепцию ключевых хемокоммуникативных сигналов является экспрессия генов, а в данном случае – единичного гена *fru*, который отвечает за восприятие полового феромона и предопределяет у самцов насекомых демонстрацию поведения ухаживания [Demir, Dickson, 2005].

При изучении механизмов хеморецепции рыб в последние годы появляются публикации, в которых с помощью конфокальной микроскопии клеток с параллельной визуализацией в них уровней ионов Ca^{2+} удается точно идентифицировать тип молекулярных рецепторов, с которыми селективно взаимодействуют половые феромоны. Так, показано, что у данио-рерио связывание *n*-гидроксифенилуксусной кислоты осуществляется ORA1 рецепторами, кодируемыми небольшим семейством гомологичных генов [Ahuja, Korsching, 2014]. Специфическое взаимодействие этого вещества с рецепторами ORA1 провоцирует у самок половое поведение и выделение икры, что подтверждает его сигнальное значение во время размножения.

Приведенные на насекомых и рыбах примеры показывают, что использование комплексного подхода по выявлению химической природы полового феромона с одновременной идентификацией родственного ему рецептора открывает хорошие перспективы для изучения нейронных цепей,

участвующих в формировании специфических одорант-зависимых форм поведения у животных.

Анализ работ, посвященных изучению адаптивных изменений клеточных элементов в обонятельном эпителии у животных на разных этапах их жизненного цикла и полового поведения, показывает, что в последние десятилетия акцент исследований структурно-функциональных свойств сенсорного отдела смещается с морфологического на молекулярно-генетический уровень с точной цитохимической идентификацией чувствительных клеток. При этом, ключевым параметром, свидетельствующем о функциональной специфике клеток, является тип молекулярных рецепторов и их способность связывать те, или иные биологически активные вещества, что определяется с помощью прижизненной визуализации тока ионов, участвующих в их рецепции.

1.4 Адаптация обонятельной системы к продолжительному воздействию запахов

Известно, что при повторяющемся или продолжительном характере воздействия запахов в обонятельной системе животных наблюдается адаптивное ослабление чувствительности – привыкание [Wilson, Linstler, 2008; Rankin *et al.*, 2009]. Принято считать, что такая адаптация реализуется на разных уровнях организации обонятельного анализатора – вдоль всего пути обработки сенсорной информации [Zufall, Leinders-Zufall, 2000; Chaudhury *et al.*, 2010]. Причем, значительная доля исследований, посвященных этой теме, сосредоточена на адаптивных процессах, которые реализуются в ОЛ, включая механизмы ее центробежной регуляции со стороны коры головного мозга [Markopoulos *et al.*, 2012].

Установлено, что рецепторные клетки в процессе специфического связывания молекул одорантов создают в ОЛ уникальный рисунок клубочковой активации [Mori *et al.*, 2006]. Так, в ранних экспериментах с

содержанием крыс в условиях длительного (несколько месяцев) воздействия однотипного запаха в ОЛ наблюдались хорошо выраженные области дегенерации митральных клеток [Doving, Pinching, 1973; Laing *et al.*, 1985]. Потемнение и сжатие этих клеток было зарегистрировано уже после недельной экспозиции одорантом. Интересно, что дегенеративные изменения имели тенденцию располагаться в виде роstralно-каудальных полос вдоль ОЛ. Данные этих работ показывают, что при таком продолжительном характере воздействия запахов стимулируются зоны, ответственные за их восприятие, что приводит к деградации соответствующих областей ОЛ.

Большинство работ, направленных на изучение механизмов адаптации обоняния к длительно действующим запахам ограничивается более короткими временными интервалами одорантной стимуляции, находящимися в пределах от нескольких десятков секунд до нескольких минут. Причем, в терминалях аксонов рецепторных клеток (в ОЛ), изменения электрической активности на пре- или постсинаптическом уровне регистрируются с помощью различных методов визуализации [Fletcher, Vendahmane, 2014] и могут отражать реальные процессы, которые происходят в эпителии при его взаимодействии с пахучими веществами. Так, применение двуфотонной лазерной микроскопии с одновременной регистрацией ионных токов показало, что при длительной хемостимуляции сенсорного аппарата в ОЛ сначала усиливается генерация постсинаптических потенциалов, которая затем затухает, что обусловлено снижением притока ионов Ca^{2+} и уменьшением высвобождения глутамата в терминалях аксонов рецепторных нейронов [Lescq *et al.*, 2009]. Сравнивая карты затухания активности нейронов, возникающие в ОЛ при длительном воздействии одоранта с рисунками ответов на искусственную стимуляцию обонятельных нервов при отсутствии запаха, пришли к выводу, что определенные механизмы, которые приводят к ослаблению хеморецепции, локализованы на периферии – в самих обонятельных нейронах [Ogg *et al.*, 2015]. Таким образом, из литературы видно, что при изучении эффектов непрерывного

воздействия запахов на обонятельную систему основное внимание уделяется электрофизиологическим коррелятам данных воздействий и только на коротких интервалах хемотимуляции. Причем, цитологические аспекты таких экспериментальных подходов в настоящее время освящены очень слабо. Некоторые вопросы структурно-функциональной адаптации периферического отдела обонятельного аппарата будут рассматриваться в контексте полученных нами данных.

1.5 Химическая коммуникация рыб

Рыбы в процессе жизнедеятельности обычно используют разные органы чувств, воспринимая комбинацию визуальных, акустических и химических сигналов [Candolin, 2003]. Широкий спектр веществ небиологического происхождения, а также метаболитов, выделяемых самими гидробионтами, является важным и постоянным источником сенсорной информации для рыб [Fisher *et al.* 2006]. С помощью обоняния эти химические сигналы обеспечивают формирование пищевого поведения [Marusov, Kasumyan, 2010; Касумян и др., 2010; Marusov, Kasumyan, 2016], миграции (Bett, Hinch, 2016), избегания хищников и репродукции, которая опосредуется особым классом биологически активных соединений – половыми феромонами [Hamdani *et al.*, 2000]. Также как и у млекопитающих, феромоны, выделяемые рыбами, как правило, действуют в низких концентрациях (10^{-9} – 10^{-12} М) и вызывают у реципиента глубокие нейроэндокринные перестройки [Schubert *et al.*, 2009; O'Connell *et al.*, 2013], сопровождающиеся изменением их адаптивного поведения [Antunes, Oliveira, 2009].

К настоящему времени накоплен большой материал о непосредственном участии половых феромонов в обеспечении репродуктивного поведения рыб и синхронизации их двигательной активности в этот период [Stacey, Sorensen, 2006; Stacey, 2011; Walaszczyk *et*

al., 2013]. Причем, выделение феромонов осуществляется как самками (в фазу овуляторной зрелости), так и готовыми к нересту самцами [Stacey, 2011; Kawaguchi *et al.*, 2014]. Источником половых феромонов самки является овариальная (полостная) жидкость, в которой находится икра, готовая к оплодотворению. У самцов эти вещества содержатся в составе мочи, которая выделяется небольшими порциями в ходе позиционирования взаимодействий с конспецифичной самкой [Rosenthal *et al.*, 2011].

Установлено, что при выборе полового партнера по запаху мочи самка оценивает не только физиологическое состояние самца, но и другие химические сигналы, необходимые для успешного нереста. В частности, важными тестовыми параметрами являются также запахи гнезда, принадлежащего готовому к нересту самцу. Например, в поведенческих экспериментах показано, что в процессе полового отбора самки песчаных бычков-бубырей не принимают ухаживания самцов, чьи гнезда поражены сапролегнией, которая может быть потенциально опасной для развития икры [Lehtonen, Kvarnemo, 2015].

В сложные процессы химической коммуникации рыб могут быть вовлечены также химические сигналы, напрямую не связанные с их воспроизводством. В частности, у тилапии и африканских цихлид секретлируемые ими вещества обеспечивают оценку социального статуса конспецифичных самцов и самок своего вида, предопределяя доминирование одних особей над другими [Martinovic-Weigelt *et al.*, 2012]. В ходе жизнедеятельности и половом отборе немаловажное значение имеют также и однополюе феромон-индуцированные социальные взаимоотношения [Oliveira *et al.*, 1998]. В целом, данные исследования свидетельствуют о том, что социальное положение отдельных особей влияет на их распределение по размерам в стае, территориальное расположение, питание, сезонные сроки размножения, а также предпочтения при брачном выборе.

В изучении механизмов химической коммуникации одной из важных задач является идентификация химической структуры феромонов,

выделяемых как самцами, так и самками рыб. Установлено, что у некоторых исследованных рыб основными компонентами феромонов являются вещества стероидной природы [Stacey, Sorensen, 2006; Stacey, 2011; Behrens, 2014]. В связи с этим, большой интерес представляют работы, в которых особое внимание уделяется другим веществам, которые также могут входить в многокомпонентный состав феромонов. В последние годы наблюдается рост числа публикаций, в которых в качестве отдельного семейства хемокоммуникативных сигналов, используемых животными для оценки их генотипа, обсуждается потенциальная роль белков МНС (major histocompatibility complex) [Ruff *et al.*, 2012; Overath *et al.*, 2014]. Поскольку гены МНС очень полиморфны и кодируют структурно родственные, но различающиеся своими варибельными доменами молекулы МНС [Rammensee *et al.*, 1995], их водорастворимые формы могут нести статус естественных персонифицированных хемосигналов [Milinski *et al.*, 2005].

По современным представлениям, половой отбор является одним из важнейших механизмов, обеспечивающих высокое аллельное разнообразие генов МНС, которые контролируют степень устойчивости природных популяций животных против чужеродных антигенов [Apanius *et al.*, 1997]. Предполагается, что сами молекулы МНС, продукты их деградации, или связанные с ними пептиды могут выступать в качестве индивидуальных сигналов, которые животные выделяют во внешнюю среду [Penn, Potts, 1998]. Причем, структурное разнообразие зоны клефта в молекулах МНС позволяет им связываться с очень большим числом пептидов, которые образуются в качестве продуктов внутриклеточной протеолитической деградации антигенов различного происхождения и представлять их на поверхности клеток для иммунного надзора [Rammensee, *et al.*, 1995]. На сегодняшний день не известны механизмы, с помощью которых в многоклеточных организмах могут быть синтезированы немембраносвязанные формы МНС, тем не менее, есть указания на то, что эти молекулы обнаруживаются в сыворотке крови, слюне и моче [Stevenson

et al., 1986; Singh *et al.*, 1987]. Предполагается, что внешние вариабельные домены белков МНС могут быть подвергнуты экзонуклеолитической деградации и таким образом высвободиться во внеклеточную среду [Mouritsen, 1992] и далее входить в состав внешних метаболитов.

В ряде работ с помощью поведенческих экспериментов показано, что высокополиморфные белки МНС широко используются в качестве молекул для одортипии и поиска оптимальных половых партнеров у мышей [Penn, Potts, 1999] человека [Wedekind *et al.*, 1995] и у рыб [Reusch *et al.*, 2001; Aeschlimann 2003]. В частности, установлено, что самки трехиглой колюшки используют пептиды МНС самцов своего вида для успешного полового отбора. Для предотвращения инбридинга они предпочитают самцов с различающимся профилем белков МНС [Reusch *et al.*, 2001; Aeschlimann *et al.*, 2003]. Кроме того, в рамках обсуждаемого вопроса интересны экспериментальные данные, в которых показано, что импринтинг (запечатлевание) у личинок данио-рерио происходит в самый ранний (критический) период после их выклева (до 24 час.), когда они запоминают пептиды родительских МНС [Gerlach *et al.*, 2008; Hinz *et al.*, 2013]. Нужно отметить, что не только взрослые, но и личиночные формы рыб очень широко используют химические сигналы для поиска подходящего обитания рифа [Dixson *et al.*, 2014], избегания хищников [Dixson *et al.*, 2012], а также для обнаружения конспецифичных особей на личиночной или взрослой стадии их развития [Roux, Lecchini, 2015].

Таким образом, начиная с самых ранних этапов развития рыб, для формирования их адекватного поведения возникает необходимость в идентификации природы и происхождения химических сигналов, источником которых могут быть особи своего или чужого вида. При этом, как говорилось выше, результаты специальных поведенческих тестов указывают на то, что белки МНС могут выступать в качестве ключевых хемокоммуникативных сигнальных молекул, несущих персонафицированных данные о генотипе особей. Не уменьшая общей

значимости работ о важном значении данных молекул в распознавании родственных особей, уже давно отмечалось, что в процесс идентификации пахучих веществ вместе с МНС могут быть вовлечены и другие сопутствующие химические сигналы, которые также могут участвовать в формировании индивидуального профиля запахов [Beauchamp, Yamazaki, 2003; Doherty, 2003]. Таким образом, несмотря на полученные к настоящему времени результаты, вопрос о потенциальной роли белков МНС в качестве социальных сигналов между животными, включая рыб, все еще остается остродискуссионным и нуждается в более детальных исследованиях [Overath *et al.*, 2014].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что различные типы химических сигналов, производимые гидробионтами для обеспечения их жизнедеятельности, выполняют очень важную роль, предопределяя сложные формы их социальных взаимоотношений и репродуктивное поведение. Из этого следует, что восприятие данных веществ должно обеспечиваться соответствующим уровнем настройки и специфической чувствительности обонятельного анализатора. Таким образом, решение этих вопросов представляют собой одну из ключевых проблем современной сенсорной физиологии.

1.6 Морфо-функциональные особенности слухового саккулярного аппарата у рыб

1.6.1 Ультраструктурная организация саккулюса

Структура периферического отдела слуховой системы рыб отличается большим разнообразием и до настоящего времени является предметом активных исследований [Popper *et al.*, 2000; Schulz-Mirbach, Ladich, 2016; Ladich, 2016; Vasconcelos, Alderks, 2016]. В последнее время интерес к данному вопросу обусловлен не только большим самостоятельным

значением этого органа в обеспечении жизнедеятельности рыб. В настоящее время костный лабиринт рыб рассматривается в качестве удобного модельного объекта для изучения механизмов формирования слуховой и вестибулярной дисфункций – одной из актуальных клинических проблем, возникающих у человека с возрастом, либо после применения медикаментозных препаратов [Sanchez-Fernandez *et al.*, 1989; Hughes *et al.*, 2006].

Слуховой аппарат рыб состоит из трех отолитовых органов, образованных расширенными полостями костного лабиринта: утрикулюса, саккулюса и лагены. Внутри каждого из них локализуются чувствительные к акустическим или вестибулярным сигналам волосковые клетки и отолиты: лапиллюс находится в утрикулюсе, сагитта – в саккулюсе и астерискус – в лагене. Эти органы заполнены эндолимфой и соединены вестибулярными полукружными каналами [Nicolson, 2005]. По мнению многих авторов, слуховая рецепция обеспечивается саккулярным отделом лабиринта [Porper *et al.*, 2005; Porper, 2011]. Саккуллюс представляет собой морфологически сложно устроенное образование, внутри которого располагается самый большой отолит (сагитта), при движении которого происходит стимуляция сенсорного эпителия [Oxman *et al.*, 2007; Parmentier *et al.*, 2007]. Такая стимуляция осуществляется с помощью широкой гелеобразной оболочки – отолитовой мембраны, которая располагается между сенсорной макулой и отолитом [Лычаков, 2002; Hughes *et al.*, 2004]. Отолитовая мембрана обеспечивает физическое соединение между отолитом и подстилающим сенсорным эпителием. Считается, что она имеет строение, аналогичное отокониальной мембране млекопитающих и ее белковый состав подробно охарактеризован у нескольких видов рыб [Hughes *et al.*, 2006; Lundberg *et al.*, 2015].

В зависимости от химического состава и структуры, отолиты у миног и ныне живущих рыб делят на три разных типа – цельные аморфные, композиционные и цельные поликристаллические [Oxman *et al.*, 2007;

Parmentier *et al.*, 2007; Morat *et al.*, 2008]. Размеры и форма отолитов очень разнообразны и отличаются не только у рыб разных видов, но и в разных отолитовых органах у особей одного и того же вида [Туагун *et al.*, 2013]. У представителей одного вида одноименные отолиты, как правило, близки по форме. Соотношение между размерами разноименных отолитов не меняется с ростом рыб и, соответственно, с ростом отолитов и служит устойчивой видовой характеристикой [Лычаков, 1994]. У рыб, у которых лабиринт соединен с плавательным пузырем, отолиты сравнительно крупнее, чем у рыб, не имеющих такой связи [Sweeting *et al.*, 2005; Oxman *et al.*, 2007].

Механизмы формирования отолита и степень его участия в обеспечении первичных процессов восприятия акустико-гравитационных сигналов остаются малоизученными [Lychakov, Rebane, 2005]. Известно, что в процессе роста рыбы отолиты постоянно увеличивают свою массу за счет отложения на их поверхности слоев отоконий и отокониальных масс [Salem, Zaghloul, 2001; Кузнецова и др., 2004]. В результате такого послойного прироста нового материала появляются различные концентрические зоны, связанные с особенностями процесса развития рыбы, ее пищевой и двигательной активностью, а также воздействием различных факторов среды обитания [Павлова и др., 2003; Туагун *et al.*, 2013].

Структура отолитов может варьировать: вместо типичной формы, состоящей из карбоната кальция (арагонита) образуются его аберрантные модификации – ватерит и кальцит [Parmentier *et al.*, 2007]. Известно, что аберрантные отолиты чаще встречаются в искусственно воспроизводимых популяциях рыб, а увеличение их доли в «диких» популяциях может быть результатом природно-экологических стрессов [Аношко и др., 2007; Morat *et al.*, 2008].

В отличие от млекопитающих, кохлеарные волосковые клетки которых располагаются в виде правильно структурированных рядов, у костистых они сосредоточены в виде обособленных пятен, именуемых макулами [Corwin, Warchol, 1991]. Так как рыбы являются общим предком всех четвероногих

[Clack, 2012], не удивительно, что волосковые клетки у млекопитающих и рыб имеют похожие морфологические черты [Coffin *et al.*, 2004]. Все сенсорные клетки представляют собой удлинённые вторичночувствующие эпителиальные клетки. На их апикальной поверхности находится пучок богатых актином стереоцилий и единичная, эксцентрично расположенная киноцилия [Popper, 1983]. Стереоцилии ранжированы по размеру, причем, самые длинные из них лежат ближе всего к киноцилии, а более короткие, ступенчато расположенные стереоцилии, собраны рядами и отстоят от киноцилии. Общее количество волосковых клеток в макулах отолитовых органов достигает сотен тысяч или миллионов [Popper, 2005; Popper, Fay, 2011; Schulz-Mirbach *et al.*, 2016]. Благодаря наличию на их апикальной поверхности стереоцилий и киноцилии разной длины чувствительные участки сенсорных клеток не одинаковы. В связи с этим, типы волосковых клеток в макуле в пределах одного вида и у особей разных видов обычно имеют структурные вариации [Belous *et al.*, 2014; Coffin *et al.*, 2004; Higgs *et al.*, 2002; Popper, Lu, 2000; Ramcharitar *et al.*, 2004].

По современным представлениям, сложившимся при изучении слуховой рецепции млекопитающих [Kazmierczak, Müller, 2012; Fettiplace, Kim, 2014], стереоцилии соседних рядов соединены друг с другом концевыми нитями актиновых микрофиламентов, натяжение которых, как было предсказано уже давно [Hudspeth, 1982], обеспечивает работу механочувствительных каналов (**рис. 4**). Эти нити закреплены на кончиках стереоцилий в месте расположения ионных каналов, конформация которых, как предполагается, существенно зависит от липидного микроокружения. Механочувствительные каналы, встроенные в липидные рафты [Lingwood, Simons, 2010], прикреплены к нитям цитоскелета и могут действовать в качестве механизма фокусировки стимулов на механочувствительные каналы [Powers *et al.* 2012]. Механотрансдукция происходит, когда пучки стереоцилий радиально отклоняются в сторону киноцилии. При этом вследствие натяжения нитей открывается один или два катионных канала,

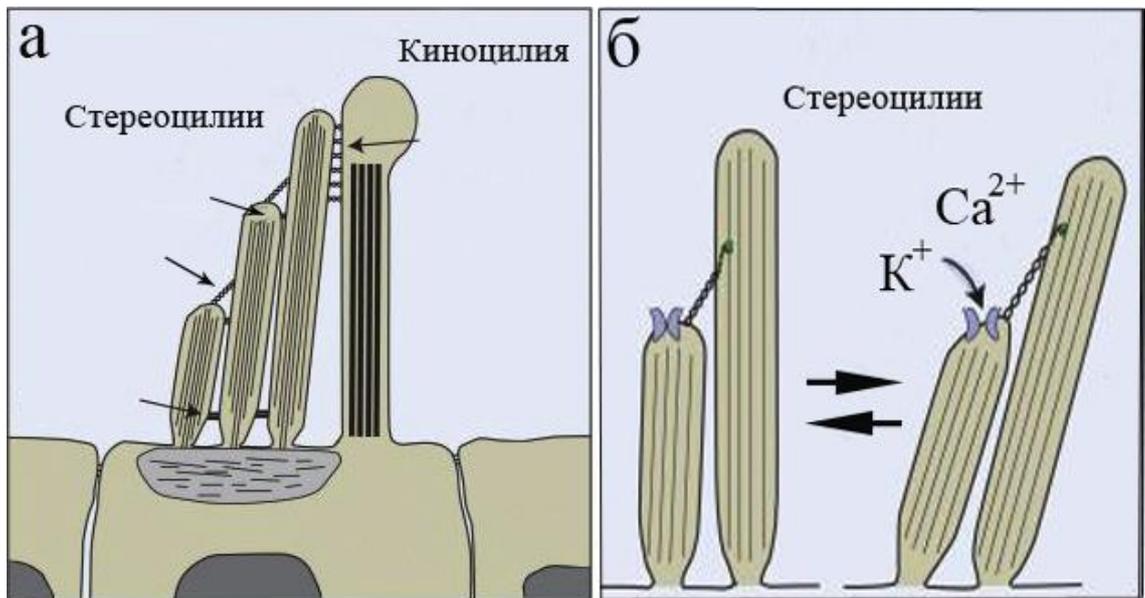


Рисунок 4. Одна из моделей механотрансдукции волосковых клеток органа слуха [Kazmierczak, Müller, 2012; Schwander et al., 2010, с дополнениями]. А – стереоцилии и киноцилия связаны друг с другом посредством нитей цитоскелета (отмечены стрелками); б – радиальное смещение стереоцилий в сторону киноцилии приводит к натяжению нитей между ними, вследствие чего открываются ионные каналы для ионов K^+ и Ca^{2+} , что приводит к деполяризации клетки и высвобождению медиатора. Возвращение стереоцилий в исходное положение приводит к инактивации ионных каналов и уменьшению выделения медиатора.

через которые внутрь клетки поступают ионы K^+ и Ca^{2+} , вызывая деполяризацию клетки и высвобождение медиатора. Волосковые клетки, настроенные на низкочастотные акустические сигналы, имеют низкую проводимость для Ca^{2+} , тогда как клетки, реагирующие на высокие частоты, имеют высокую проводимость для этих ионов [Beurg et al. 2006]. Отклонение стереоцилий в противоположную от киноцилии сторону вызывает гиперполяризацию клетки и прекращение выделения нейромедиатора [Strassmaier, Gillespie, 2002]. Как отмечалось выше, эти исследования были проведены на млекопитающих и в настоящее время нет данных – имеются ли какие-нибудь специфические особенности трансдукции акустических сигналов у рыб.

Известно, что для слуховой системы млекопитающих, птиц и амфибий свойственна тонотопическая частотная идентификация звуков [Engel, 2006]. Например, в улитке млекопитающих и птиц билиарная мембрана пространственно градуирована по восприятию разных частот: самые высокие из них воспринимаются в базальном конце улитки, а самые низкие – в ее апикальном участке. Промежуточные частоты регистрируются между этими двумя зонами [Rubel, Ryals, 1983; Cotanche *et al.*, 1987]. При изучении слуховой системы млекопитающих установлено, что высота волосковых клеток и длина стереоцилий коррелируют с частотой воспринимаемых акустических сигналов: более высокие клетки с длинными стереоцилиями активируются при действии низких частот, а клетки меньшей величины с короткими стереоцилиями настроены на восприятие высоких частот [Pujol *et al.*, 1992].

На существование в слуховых макулах рыб участков, также специализированных для тональной идентификации звуков, указывают результаты экспериментов, в которых после интенсивной акустической стимуляции сигналами разной частоты на разных участках макулы была обнаружена различная степень повреждения волосковых клеток [Smith *et al.*, 2011]. Детальное картирование саккулярной макулы золотого карася, проведенное после таких избирательных повреждений вершин клеток, показало, что высокочастотные звуки воспринимаются ближе к ее ростральному концу, а низкочастотные – к каудальному (**рис. 5**). В этих же исследованиях была выявлена соответствующая корреляция длин киноцилий и стереоцилий чувствительных клеток: в ростральном участке они были короче, чем в каудальном. Тем не менее, нужно отметить, что обнаруженная корреляция между морфологическими параметрами рецепторного отдела клеток и их чувствительностью прослеживается не у всех видов рыб [Platt, Popper, 1984]. Это говорит о более сложном характере пространственного кодирования первичного восприятия звуков у рыб, что вероятно обусловлено

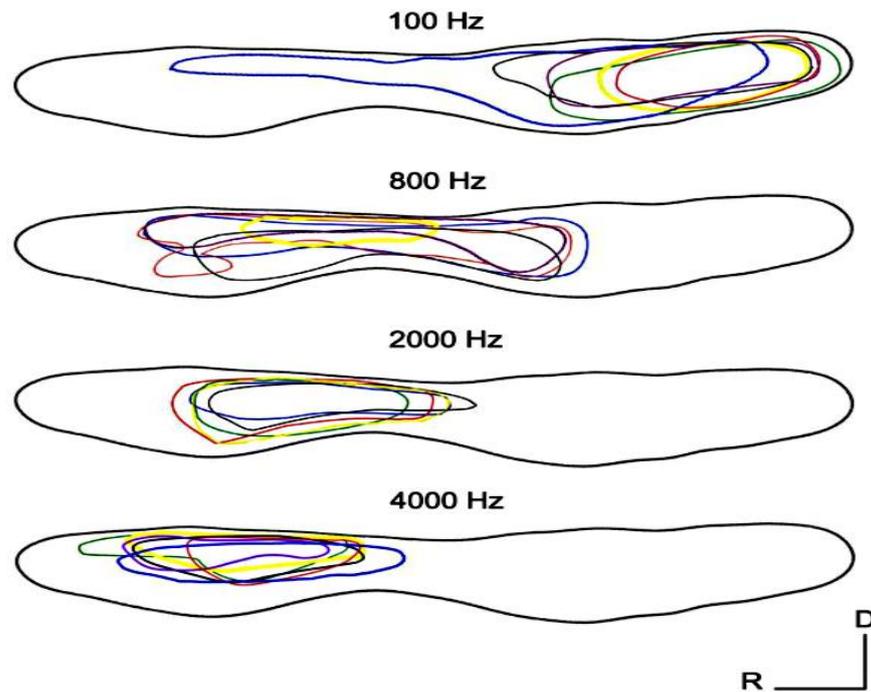


Рисунок 5. Карта тонотопического восприятия волосковыми клетками акустических сигналов в саккулюсе у золотого карася [Smith et al., 2011]. Клетки, чувствительные к высокочастотным сигналам, располагаются в ростральной зоне саккулюса. Клетки, настроенные на восприятие низкочастотных сигналов, локализуются в каудальном участке саккулюса. R и D – соответственно, ростральное и дорсальное направления.

большим разнообразием структурного устройства их саккулярных аппаратов, приспособленных к функционированию в конкретных условиях обитания.

Кроме волосковых клеток в состав саккулярной макулы входят и опорные клетки – микровиллярные эпителиоциты. Сравнительная оценка тонкой организации фибриллярного актина и белков межклеточной адгезии, ассоциированных с опорными клетками, указывает на то, что в отличие от млекопитающих, опорные клетки рыб могут делиться и частично восстанавливать пул волосковых клеток [Monroe *et al.*, 2015].

Внутри макулы волосковые клетки могут быть объединены в хорошо обособленные группы с одинаковым вектором морфологической поляризации [Platt, Popper, 1981]. Под морфологической поляризацией подразумевается ацентричное расположение киноцилии на апикальной

поверхности волосковой клетки, где вектор поляризации направлен от стереоцилий к киноцилии (**рис. 6**) [Porper, 2005; Сапожникова и др., 2007].

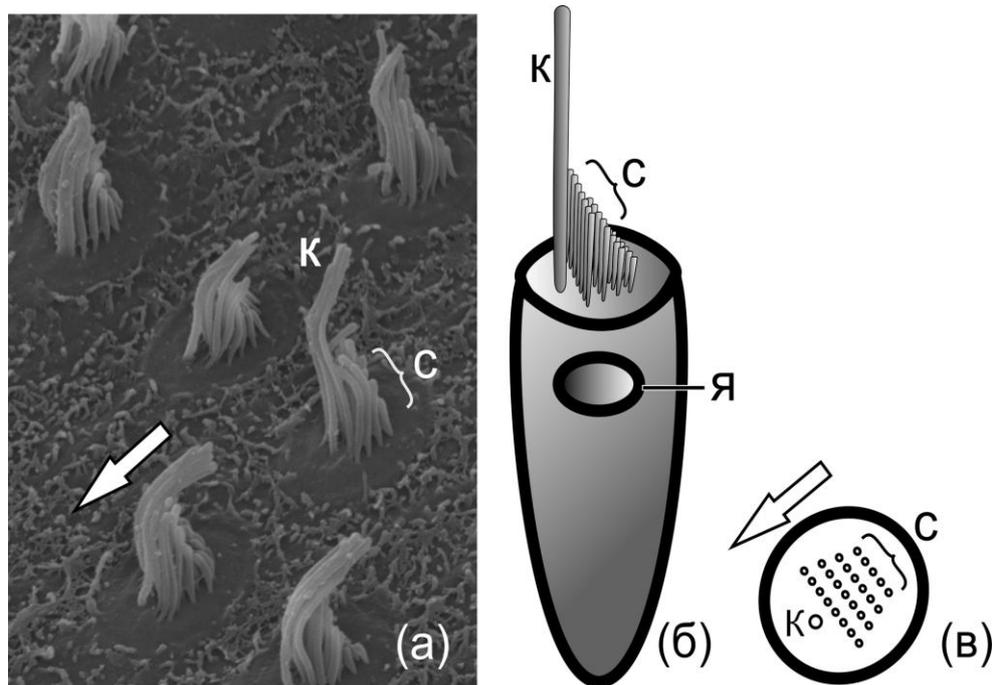


Рисунок 6. Морфологическая поляризация волосковых клеток: а – участок саккулярной макулы с одинаковым вектором поляризации клеток на примере байкальского омуля (сканирующая микроскопия). Б, в – схема расположения киноцилии и стереоцилий на апикальной поверхности волосковой клетки (б – вид сбоку, в – вид сверху); (↓)– вектор поляризации (от стереоцилий к киноцилии), с – стереоцилии, к – киноцилия, я – ядро клетки [Сапожникова и др., 2015].

В зависимости от ориентации групп волосковых клеток выделяют шесть типов морфологической поляризации саккулярных макул [Porper, 1980; Porper, Coombs, 1982]: вертикальный изогнутый, стандартный, двойственный, противоположный, чередующийся и вертикальный (**рис. 7**). Согласно предположению данных авторов, разным таксонам (классам, отрядам, семействам, родам) рыб свойственен исключительно один из указанных типов морфологической поляризации сенсорных клеток.

С помощью лазерной микроскопии, а также вне- и внутриклеточной регистрации электрической активности волосковых клеток недавно удалось достоверно показать, что разнонаправленный характер морфологической

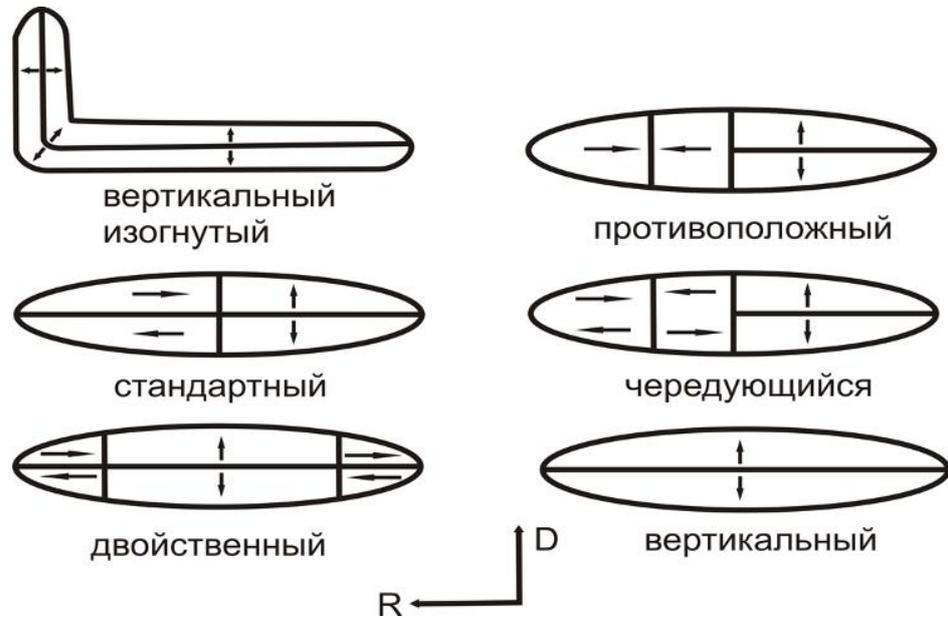


Рисунок 7. Типы морфологической поляризации волосковых клеток в саккулярной макуле у рыб: вертикальный изогнутый, стандартный, двойственный, противоположный, чередующийся и вертикальный. R и D – соответственно, роstralное и дорсальное направления [Popper, Coombs, 1982; Popper, Platt, 1993].

поляризации волосковых клеток лежит в основе направленного слуха у рыб, т.е. их способности локализовать источники акустических сигналов [Popper, Higgs, 2001]. Предполагается также, что наличие того или иного типа поляризации клеток зависит от присутствия у особей данного таксона Веберового аппарата и соединения лабиринта с плавательным пузырем (Popper, Coombs, 1982). Кроме того, установлено, что макулы с чувствительными клетками располагаются в разных плоскостях: саккулярная и лагенарная макулы локализованы в вертикальной плоскости, а утрикулярная – в горизонтальной [Popper, 1980, 2002; Popper, Lu, 2000; Xue, Peterson, 2006]. Таким образом, волосковые клетки отолитовых органов неодинаково ориентированы в трехмерном пространстве, что может иметь важное значение для обеспечения направленного слуха [Rogers, Zeddis, 2008; Schulz-Mirbach *et al.*, 2016]. Характерно, что у разных видов рыб плоскости, в которых локализируются одноименные макулы, обычно имеют разное направление по отношению к сагиттальной плоскости тела рыбы

[Popper, Fay, 2011]. Это говорит о высокой степени пластичности слуховой системы у гидробионтов, приспособленных к функционированию в условиях высокодинамичной водной среды.

1.6.2 Функциональная характеристика слуха у рыб

Важными характеристиками слуха являются частота воспринимаемых звуков, пороговая величина их амплитуды, а также способность рыб распознавать направление на источник звука, то есть, обладать направленным, или дирекционным слухом [Platt, Popper, 1981]. К настоящему времени диапазоны слуха определены у многих видов рыб [Кузнецов, Кузнецов, 2007; Popper et al., 2011; Popper, Fay, 2011; Ramcharitar, Popper, 2004]. Данные, относящиеся к одному и тому же виду, могут отличаться в зависимости от методов исследования и способов акустической стимуляции [Popper, Fay, 2011; Ramcharitar, Popper, 2004]. Рыбы воспринимают звуки в относительно низкочастотной области, преимущественно в диапазоне от нескольких десятков или сотен герц до 3–5 тысяч герц [Popper et al., 2005]. У некоторых рыб верхняя граница слуха может достигать 6000–7000 Гц [Salem, Zaghoul, 2001; Xue, Peterson, 2006; Smith et al., 2011].

Как показывают поведенческие и электрофизиологические эксперименты, рыбы обладают хорошо выраженной способностью частотной дифференцировки акустических сигналов. В диапазоне наибольшей чувствительности они способны определять тональные сигналы, отличающиеся друг от друга по частоте на 5–9 % [Jacobs, Tavalga, 1968]. Используя условно-рефлекторную методику, показано, что золотая рыбка способна различать амплитуду звука в 3–6 дБ, причем пороги такой дифференцировки зависят не от общей амплитуды сравниваемых сигналов, а от их частоты. Минимальный порог (3 дБ) находится в диапазоне наибольшей чувствительности (300–400 Гц), а верхний предел амплитудной

дискриминации находится на частоте 1500 Гц [Jacobs, Tavalga, 1968]. Считается, что данная способность рыб обеспечивает их направленный слух – ориентацию и перемещение по градиенту давления в направлении на источник сигнала [Platt, Popper, 1981].

1.6.3 Роль слуха в поведении рыб

Многие проявления жизнедеятельности рыб сопровождаются акустическими сигналами и несут полезную биологическую информацию не только особям одного вида, но и способствуют их межвидовым взаимодействиям. Особенности акустической коммуникации рыб и роль слуха в организации их сложного поведения подробно освещены во многих работах [Kasumyan, 2009; Ladich, 2014]. Установлено, что слуховой анализатор обеспечивает регуляцию территориальных и иерархических взаимодействий, способствует равномерному расселению рыб, помогает в поиске и выборе репродуктивных партнеров. У гидробионтов, поведение которых не связано с проявлением территориальных, иерархических, агонистических или иных взаимодействий, акустические сигналы могут использоваться в пищевом и защитном поведении, в осуществлении миграций. Эта возможность особенно важна для глубоководных рыб в условиях, когда ограничена или невозможна функция зрительной рецепции, а также для рыб с ночным или сумеречным типом активности [Soares *et al.*, 2016]. Однако, как показывает большое число наблюдений, обмен акустическими сигналами характерен и для рыб с хорошо развитым зрением, жизнь которых приурочена к мелководью с неоднородными и сложно структурированными биотопами [Kasumyan, 2005].

В последние десятилетия наблюдается рост антропогенного акустического воздействия на гидробионтов, включая рыб [Kane *et al.*, 2010; Casper *et al.*, 2013]. В зависимости от интенсивности, такое акустическое "загрязнение" может повлечь за собой механическое повреждение слухового

эпителия и временную или постоянную потерю слуха [Wahlberg, Westerberg, 2005]. Как было сказано выше, кроме самостоятельной роли, слух является также неотъемлемым компонентом обонятельного восприятия и последствия таких воздействий могут очень негативно влиять на естественное поведение рыб.

Заключение по литературному обзору

Анализ современного состояния исследований ольфакторной системы показывает, что к настоящему времени слабо освещены вопросы, касающиеся цитологических аспектов функционирования хеморецепторных клеток у животных на разных этапах их жизненного цикла, когда у них значительно возрастает мотивация в восприятии биологически значимых соединений, в частности, половых феромонов. Отдельные работы, посвященные адаптивным перестройкам обонятельных клеток у рыб в связи с их подготовкой к репродуктивному поведению, не дали пока полных сведений по этому вопросу [Hamdani *et al.*, 2007]. Отсутствие этих данных не позволяет достоверно охарактеризовать морфологические критерии разных уровней чувствительности рецепторных клеток.

Недостаточно изученными являются также вопросы об адаптации периферического отдела обонятельной системы гидробионтов к действию других физико-химических факторов внешней среды. К таким факторам могут быть отнесены перепады гидростатических давлений [Wagner, 2002; Herring, 2002], а также действие различных водорастворимых веществ токсичной или нетоксичной природы [Пашенко, Касумян, 1984; Касумян, 2001; Бянкин, 2001; Ankley *et al.*, 2010]. В современных исследованиях длительное влияние пахучих веществ на обонятельные клетки изучено недостаточно и ограничивается, как правило, электрофизиологическими аспектами таких воздействий на коротких отрезках времени [Zufall, Leinders-Zufall, 2000; Song *et al.* 2008]. Тем не менее, в условиях естественной среды

обитания животных химические агенты нетоксичной природы могут влиять на обонятельную систему и более продолжительное время. Поэтому отдаленные последствия длительной экспозиции одорантов на животных и человека также представляют собой пока нерешенную задачу.

Как правило, длительное воздействие экстремальных факторов на обонятельный аппарат приводит не только к гибели клеток, но и к активизации компенсаторных процессов их нейрогенеза. В настоящее время в нейробиологии ведется интенсивный поиск механизмов, от которых могут зависеть процессы нейрогенеза в центральной нервной системе [Meerlo, 2008; Valu, 2009; Lucassen, 2010]. Это также касается и обонятельной системы, в периферическом отделе которой, как отмечалось выше, за счет местных стволовых клеток также поддерживаются процессы возобновления новых нейральных клеток. Обычно интенсивность нейрогенеза в обонятельном эпителии исследуется на полутонких замороженных, либо депарафинизированных срезах, ограничиваясь несколькими часами после введения той или иной метки [Paschaki *et al.*, 2013; Brann *et al.*, 2014 и др.]. Это не позволяет детально отслеживать пути и механизмы дальнейшей миграции новообразованных клеток в толще эпителия. Таким образом, в настоящее время отсутствуют данные о динамике процессов нейрогенеза на уровне целостного обонятельного эпителия, что является необходимым при решении такого рода задач.

Принципиально важным остается также вопрос о путях пространственного позиционирования новообразованных нейронов в эпителии и дифференцировке дендритов, которые по мере роста встраиваются в поверхность эпителия для обеспечения хеморецепторной функции. Нет также единого мнения о том, каким образом молодой нейрон из всего гиперсемейства генов, кодирующих одорант-связывающие рецепторы, выбирает только один из них, который далее экспрессируется на весь период жизнедеятельности клетки [Magklara *et al.*, 2011; Vassalli *et al.*, 2011; Clowney *et al.*, 2012; Markenscoff-Papadimitriou *et al.*, 2014]. В

приведенном обзоре отмечалось, что клеточные элементы обонятельного аппарата животных возобновляются на всем протяжении их жизненного цикла и должны обеспечивать восприятие всего спектра одорантов, которые представлены в конкретной среде обитания. Именно поэтому в этой проблеме наиболее остро встает вопрос о соотношении влияния генетических механизмов и химических агентов внешней среды, совместное участие которых, по мнению ряда авторов [Serizawa *et al.*, 2003; Shykind *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2014] в конечном итоге и определяют специфичность обонятельных клеток. Сейчас эти вопросы в основном исследуются с помощью молекулярно-генетических методов, которые дали пока только гипотетические модели того, каким образом пахучие вещества внешней среды могут быть вовлечены в процессы моногенной и моноаллельной экспрессии обонятельных рецепторов [Shykind, 2005 и др.]. Цитологические перестройки клеток, которые могут сопровождать процессы специфической «настройки» рецепторных клеток на избирательное восприятие запахов, до настоящего времени остаются неизвестными.

Обзор литературы показывает, что восприятие химических сигналов в естественной среде, как правило, сопряжено с функционированием других сенсорных систем, в частности, со слуховым аппаратом [Kulahci *et al.*, 2014], что позволяет животным формировать более целостное представление о физико-химических параметрах внешней среды. Это обстоятельство дает основание для совместного изучения адаптивных особенностей органов обоняния и слуха у рыб, как в плане их структурного полиморфизма, так и с точки зрения их функциональных возможностей. Как и в обонянии, в изучении слухового анализатора рыб эти вопросы еще слабо изучены и в последнее время сосредоточены на саккулярной макуле, где локализуется периферический отдел его организации [Popper *et al.*, 2005; Popper, 2011 и др.]. Нам кажется, что параллельное изучение обонятельной и слуховой систем на одних и тех же видах рыб в перспективе может дать полезную информацию о механизмах конвергенции этих двух сенсорных каналов, что

необходимо для обеспечения сложного поведения гидробионтов в конкретных условиях обитания. Для решения поставленных задач мы использовали разных представителей байкальской ихтиофауны, включая близкородственные виды рыб сем. Cottidae и Coregonidae, обонятельная и слуховая система которых в связи с их приспособлением к разнородным условиям обитания в Байкале максимально адаптирована к действию различных физико-химических факторов водной среды.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Методологические подходы, используемые для решения поставленных задач

Задача 1. Изучение адаптивных перестроек ольфакторного аппарата рыб на разных этапах их жизненного цикла и нерестового поведения проводили на эндемичном представителе рогатковидных рыб сем. Cottidae озера Байкал – желтокрылке (*Cottocomephorus grewingkii* (Dybowski, 1874) (иллюстрации рыб и особенности их поведения приведены в разделе 2.4).

Ранее байкальские Cottoidei явились предметом интенсивных исследований, связанных с изучением роли химической коммуникации в организации репродуктивного поведения рыб. У самцов и самок желтокрылок удалось выявить источники половых феромонов, идентифицировать их химическую природу, дать оценку эффективности их действия в связи со степенью зрелости реципиента, а также в зависимости от физиологического состояния особи, являющейся их источником [Дмитриева, Остроумов, 1992; Кацель, Валеев, 1986; Валеева, Дмитриева, 1994; Валеева, 1995; Остроумов, 1997]. С помощью поведенческого биотестирования установлено, что как у самцов, так и у самок чувствительность обоняния к этим веществам в разные фазы жизни неодинакова и достигает максимальных величин в репродуктивный период. Причем, каждая из этих фаз характеризуется строго определенным поведением.

В межнерестовый период рыбы не проявляют достоверных реакций на половые феромоны. В период вызревания и вымета половых продуктов (5–6 стадия зрелости) эта реакция становится наибольшей, а при переходе в фазу родительского поведения – резко снижается. Такая динамика поведения и ольфакторной чувствительности использовалась нами в качестве модели для выявления корреляций между хемочувствительностью гидробионта и

уровнем ультраструктурного развития клеток периферического отдела его обонятельного анализатора – сенсорного эпителия.

В рамках этой модели целесообразно более детально остановиться на экологии желтокрылок и особенностях их размножения. Биология этих видов рогатковидных рыб достаточно хорошо изучена [Талиев, 1955]. В межнерестовый период рыбы не имеют полового деморфизма и их гонады соответствуют 3–4 стадии зрелости. Размножение происходит в разные сезоны (февраль – март, май и август) и начинается с подхода самцов к прибрежной зоне озера, где на небольших глубинах (0,5–3 м.) самцы выбирают себе наиболее удобный камень с полостью под ним. К этому времени самцы находятся на 5–6 стадии созревания и перестают питаться. Самец обладает сложным стереотипом нерестового поведения, включающего подготовку гнезда, привлечение самок, оплодотворение икры и заботу о потомстве. В это время, в отличие от самки, он приобретает брачную окраску – грудные и спинные плавники становятся лимонно-желтыми. Площадь и толщина грудных плавников увеличивается. На лучах, с внутренней стороны грудных плавников появляются эпителиальные бугорки. У самца, готового к нересту, цвет головы и пигментированных участков тела может изменяться от светло-песочного до угольно-черного. На дорсальной стороне головы образуются многочисленные эпителиальные шипики, которые способствуют процессу формирования кладки, когда самец «разглаживает» икру с внутренней стороны гнезда для ее эффективной аэрации. Стараясь привлечь самку в гнездо, самец производит вентилирующие движения широко расправленными грудными плавниками и мелко вибрирует телом. Такая поведенческая активность визуально сигнализирует самке о его готовности к нересту. Оказалось, что яркий брачный наряд самца, располагающего к тому же большим арсеналом поз привлечения, не является достаточными для захода самки в гнездо. В этом отношении бычковые схожи с другими видами яйцекладущих рыб, самцы которых в процессе нереста выделяют вещества, необходимые не только для привлечения самок, но и, что особенно важно,

для окончательного созревания их половых продуктов. Установлено, что у самцов бычковых рыб во время размножения увеличивается объем мочевого пузыря, в связи с чем предполагалось, что моча может оказывать привлекающее действие на самок [Черняев, 1979]. В экспериментах с использованием поведенческого биотестирования установлено, что даже при большом разведении ($1:10^{-12}$ % (об)) компоненты мочи сохраняют свое сигнальное значение для самок [Дмитриева, Остроумов, 1992; Dmitrieva, Kozlov, 2010]. Это говорит об их высокой чувствительности к биологически активным веществам, содержащимся в моче. Методами масс-спектрометрии и абсорбционной спектроскопии показано [Кацель и др., 1987], что половая феромональная система самца желтокрылки включает три компонента, каждый из которых выполняет специфическую функцию. Фарнезол выполняет функцию аттрактанта, 11β гидрокситестостерон относится к компонентам с праймерным эффектом действия (ускоряет половое созревание самок) и тестостерон, который непосредственно вызывает половое поведение у самок, т.е., является афродизиак.

В формировании репродуктивного поведения самца определяющая роль также принадлежит половым феромонам, источником которых является половозрелая самка [Остроумов, 1987; Валеев и др., 1987]. Эти вещества сосредоточены в овариальной жидкости и освобождаются при овуляции. Половая феромональная система самки включает два вещества: 17α -гидроксипрогестерон (праймерный компонент, который вызывает гипертрофию мочевого пузыря у самца и созревание семенников) и тестостерон, выполняющий функцию афродизиака. Показано, что подача в аквариум овариальной жидкости в разведении $1:10^{-12}$ % (об) вызывает у самца весь комплекс реакций, свойственных ему в присутствии самки – занятие гнезда, потемнение головы и демонстрация поз привлечения. Наряду с коротколатентными поведенческими реакциями, у самцов выявляются также и глубокие, постепенно формирующиеся физиологические изменения, относящиеся к праймерному, т.е. длительно развивающемуся эффекту

действия феромонов. В частности, установлено, что продолжительная стимуляция раствором овариальной жидкости вызывает у самцов ускорение созревания половых продуктов. Таким образом, физиологическая готовность самца к оплодотворению икры напрямую зависит от зрелости половых гонад самки, выделяющей во время нереста видоспецифичные вещества, которые для самца имеют важное сигнальное значение. Очевидно, что его обоняние в этот ответственный период должно обладать к этим химическим агентам повышенной чувствительностью, иначе физиологическая и физическая синхронизация производителей становится невозможной. О ведущей роли обонятельного анализатора в рецепции половых феромонов также свидетельствуют эксперименты, в которых показано, что у аносмированных самцов поведенческие ответы на действие феромонов самки резко снижены [Остроумов, 1987].

Таким образом, поведенческие эксперименты указывают на то, что в условиях ведущего биологического инстинкта – воспроизводства – на обонятельную систему рыб ложится основная функциональная нагрузка, от надежности работы которой зависит сохранение вида.

Несмотря на то, что возрастание ольфакторной чувствительности наблюдается как у самцов, так и у самок, в качестве основного объекта для изучения адаптивных перестроек обонятельных клеток нами был выбран самец. Такое предпочтение было сделано в связи с той значительной ролью, которую он выполняет во время нереста. В отличие от самки, участие самца в размножении не ограничивается выметом половых продуктов. Его репродуктивное поведение занимает более продолжительный промежуток времени. Оно начинается поиском гнезда и заканчивается охраной кладки, которая продолжается на протяжении 20–40 сут. до начала выклева личинок. За это время самцы не проявляют пищевого поведения, теряют вес, характерную нерестовую пигментацию и могут гибнуть [Талиев, 1955]. Кроме того, между самцом и самкой имеется существенная разница временного интервала, в течение которого у них повышается уровень

обонятельной чувствительности. В отличие от самки, которая покидает гнездо сразу после вымета икры, самец еще несколько суток "ожидает" подхода других самок. Отмечается, что самец может оплодотворять икру 6–10 самок [Дмитриева, Остроумов, 1992]. Именно этот, достаточно широкий, отрезок времени давал возможность длительного наблюдения за ультраструктурой обонятельных клеток в фазу их повышенной чувствительности к восприятию половых феромонов.

Представляется, что выбранная модель жизненного цикла желтокрылок позволяет выявить адаптивные возможности их обонятельного аппарата, хемочувствительность которого в отношении феромонов существенно возрастает, что обеспечивает смену форм их репродуктивного поведения.

Морфологический материал брали у гидробионтов в межнерестовый период (3–4 стадии зрелости) с глубины 100 м ($n = 20$), во время размножения (5–6 стадии зрелости) в прибрежной зоне озера в местах их естественных нерестилищ ($n = 30$), а также в фазу перехода самцов к охране оплодотворенной кладки ($n = 10$). Стадия зрелости определялась по гонадосоматическому индексу [Кошелев, 1984].

Задача 2. Изучение процессов апоптоза и компенсаторного нейрогенеза проведено на каменной широколобке (*Paracottus knerii* Dybowski, 1874), жемчужном гурами (*Trichogaster leeri* Bleeker, 1852) и обыкновенном гольяне (*Phoxinus phoxinus* Linnaeus, 1758). Каменную широколобку (*Paracottus knerii* Dybowski, 1874) для контрольной и экспериментальной групп ($n = 15$ для каждой группы) отлавливали в межнерестовый период в прибрежной зоне Южного Байкала. После переноса из естественной среды рыб адаптировали в течение 7 суток в аквариумах (13 л.) без грунта с непрерывно обновляемой водой при температуре $+5^{\circ}\text{C}$. В каждом из аквариумов находилась одна рыба. Далее, обновление воды прекращалось, и к экспериментальным рыбам добавляли гетерогенную смесь аминокислот и пептидов (массовая доля – 0,0002 %; Tryptone, Helicon), полученную обработкой трипсином молочного белка – казеина. Данная

концентрация вносимых веществ поддерживалась в течение 15 суток, за исключением ночного времени (протяженностью 12 час.), когда рыбы находились в условиях непрерывного протока свежей воды. Контрольные особи содержались в отдельных аквариумах в аналогичных условиях без добавления действующих веществ. По истечении времени обонятельные розетки контрольных и экспериментальных рыб извлекали и готовили для исследования с помощью просвечивающей и лазерной конфокальной микроскопии. Аналогичные эксперименты с делением рыб на контрольные и экспериментальные группы проводили на жемчужном гурами и обыкновенном гольяне ($n = 10$ для каждой группы). В этой серии исследований рыб содержали при температуре $+20^{\circ}\text{C}$ в присутствии действующих веществ непрерывно. Данная часть работы выполнена на базе уникальной научной установки «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» ЛИН СО РАН.

В ольфакторном эпителии как контрольных, так и экспериментальных рыб определяли интенсивность апоптоза [TUNEL, Gavrieli, et al. 1992] и пролиферативной активности с помощью бромдезоксипуридина (BrdU), [Gratzner, 1982]. Причем, у широколобки митотическую активность оценивали через 12 часов, а у гурами – на двух сроках: через 12 ч. и 36 ч. после внутрибрюшинной инъекции BrdU. Для конфокальной микроскопии образцы эпителия из обеих групп окрашивали также на ядерный материал, функционально активные митохондрии и активные формы кислорода (АФК). Ультраструктурные особенности препаратов исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Задача 3. Для изучения морфологических особенностей ранних стадий дифференцировки и миграции обонятельных нейронов препараты окрашивали на ядерный материал и актиновые микрофиламенты. Видовые особенности структурной организации актиновых микрофиламентов в ольфакторном аппарате исследовали у желтокрылой (*C. grewinkii*), каменной

(*P. knerii*), большеголовой (*Batrachocottus baicalensis* Dybowski, 1874), длиннокрылой (*Cottocomephorus inermis* Jakowlew, 1890) широколобок, а также у гурами (*T. leerii*) ($n = 7$ для каждого вида).

Все применяемые методы окрашивания препаратов, а также нейрогенез и пути дальнейшей транспортировки новообразованных клеток в эпителии изучены с помощью конфокальной микроскопии только на целостных обонятельных розетках. Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программ «Imaris® Bitplane 7.2.3» и «ZEN», что позволило объективно оценивать цитохимические изменения, возникающие в сенсорном аппарате рыб в результате продолжительного воздействия одорантов нетоксичной природы. Таким образом, использование этих подходов позволило не только определить интенсивность нейрогенеза у контрольных и опытных рыб, но и охарактеризовать динамику их топографического распределения в эпителии во времени. Кроме того, селективная окраска клеток на ядерный материал, функционально активные митохондрии и актиновые микрофиламенты дала возможность проследить структурные перестройки молодых нейронов в процессе их миграции через толщу эпителия и после установления контакта дендрита с внешней средой.

Задача 4. Для исследования влияния фенола на обонятельный эпителий рыб, самцов желтокрылок (*C. grewingkii*; $n = 10$) содержали в аквариумах (13 л.) без грунта с добавлением кристаллического фенола из расчета 3 мг/л. в течение 4 суток. Эксперименты проводили при стабильной температуре ($14 \pm 1^\circ \text{C}$), аэрации и гидрохимических параметрах в условиях пресноводного аквариумного комплекса (ПАК) ЛИН СО РАН. Контрольных рыб ($n = 10$) содержали в аналогичных условиях без добавления фенола. Рыб за этот период кормили однократно дождевыми червями и зоопланктоном.

Задача 5. Для сравнительной оценки цитохимических особенностей сенсорного аппарата у глубоководных рыб исследовали обонятельные розетки у представителей трех видов рогатковидных рыб (Cottidae) оз. Байкал – большой голомянки (*Comephorus baicalensis* Pallas, 1776),

длиннокрылой (*C. inermis*) и жирной (*Batrachocottus nikolskii* Berg, 1900) широколобок, обитающих до максимальных глубин озера Байкал и имеющих характерные для них стратегии поведения. Для электронной и лазерной конфокальной микроскопии использованы обонятельные розетки от 17 особей каждого вида.

Задача 6. Для выявления межвидовых различий в ультраструктуре саккулярных макул у рогатковидных рыб выбраны четыре вида, значительно отличающиеся образом жизни: каменная широколобка (*P. knerii*); северобайкальская желтокрылка (*Cottocomephorus alexandrae* Taliev, 1935; n=50); большая голомянка (*C. baicalensis*; n=50) и малая голомянка (*Comephorus dybowski* Korotneff, 1905; n=50), а также генетически близкие виды байкальских сиговых рыб, относящиеся к разным экологическим группам: байкальский омуль (*Coregonus autumnalis migratorius* Georgi, 1775; n=96) пелагической и придонно-глубоководной морфо-экологических групп, мелководный озерно-речной сиг, или пыжьян (*C. lavaretus pidschian* Gmelin, 1788; n=35) и озерный сиг (*C. baicalensis* Dybowski, 1876; n=42).

Задача 7. Для определения диапазона акустической чувствительности у рогатковидных и сиговых рыб использовали условно-рефлекторный метод. Для выработки условного рефлекса на звук рыб (30 особей каждого вида) содержали при ежедневной стимуляции разночастотным звуком до 1,5 месяцев (октябрь-ноябрь) при одновременном пищевом подкреплении (совпадающий рефлекс). Звук в эксперименте подавался с помощью подводного громкоговорителя UW-30 Electro-Voice с рабочими частотами 100 Гц–100кГц и усилителя мощности. Аппаратура для контроля формы сигналов и измерения амплитуды звукового давления сигналов включала откалиброванный пьезокерамический гидрофон ТС4013, усилитель, осциллограф АК ИП 4113/1, модуль АЦП Е14-440, вольтметр Meterman 34XDMM (рис. 8). Для исключения выработки условного рефлекса на временной интервал между сочетаниями звук/безусловный стимул, его произвольно изменяли от 1 до 5 с, фиксируя поведение рыб в течение 10–30 с

перед и после каждого опыта. Показано, что у байкальских рыб условный рефлекс на звук вырабатывается после 25–30 сочетаний акустического сигнала и его пищевого подкрепления. Эксперименты проводили в 30 повторностях для отдельного вида на тестируемых частотах от 100 Гц до 5 кГц (через каждые 100 Гц) при громкости звука от 0 до 160 дБ (через каждые

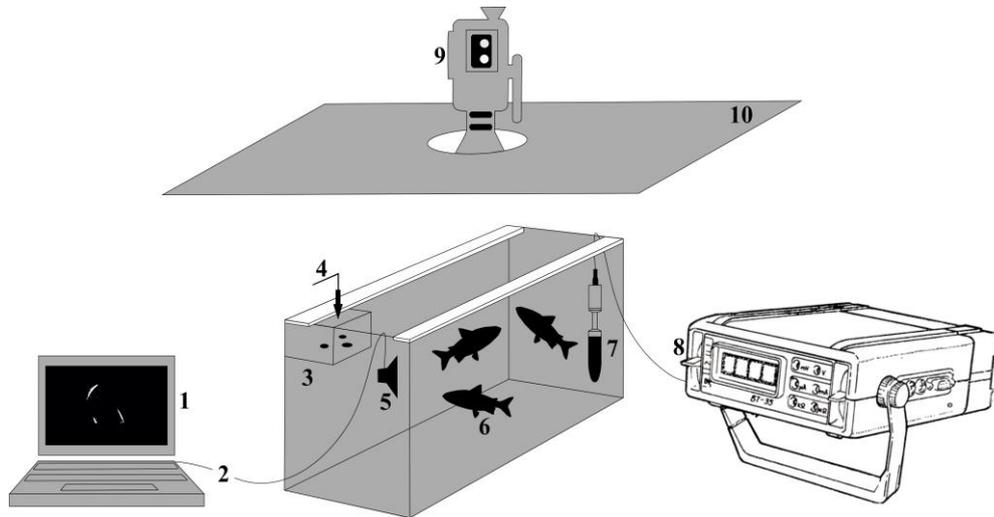


Рисунок 8. Схема экспериментальной установки для определения частотных спектров чувствительности у байкальских рыб: компьютер с программой EthoStudio (1), усилитель мощности (2), кормушка (3) для пищевого подкрепления условного рефлекса на звук (4), подводный громкоговоритель UW-30 Electro-Voice (5), аквариум с объектами трассировки (6), пьезокерамический гидрофон TC4013 (7), осциллограф АК ИП 4113/1, модуль АЦП E14-440, вольтметр Meterman 34XDMM (8), цифровая видеокамера HDR-NC5 (9) и матовое стекло (10).

5 дБ, относительно 1 мкПа). Для выявления максимальной чувствительности использовался тест «открытое поле», в котором измерялась двигательная активность рыб после подачи звуковых сигналов разной частоты, на которые ранее был воспитан условный рефлекс. О чувствительности рыб к звуковому сигналу судили визуально и по созданным в программе EthoStudio картам плотности вероятности и активности особей в зоне подачи пищи и наличию положительной реакции рыб на определенный акустический сигнал без пищевого подкрепления (активные перемещения, рывковые движения). В качестве контроля тестировали поведение рыб без звукового воздействия.

Статистическая обработка полученных слуховых порогов производилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе R. В экспериментах по изучению частотной избирательности сенсорных клеток саккулярного эпителия гибридов пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂, (хорошо адаптированных к искусственным условиям содержания) в течение 24 часов подавали интенсивный однотональный звуковой сигнал (с частотой 3000 Гц, интенсивностью 160 дБ). Опыт проводился в 6 повторностях, включая 3 контрольные эксперимента без подачи звукового сигнала. После интенсивной стимуляции сенсорный эпителий опытных и у контрольных особей исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии.

2.2 Методы микроскопии

2.2.1. Электронная микроскопия. Для просвечивающей микроскопии обонятельные розетки и саккулярные макулы рыб фиксировали в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) 1 час, промывали тем же буфером, дофиксировали 2%-ным раствором четырехоксида осмия (1–3 час) и заливали в эпоксидную смолу. Срезы изготавливали на ультрамикротоме Ultracut R (Leica), которые после контрастирования в цитрате свинца по Рейнольдсу [Reynolds, 1963], исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Leo 906 E (Zeiss, Германия). Для изучения поверхностных структур сенсорных органов фиксированный и обезвоженный в спирте материал высушивали при критической точке в напылительной установке JEE-4B (Jeol, Япония), далее на аппарате SCD 004 (Balzers) напыляли золотом и исследовали в сканирующих электронных микроскопах Philips 525M (Голландия) и Quanta 200 (FEI Company).

Сравнительный анализ количества рибосом на единицу площади в цитоплазме обонятельных рецепторных клеток у контрольных и экспериментальных рыб проводили в программе Image-Pro Plus. Для

получения цифровых данных оптической плотности рибосом выбирали участки цитоплазмы в перикарионе клеток, не содержащие каналов эндоплазматического ретикулума. С этой целью проанализировано по 30 изображений рецепторных клеток из обонятельного эпителия контрольных и опытных групп рыб. Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 8.0.

Для морфометрического анализа саккулярного эпителия с помощью программы Image-Pro Plus определяли длину, ширину и площадь макулы, длину киноцилий и стереоцилий, а также угол отклонения сенсорных элементов (киноцилии относительно стереоцилий). Длину каждой макулы измеряли от ее рострального конца до каудального. Ширину макулы определяли в трех ее участках – в ростральном, центральном и каудальном. Процентное соотношение площадей отдельных зон макулы с различной поляризацией рассчитывали относительно ее общей площади. Для классификации сенсорных клеток использовали кластерный метод анализа, включая методы k-средних и иерархической кластеризации с помощью программы Statistica 8.0. Количественный показатель сходства волосковых клеток, принадлежащих к одному кластеру, рассчитывали на основании длин киноцилий и максимальной длины стереоцилий.

2.2.2 Атомно-силовая микроскопия (АСМ) топографии отолитов

Образцы саккулярных отолитов рогатковидных и сиговых рыб, предварительно зафиксированные по описанной выше методике (раздел 2.2.1), изучали методом АСМ в полуконтактной моде с помощью мультимодового сканирующего зондового микроскопа Solver P-47 (НТ-МДТ, Москва) со сканером 14 мкм (сканирование образцом) на воздухе при комнатной температуре. В качестве зонда использовали кремниевый кантилевер с резонансной частотой 200 кГц. Изображения (256x256 точек) получали при скорости сканирования 1,5–2 Гц, одновременно записывали

изображения рельефа и фазового контраста, из них вычитали кривые 2-го порядка. На каждом образце изучали несколько разных областей в разных масштабах изображений (от 5 до 0,5 мкм).

2.2.3 Световая микроскопия ядрышек обонятельных клеток

Из зафиксированных в уксусно-метиловой смеси (1:3) ольфакторных розеток получали воздушно-высушенные цитологические препараты путем «стряхивания-отпечатывания» [Баранов, 1989]. Данный приём позволяет получать монослой ядер диссоциированных клеток на предметном стекле. Для выявления ядрышек препараты окрашивали с помощью азотнокислого серебра по методу Ховелла и Блейка [Howell, Black, 1980] и исследовали на инвертированном микроскопе проходящего света Axiovert 200 (Zeiss, Германия). На цифровых фотографиях измеряли площади ядрышек и ядер. Структурно-функциональную активность базальных клеток оценивали по значению ядрышкового индекса InI : $InI = S_{nl} / S_N \times 100$, где S_{nl} – площадь ядрышка (nl – сокращение от англ. nucleolus); S_N – площадь ядра (N – сокращение от англ. nucleus). Компьютерную обработку числовых данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0.

2.2.4 Лазерная конфокальная микроскопия

Тест на функционально-активные митохондрии. Обонятельные розетки отмывали от слизи средой 199 (Sigma-Aldrich, USA). После этого образцы тканей инкубировали 25 мин с 25 nM MitoTracker® Orange (ex/em 554/576 nm) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), растворенном в среде 199. Далее ткань фиксировали 2 % параформальдегидом в течение 15 мин. Ядра клеток окрашивали DAPI (ex/em 340/488 nm), 0,5 мкг/мл (Sigma-Aldrich, USA) в течение 15 мин. Полученные препараты заключали в ProLong® Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) и исследовали в LSM 710

(Zeiss, Германия); лазеры 405, 561 nm; фильтры: Ch1 410–552.

Тест на активные формы кислорода. Для выявления областей продукции активных форм кислорода образцы ольфакторного эпителия инкубировали 30 мин с 5 μ M CellROX® Deep Red Reagent (ex/em 644/665 nm) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), растворенном в среде 199. Далее ткань фиксировали в 2 % параформальдегиде в течение 15 мин. Ядра клеток окрашивали DAPI (ex/em 340/488 nm), 0,5 мкг/мл (Sigma-Aldrich, USA) в течение 15 мин. Полученные препараты заключали в ProLong® Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) и исследовали в LSM 710 (Zeiss, Germany); лазеры: 405, 561 nm; фильтры: Ch1 410–522.

Цитохимическое выявление программированной гибели клеток проводили методом TUNEL [Gavrieli, et al. 1992] с помощью набора реагентов Click-iT™ TUNEL Alexa Fluor™ 488 Imaging Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) согласно рекомендациям производителя. Процесс подготовки материала включал следующие этапы: фиксация ткани в 4 % параформальдегиде на фосфатном буфере (15 мин), промывка в р-ре Хэнкса (15 мин), пермеабилзация в 0,25 % тритона на фосфатном буфере (20 мин), промывка в деионизованной воде (три раза по 5 мин), инкубация в TdT (терминальная дезоксиинуклеотидил-трансфераза) реакционном буфере (10 мин), промывка, инкубация в TdT реакционной смеси (TdT буфер (94 мкл)+ EdUTP (2 мкл) + TdT (4 мкл) 60 мин при 37⁰C, промывка в 3 % р-ре BSA (4 мин), инкубация в Click-iT реакционной смеси (в темноте), промывка в 3 % BSA на фосфатном буфере (5 мин), инкубация с Alexa Fluor® 488 azide (ex/em 495/519 nm) 15 мин в темноте, промывка в р-ре Хэнкса (10 мин), окраска ядер Hoechst 33342 (ex/em 350/460), монтаж на стекло в капле ProLong® Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Далее препараты исследовали в LSM 710 (Zeiss, Germany); лазеры: канал 1 – 405 nm, Ch1: 410–499; канал 2 – 488 nm, Ch2: 499–725. На готовых препаратах погибшие ядра клеток давали флуоресценцию в зеленой части спектра, а жизнеспособные – в синей.

Оценка пролиферативной активности в обонятельном эпителии производилась с помощью бромдезоксипуридина (BrdU) [Gratzner,1982], который включается в ДНК при ее репликации в S-фазу клеточного цикла. Изотоничный раствор BrdU (10 мг/мл) вводили контрольным и экспериментальным рыбам внутривентрально из расчета 5 мкл на 1 г. веса животного. Через 12 и 36 час. после инъекции BrdU обонятельные розетки извлекали и, используя набор реагентов BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit (Becton Dickinson, USA), проводили фиксацию, пермеабиллизацию и мечение антителами с FITC (ex/em 490/525 nm) к BrdU. Тотальное окрашивание хроматина осуществляли 7-аминоактиномицином D (7-AAD; ex/em 546/647 nm). Полученные препараты заключали в ProLong® Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) и исследовали в LSM 710 (Zeiss, Germany); лазеры: канал 1 – 561 nm, Ch1: 500–550; канал 2 – 488 nm, Ch2: 610–691. С помощью пакета программ Imaris® Bitplane 7.2.3 моделировали объем, занимаемый сигналом 7-AAD, в котором оценивали количество FITC-позитивных ядер клеток. Полученную информацию использовали для подсчета клеток, включивших BrdU. Пролиферативную активность анализировали методами непараметрической статистики. Межгрупповые различия оценивали критерием Манна-Уитни, применяя пакет программ Statistica 10 и Microsoft Excel 2010.

Визуализация актиновых микрофиламентов. После отмывки в среде 199, розетки рыб фиксировали в 2 % параформе (15 мин), пермеабиллизовали в 1 % растворе ТритонX100 (20 мин) и обрабатывали фаллоидином с FITC (ex/em 490/525 nm), 40 мин. Ядра клеток окрашивали DAPI (ex/em 340/488 nm), 0,5 мкг/мл (Sigma-Aldrich, USA) в течение 15 мин. После промывки препараты заключали в ProLong® Gold antifade reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) и исследовали в LSM 710 (Zeiss Germany); лазеры: канал 1 – 405 nm, Ch1: 410–507; канал 2 – 488 nm, Ch2: 500–749.

2.2.5 Анализ изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии и статистическая обработка данных

Исследования цитохимических особенностей сенсорного аппарата рыб в контроле и при действии на него различных физико-химических факторов внешней среды проводили только на целостных обонятельных розетках. По нашему мнению, использование в этих целях полутонких срезов не дает возможности объективно оценивать масштабы и топографию происходящих в эпителии перестроек. Все изображения, полученные с помощью LSM 710 (Zeiss), обрабатывали с помощью двух программ: ZEN 2010 (Zeiss) и Imaris® Bitplane 7.2.3. В зависимости от поставленной задачи исследуемая ткань анализировалась послойно в виде 2D- срезов, объемных Z-стеков, или путем формирования ортогональных проекций выбранных участков. Для объективной количественной оценки объемов, занимаемых продуктами цитохимических реакций (на функционально активные митохондрии, активные формы кислорода, пролиферативную активность клеток и их программированную гибель), как уже отмечалось выше, использовали только тотальные препараты обонятельных складок, формирующих розетку. С помощью пакета программ Imaris® Bitplane 7.2.3 Z-стеки изображений ольфакторных складок разделяли на отдельные, более мелкие (1×10^6 мкм³) фрагменты (**рис. 9**). В каждом из созданных таким образом Z-стеков определяли объемы, занимаемые флуоресцентным маркером (**рис. 10**). Всю полученную по каждому из выделенных фрагментов информацию суммировали и обрабатывали методами непараметрической статистики. Этот подход позволил статистически более точно и адекватно определять динамику цитохимических перестроек, которые возникают в обонятельных розетках в ходе экспериментов. Межгрупповые различия оценивали критерием Краскела-Уоллиса, применяя пакет программ Statistica 10 и Microsoft Excel 2010.

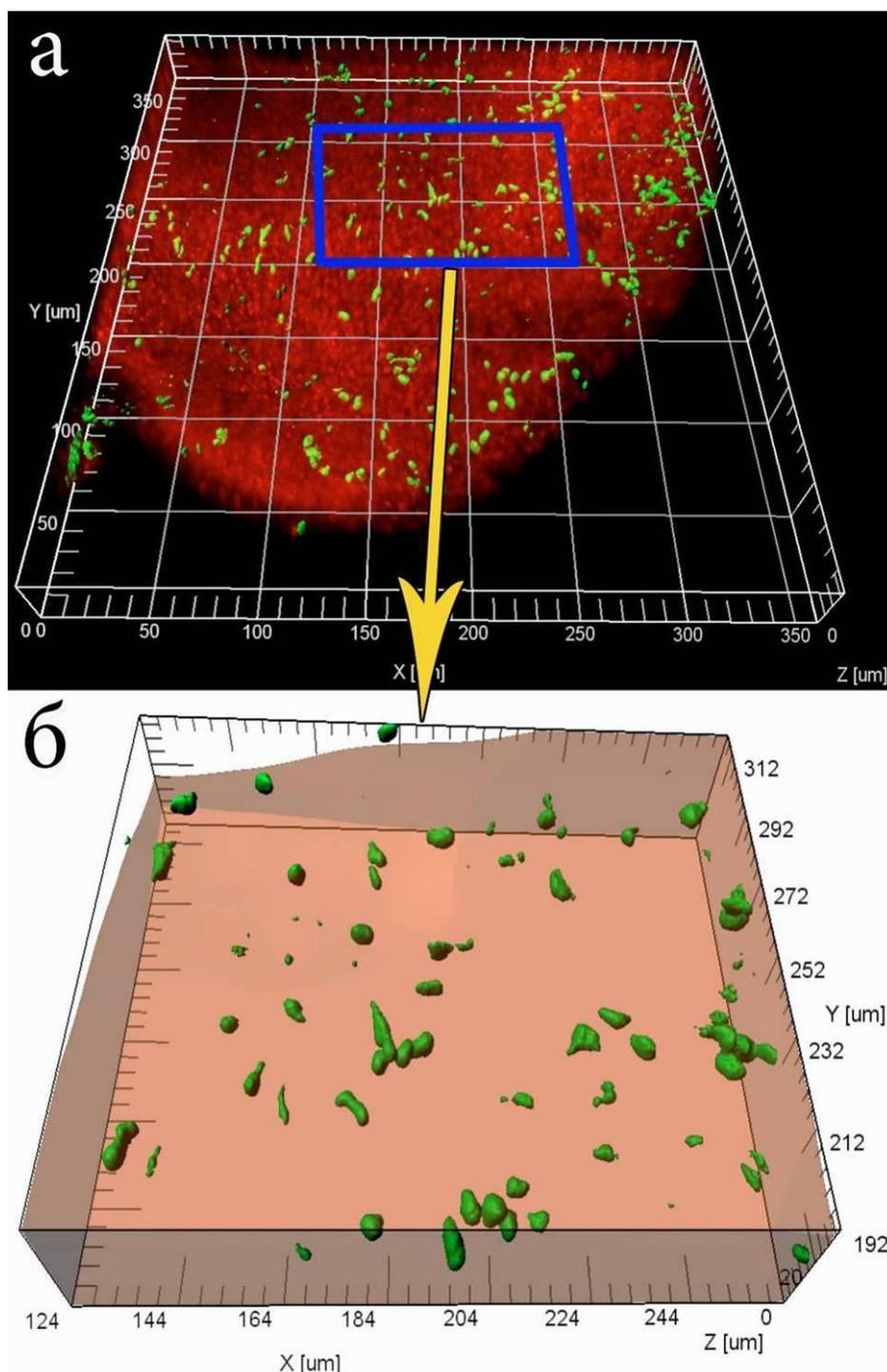


Рисунок 9. Алгоритм количественной оценки объемов, занимаемых продуктами цитохимических реакций в обонятельном эпителии исследуемых рыб (программа Imaris® Bitplane 7.2.3.). Целостная обонятельная складка (а) разделяется на фрагменты (один из них обозначен в синей рамке), каждый из которых анализируется отдельно. В выбранном участке ткани выделяется весь массив флуоресцентных сигналов, объем которых далее определяется автоматически и суммируется (б).

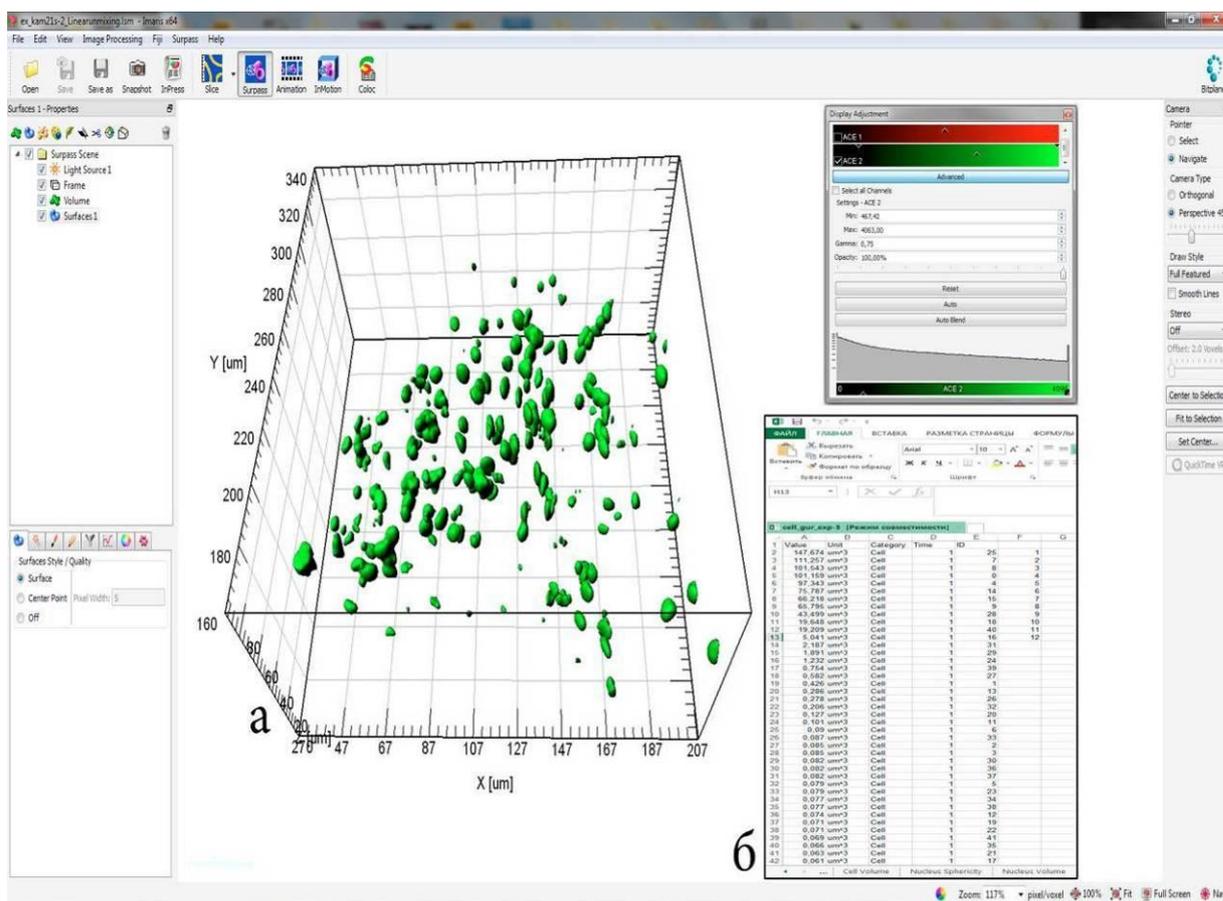


Рисунок 10. Статистическая обработка цитохимических данных лазерной конфокальной микроскопии. В выбранном фрагменте ткани (а) определяется весь массив объемов, занимаемых флуоресцирующими продуктами цитохимического окрашивания (б) для последующего количественного анализа.

2.3 Отбор проб

Все представители рогатковидных и сиговых рыб были отловлены с помощью ставных сетей, или водолазных работ в марте–апреле, мае, августе–октябре 1982–2016 гг. в районе Южного Байкала (рис. 11).



Рисунок 11. Карта мест отлова рыб для взятия проб. 1 – п. Листвянка; 2 – биостанция Большие Коты; 3 – селенгинское мелководье; 4 – Баргузинский залив.

Один экземпляр жирной широколобки выловлен на дне озера (глубина 1140 м) у полуострова Святой Нос с помощью глубоководного аппарата МИР-2 в июле 2009 г. Всего для разных целей использовано 349 экз. рогатковидных, 170 экз. сиговых рыб, а также 20 экз. голянов и 27 экз. жемчужных гурами (таблица 1).

Таблица 1. Объекты, использованные для изучения периферического отдела обонятельного и слухового анализаторов.

Вид	Пол, средняя полная длина (TL), мм	Возраст (по отолитам), лет	Глубина лова, м	Число рыб, экз.
<i>C. grewingki</i>	♂, 120	+2-+3	2-100	60
<i>C. inermis</i>	♀, 156	+4-+5	100-200	24
<i>B. baicalensis</i>	♀, 160	+4-+5	100-200	74
<i>C. alexandrae</i>	♀, 117	+2- +3	3-15	32
	♂, 113	+3	3-15	18
<i>C.baicalensis</i>	♀, 149	+3	150-200	20
	♂, 143	+2- +3	150-200	22
<i>C. dybowski</i>	♀, 114	+2- +3	150-200	23
	♂, 129	+2	150-200	27
<i>B. nikolskii</i>	♀, 130	+6-+7	200	17
<i>P. knerii</i>	♀, 119	+2- +5	1-6	30
	♂, 112	+3 – +4	1-6	50
<i>C.migratorius</i>	♀, 310	+7 – +10	200-350	35
	♂, 292	+8 – +9	200-350	21
<i>C.migratorius</i> (ЦКП ПАК)	♀, 116	+0- +4	–	19
	♂, 113	+0- +4	–	21
<i>C. pidschian</i>	♀, 290	+7	0-20	1
	♂, 260	+7	0-20	2
<i>C. pidschian</i> (ЦКП ПАК)	♀, 195	+0- +4	–	16
	♂, 160	+0- +4	–	16
<i>Coregonus baicalensis</i>	♂, 535	+7	0-200	2
<i>Coregonus baicalensis</i> (ЦКП ПАК)	♀, 158	+0- +4	–	20
	♂, 149	+0- +4	–	22
<i>T. leeri</i>	♂, 40	3+	–	27
<i>P. phoxinus</i>	♂, 80	5лет	0-1	20

2.4 Краткая характеристика объектов исследования

2.4.1 Общие сведения о рогатковидных видах рыб, использованных для сравнительно-морфологического изучения периферического отдела обонятельного и слухового анализаторов

Рогатковидные рыбы Байкала характеризуются высокой степенью эндемизма, значительным разнообразием морфологического строения и образа жизни, а также большой биологической пластичностью видов, позволившей им освоить самые различные экологические ниши водоема от прибрежья до максимальных глубин озера [Талиев, 1955; Мамонтов и др., 2004; Sideleva, 2003; Сиделева, Козлова, 2010].

Желтокрылка (*C. grewingki*) – пелагический вид. В межнерестовый период (3–4 стадия половой зрелости) желтокрылки обычно держатся на глубине 100–300 м., совершая суточные миграции между дном и толщей воды. В это время у них не наблюдается полового деморфизма (**рис. 12, а**). К началу нереста они перемещаются на мелководье и обитают на песчаных, песчанисто-каменистых и илистых грунтах. Самцы, демонстрирующие половое поведение, приобретают яркую брачную окраску (**рис. 12, б**). После оплодотворения икры самцы охраняют кладку в течение 20–40 сут. до начала выклева личинок. В это время они перестают питаться, теряют пигментацию тела и плавников (**рис. 12, в**).

Большая голомянка (*C. baicalensis*) – пелагический вид, живет в водной толще озера, не образуя скоплений (**рис. 12, г**). Обычно обитает в диапазоне от 100 до 750 м., однако встречается и на максимальных глубинах, в придонных слоях озера. Чаще всего голомянки поднимаются в верхние слои воды только ночью вслед за перемещением пищевых объектов – пелагических амфипод *Macrohectopus branickii*, личинок своего вида и *Comephorus dybowski*, а днем опять опускаются на глубину. Таким образом,

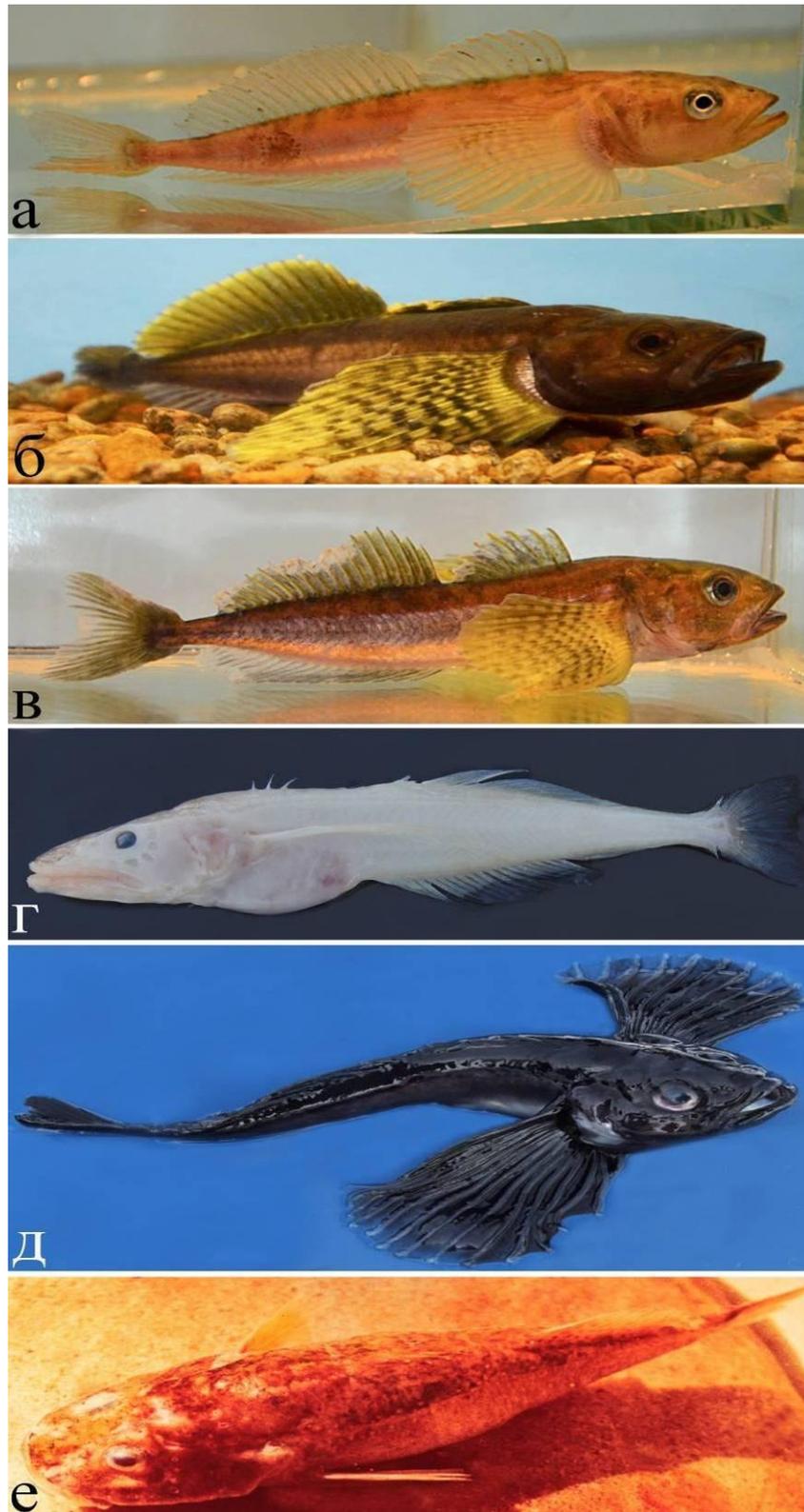


Рисунок 12. Рогатковидные рыбы оз. Байкал сем. Cottidae. Самец желтокрылки (*C. grewingki*) в донерестовый сезон (а), во время нереста (б) и в период родительского поведения (в); пелагические рыбы: большая голомянка (*C. baicalensis*), (г), длиннокрылая широколобка (*C. inermis*), (д) и жирная широколобка (*Batrachocottus nikolskii*), (е), которая ведет придонный образ жизни.

голомянка постоянно осуществляет суточные вертикальные миграции в широком диапазоне гидростатических давлений.

Длиннокрылая широколобка (*C. inermis*) относится к бентопелагическим рыбам, которые также могут менять горизонты давлений в течение суток (**рис. 12, д**). Встречается на глубинах от 10–15 до 1000 м. Летом длиннокрылые широколобки держится разрозненно на глубинах 300–1000 м., зимой совершает нагульные миграции в толще воды от больших глубин до 50 м. Спектр питания сходен с большой голомянкой и состоит из макрогектопуса и молоди пелагических Cottoidei [Гурова, Пастухов, 1974].

Жирная широколобка (*B. nikolskii*) является глубоководным донным видом Cottoidei (**рис. 12, е**). Распространена в зоне открытого Байкала на илисто-каменистых грунтах от 100–200 до 1500 м. и более. За счет нейтральной плавучести она может подниматься над грунтом для питания пелагическими рыбами, однако, основными пищевыми объектами ей служат донные амфиподы и широколобки.

Каменная широколобка (*Paracottus knerii*) – род *Paracottus* Taliev, 1949, семейство Cottidae (**рис. 13, а**). Предпочитает каменистые грунты на глубинах до 50–70 м, лишь единичные особи опускаются до 150 м. С конца лета, осенью и зимой этот вид придерживается глубин более 10 м., а с момента ледостава весной и в первой половине лета переходит на меньшие глубины – 0,1–1,5 м. Основу пищевого рациона взрослых особей составляют донные гаммариды.

Северобайкальская желтокрылка (*Cottocomephorus alexandrae*) относится к роду *Cottocomephorus* Pellegrin, 1900, семейству Cottidae. Обитает в толще воды над подводным склоном и в районах, характеризующихся повышенной биологической продуктивностью (**рис. 13, б**). Совершает значительные миграции при нагуле и нересте. Пищу этого вида составляют мезозоопланктон, молодь *Cottocomephorus*, пелагический бокоплав *M. branickii* и донные гаммариды.

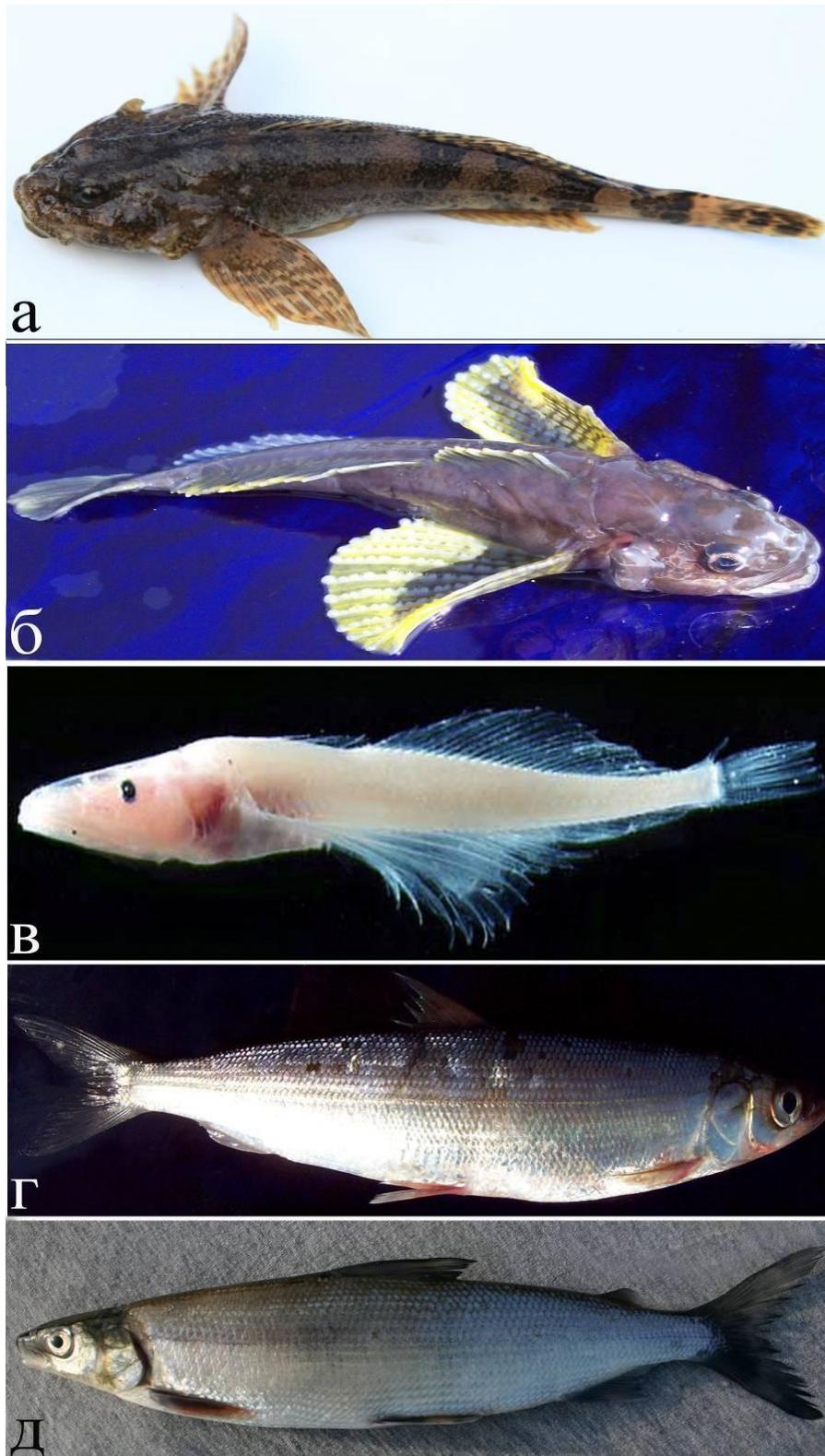


Рисунок 13. Рогатковидные (а–в) и сиговые (г, д) рыбы оз. Байкал. А – каменная широколобка (*P. Knerii*); б – северобайкальская желтокрылка (*C. alexandrae*); в – малая голомянка (*C. dybowski*); г – байкальский омуль (*C. migratorius*); д – сиг-пыжьян (*C. pidschian*).

Малая голомянка (*Comephorus dybowski*) – род *Comephorus* Lacépède, 1801, семейство Comephoridae (рис. 13, в). Как и большая голомянка, обитает в пелагиали от 130 м. до максимальных глубин – 1700 м. У взрослых особей основу пищи составляет *M. branickii*, иногда в желудках встречается молодь своего вида и большой голомянки. Как и у большой голомянки, у малой известны суточные пищевые вертикальные миграции.

2.4.2 Общие сведения о сиговых видах рыб, использованных для изучения саккулярного аппарата органа слуха

В озере Байкал обитает три представителя семейства Coregonidae: байкальский омуль, озерный сиг и озерно-речной сиг (пыжьян). В отличие от рогатковидных, размножение сиговых рыб озера (как и для всего подотряда лососевидных Salmonoidei) тесно связано с речными системами, а их популяционная структура в большей степени определяется особенностями ареала размножения и фактором пространственной изоляции.

Байкальский омуль (*Coregonus migratorius*) отряд Salmoniformes, род *Coregonus* (рис. 13, г). Распространен только в озере Байкал, поднимаясь на нерест в реки. Питается зоопланктоном, бокоплавами и молодь рыб. В Байкале различают четыре расы омуля и три морфо-экологических группы – прибрежный (северобайкальский), пелагический (селенгинский), и придонно-глубоководный (чивыркуйский, посольский) [Скрябин, 1969; Смирнов и др., 2009].

Байкальский сиг (*Coregonus baikalensis*) – отряд Salmoniformes, род *Coregonus*. Распространен по всему озеру Байкал, но наибольшая концентрация его наблюдается в Баргузинском и Чивыркуйском заливах, на Селенгинском мелководье и в Малом Море. Встречается также в предустьевом пространстве рек Кичера и Верхняя Ангара. Взрослые сиви питаются моллюсками, донными гаммаридами, планктонными ракообразными, личинками насекомых, червями и молодь бычковых рыб.

Сиг пыжьян (*Coregonus pidshian*) – отряд *Salmoniformes*, род *Coregonus* (рис. 13, д). Обитает в озерах и реках. Особи озерно-речных популяций нагуливаются в литорали оз. Байкал, прибрежно-соровой зоне и нижнем течении рек [Матвеев, Самусенок, 1999], а размножаются в верховьях указанных рек. В бассейне р. Ангары сиг-пыжьян встречается практически повсеместно, как в основном русле реки, так и в ее крупных притоках.

ГЛАВА 3. УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У ЖЕЛТОКРЫЛКИ В МЕЖНЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД

Периферический отдел обонятельной системы находится по обе стороны дорсальной стороны головы и представлен парными органами – розетками, расположенными на дне специальных ямок. Снаружи каждая из ямок прикрыта кожной складкой, имеющей два отверстия – входное и выходное (**рис 14, а**). Посредством этих отверстий носовой мешок сообщается с наружной средой. Такая структура периферического отдела обонятельного аппарата создает возможность непрерывного протока тестируемой воды в обонятельной камере. По нашим данным ультраструктурные особенности сенсорного аппарата у разных видов рогатковидных рыб сходны, однако существенно зависят от их экологии, фазы жизненного цикла и поведения [Косицын и др., 1990, 1994, 1996; Клименков и др., 2013; Klimentkov et al., 2016]. У взрослых рыб розетка имеет диаметр 1,5–2 мм и состоит из 5–6 складок, отходящих из центральной септы (**рис. 14, б**). Рецепторный эпителий выстилает обе стороны каждого лепестка, за исключением их торцевых участков, где находятся эпидермальные нереснитчатые клетки, среди которых встречаются бокаловидные слизистые клетки (**рис. 14, в–г**). Между чувствительным и индифферентным эпителием имеется четкая граница. Высота сенсорного эпителия составляет, в среднем, 45–50 мкм. Как и у других костистых, обонятельный эпителий у байкальских *Cottoidei* имеет свойственное для позвоночных строение и состоит из рецепторных, опорных и базальных клеток (**рис. 15, а**). У желтокрылки обонятельные лепестки не имеют вторичной складчатости, причем, рецепторные и опорные элементы распределены в эпителии в смешанном порядке, не образуя обособленных зон (**рис. 15, б**).

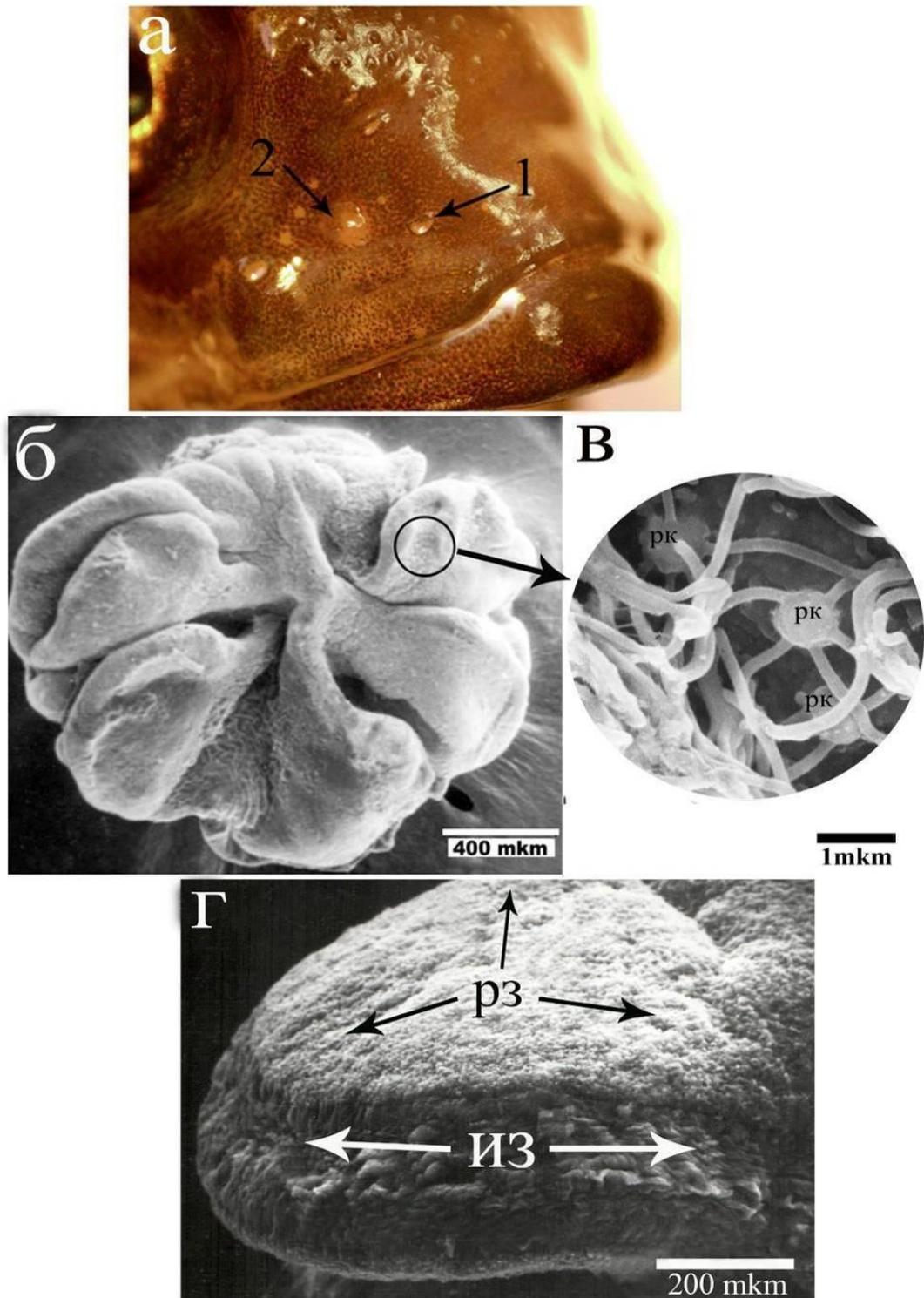


Рисунок 14. Периферический отдел обонятельной системы у *C. grewinkii*. А – внешний вид входного (1) и выходного (2) отверстий в кожном эпителии для тестирования воды в обонятельной ямке; б – общий вид обонятельной розетки; в – увеличенный участок выделенного фрагмента рис. "б" с вершинами рецепторных клеток жгутикового типа; г – отдельная складка. Условные обозначения: рк – рецепторные клетки, рз – рецепторная зона, из – индифферентная зона.

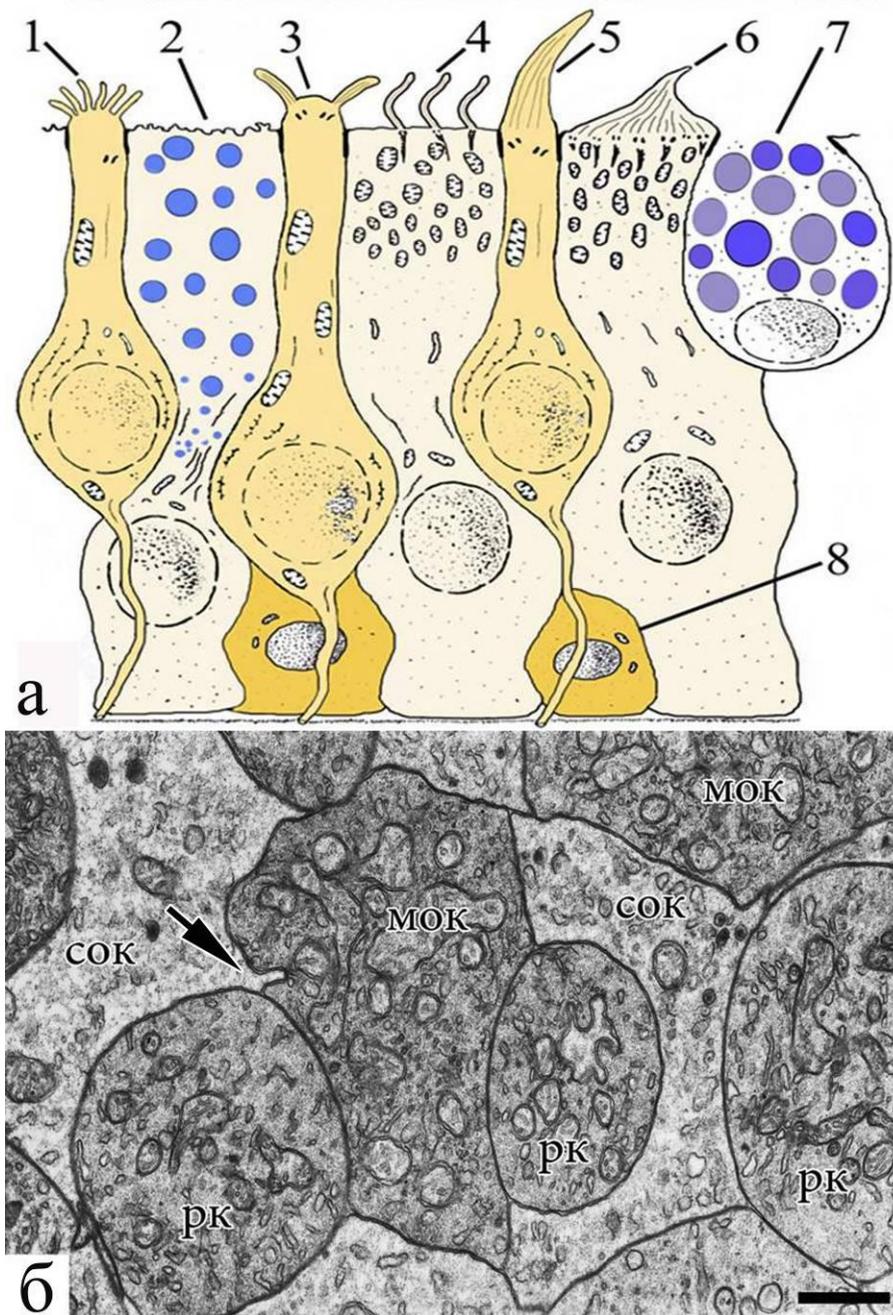


Рисунок 15. Особенности строения обонятельного эпителия у байкальских *Cottoidei*. А – схема взаимного расположения клеточных элементов (1 – микровиллярная рецепторная клетка; 2 – секреторная опорная клетка; 3 – рецепторная клетка жгутикового типа; 4 – мерцательная опорная клетка; 5 – рецепторная клетка с комплексным жгутиком; 6 – опорная клетка с комплексным жгутиком; 7 – бокаловидная клетка; 8 – базальная (прогениторная) клетка); б – поперечный срез эпителия у желтокрылки. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; мок – мерцательная опорная клетка; сок – секреторная опорная клетка. Стрелкой отмечен вырост секреторной опорной клетки, проникающий в тело мерцательной клетки. Масштаб: 1 мкм.

3.1 Рецепторные клетки

В ольфакторном аппарате желтокрылки выявляются чувствительные клетки двух типов – жгутиковые и микровиллярные. Апикальный участок жгутиковых клеток заканчивается обонятельной булавой, снабженной ресничками, количество которых варьирует от 4 до 6 (**рис. 16**). Длина жгутиков составляет 4–6 мкм. У некоторых рецепторных клеток жгутики объединены в комплексную структуру – палочку (**рис. 17, а**). Вершина редко встречающихся в эпителии микровиллярных клеток содержит немногочисленные короткие (1–3 мкм) пальцевидные выросты, не имеющие базальных телец и микротубулярного аппарата (**рис. 17, б**). У таких клеток базальные тельца обычно обнаруживаются в цитоплазме верхних отделов периферического отростка. Здесь они, как правило, располагаются группами и не имеют определенной ориентации. Наличие двух разновидностей обонятельных клеток в ольфакторном эпителии рогатковидных подтверждается присутствием двух типов центральных отростков, профили которых обнаруживаются в самых нижних слоях эпителия, в основном, под базальной пластинкой. Жгутиковые клетки имеют более толстые нервные волокна – от 0,5 до 1,5 мкм. Тонкие аксоны (0,05–0,3 мкм) соответствуют центральным отросткам микровиллярных клеток. Расчеты показывают, что у бычков на 100 мкм² эпителия в среднем приходится 12–13 чувствительных клеток (1200–1300 клеток на 1 мм²). Тела рецепторных клеток располагаются в толще эпителия в виде нескольких рядов. Они имеют веретеновидную форму, причем, диаметр ядросодержащей зоны клеток обычно составляет 5–6 мкм (**рис. 17, в, г**). Слабовыраженное ядрышко располагается в верхнем, либо в нижнем полюсе ядра. Перикарион клеток, в той или иной степени, заполнен широкой сетью каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума. Его каналы обычно занимают значительное пространство тела клетки.

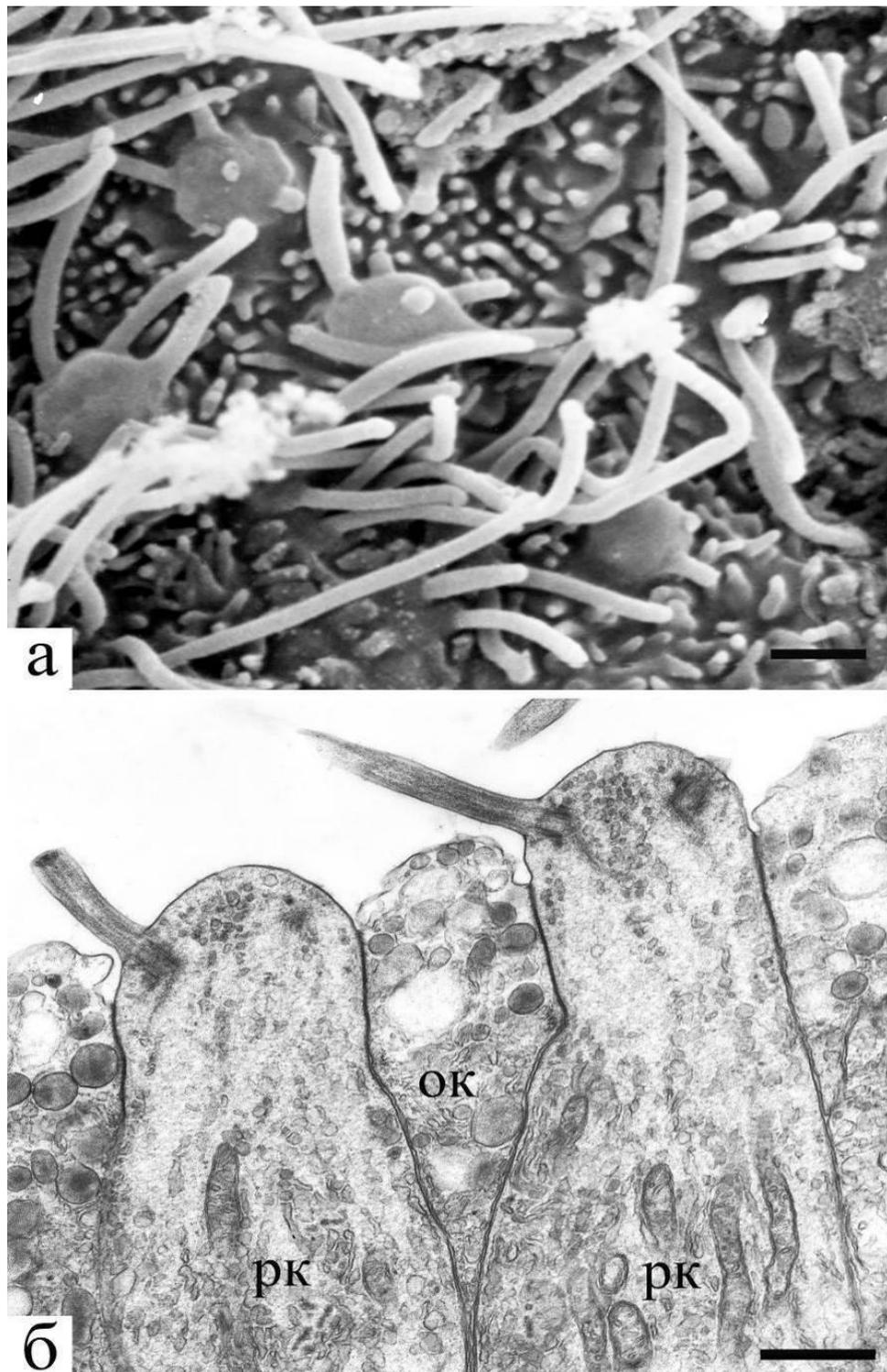


Рисунок 16. Апикальные участки рецепторных клеток жгутикового типа по данным сканирующей (а) и просвечивающей электронной микроскопии (б). Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка секреторного типа. Масштаб: 0,5 мкм.

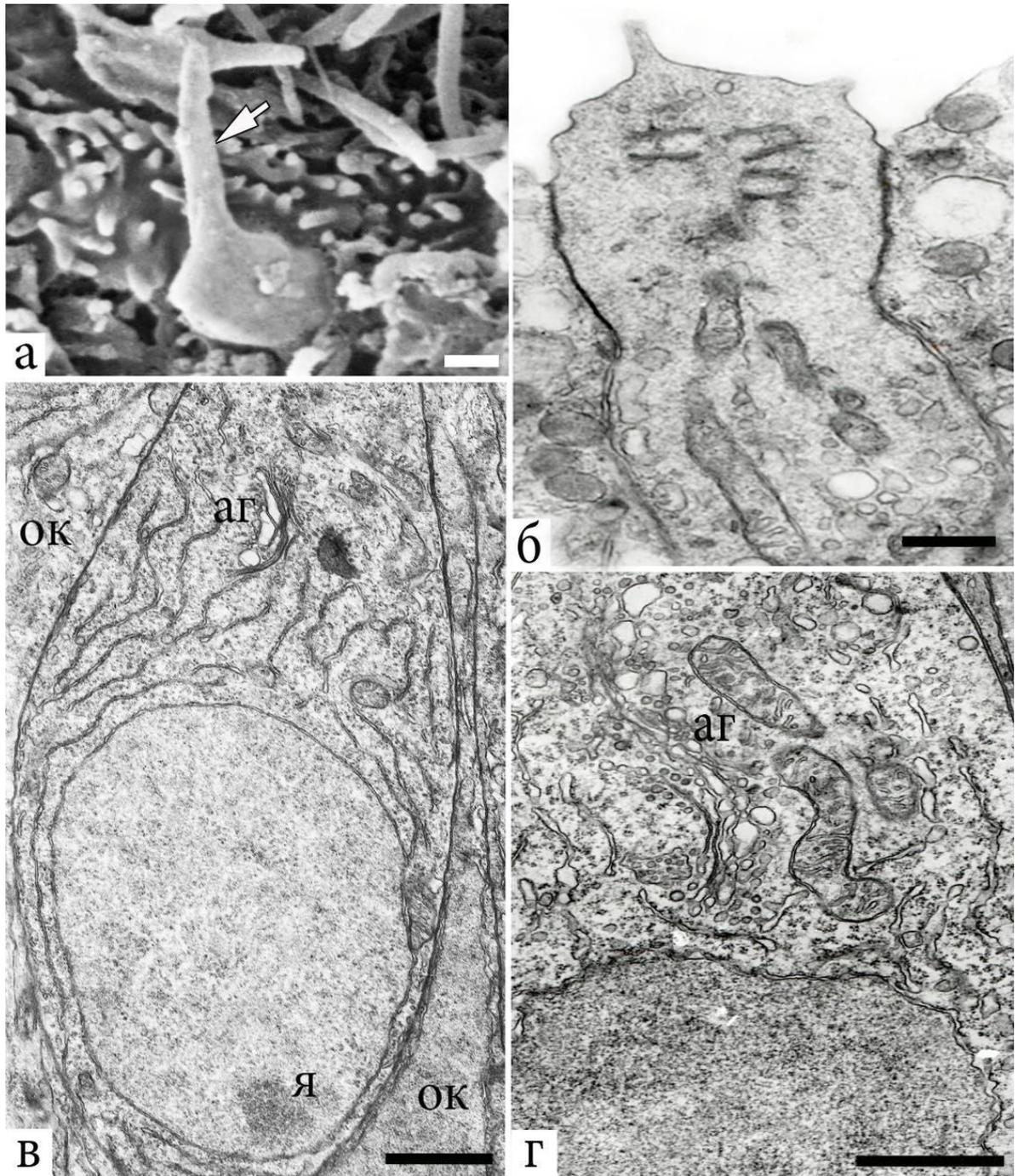


Рисунок 17. Ультраструктурные особенности рецепторных клеток у рыб в межнерестовый период. А – вершина рецепторной клетки с комплексным жгутиком (показан стрелкой); б – дистальный участок дендрита рецепторной клетки микровиллярного типа; в – тело обонятельной клетки. Ядрышко локализовано в нижнем полюсе ядра; г – перикарион рецепторной клетки. Условные обозначения: аг – аппарат Гольджи; ок – опорная клетка; я – ядрышко. Масштаб: 1 мкм.

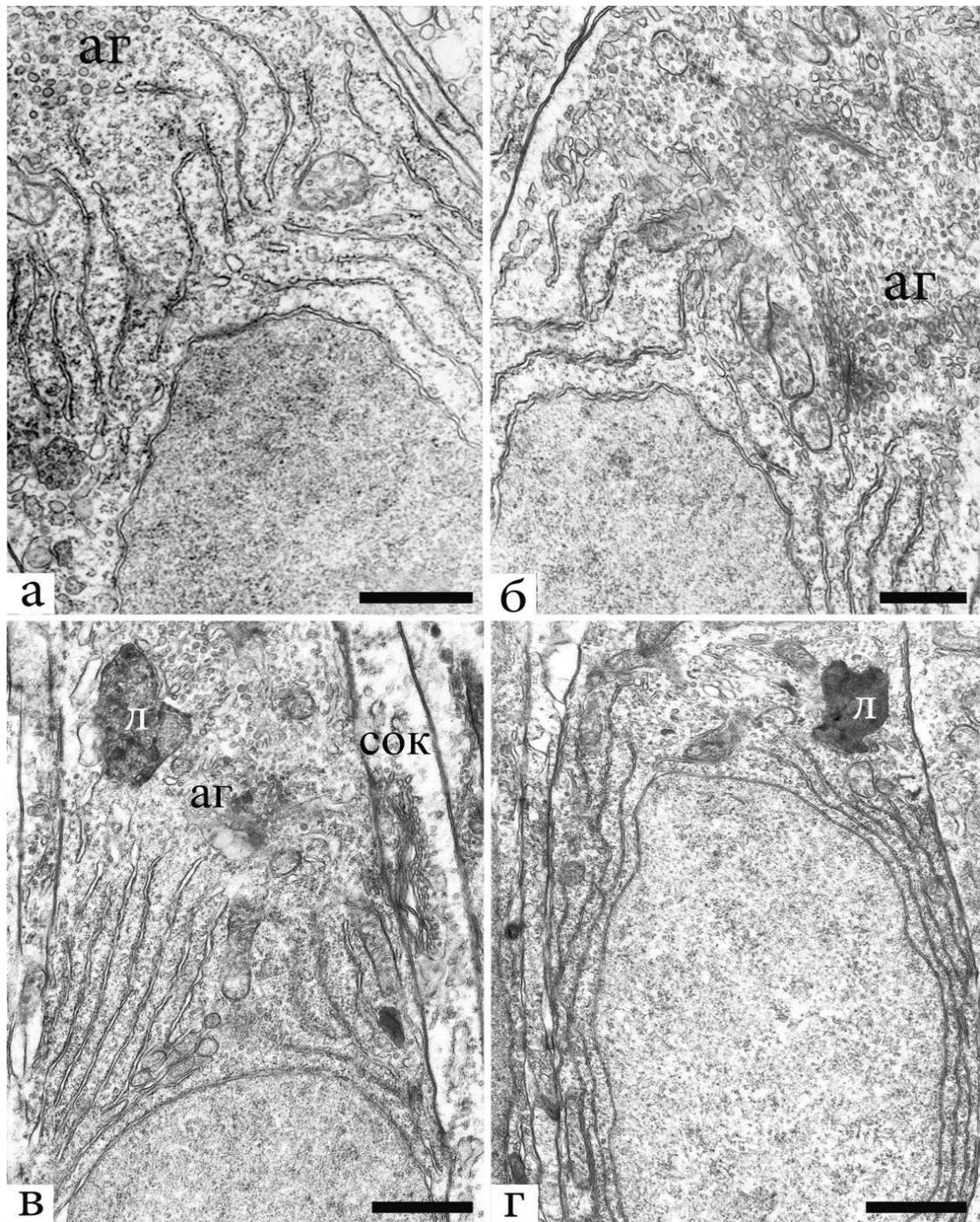


Рисунок 18. Приядерная зона рецепторных клеток у рыб в межнерестовый период. А, б – низкая секреторная активность аппарата Гольджи; в, г – гранулы липофусцина в теле клеток. Условные обозначения: аг – аппарат Гольджи; сок – секреторная опорная клетка; л – липофусцин. Масштаб: 1 мкм.

В цитоплазме локализуются также единичные митохондрии, лизосомы, мультивезикулярные тельца, а также немногочисленные розетки рибосом. Аппарат Гольджи обычно имеет низкую секреторную активность. Вблизи трансдисков новообразованные вакуоли, как правило, дробятся на более мелкие (0,1–0,2 мкм) многочисленные везикулы (рис. 18 а, б). Характерной особенностью обонятельных клеток рыб в донерестовый период является наличие в их цитоплазме гранул, вероятно, липофусциновой природы (рис. 18 в, г). Обычно они имеют неправильную форму и повышенную электронную плотность. Такие структуры локализуются как в надъядерной области, так и под ядром. Большое количество липофусцина является характерной особенностью клеток обонятельного эпителия и у пелагических рогатковидных рыб. Кроме того, в цитоплазме рецепторных клеток нередко наблюдаются также миелиноподобные образования, обычно располагающиеся вблизи митохондрий. Считается, что наличие миелиновых фигур в обонятельных клетках отражает одну из начальных фаз их дегенеративных изменений [Бахтин, Филюшина, 1974]. В периферическом отростке как жгутиковых, так и микровиллярных клеток иногда выявляются микротрубочки. Они обычно начинаются в верхних отделах перикариона, далее следуют параллельно друг другу между митохондриями на всем протяжении дендрита, заканчиваясь вблизи базальных телец булав. Наши исследования показывают, что в донерестовый период число нейронов, содержащих микротрубочки, достаточно низко. Они составляют в среднем 4–6 % от общего числа рецепторных клеток. Как будет показано в следующем разделе, количество клеток с микротрубочками резко возрастает при переходе рыб к периоду вызревания и вымета половых продуктов. В эту фазу они выявляются наиболее отчетливо, что дает возможность подробно изучить особенности их расположения в обонятельных клетках. В связи с этим, более детально микротубулярная система рецепторных клеток будет рассмотрена в главе 4.

3.2 Опорные и базальные клетки

Как и у других позвоночных, в эпителии желтокрылки обнаруживаются опорные клетки двух типов: мерцательные и секреторные. Мерцательные клетки имеют прямоугольную форму с широкой плоской вершиной, от которой отходят 9–16 жгутиков (**рис. 19**). Жгутиковый аппарат некоторых мерцательных клеток объединен с образованием палочки. Ее диаметр у основания обычно соответствует диаметру апикального участка клетки. Такой комплексный жгутик к его дистальному отделу сужается так, что в целом он приобретает конусовидную форму. В верхней части тела мерцательных клеток, в основании базальных телец жгутиков, обычно концентрируются митохондрии. Цитоплазма перикариона имеет слабую электронную плотность и не насыщена органеллами. Кроме аппарата Гольджи здесь локализуются короткие фрагменты каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума и немногочисленные свободные рибосомы.

Секреторные поддерживающие клетки располагаются между телами рецепторных и мерцательных клеток (**рис. 18, в; 19**) и иногда формируют в цитоплазму последних цитоплазматические выросты (**рис. 15**). В средней части клеток (над ядром) в просветленном матриксе цитоплазмы выявляются каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума с равномерно расширенным цистернальным пространством. В этой зоне находится хорошо развитый аппарат Гольджи, от которого отшнуровываются пузырьки различной величины и электронной плотности. В донерестовый период слизистые клетки обычно имеют слабую секреторную активность. В базальных клетках, как это свойственно для малодифференцированных элементов, содержится большое количество свободных розеток рибосом и митохондрий.

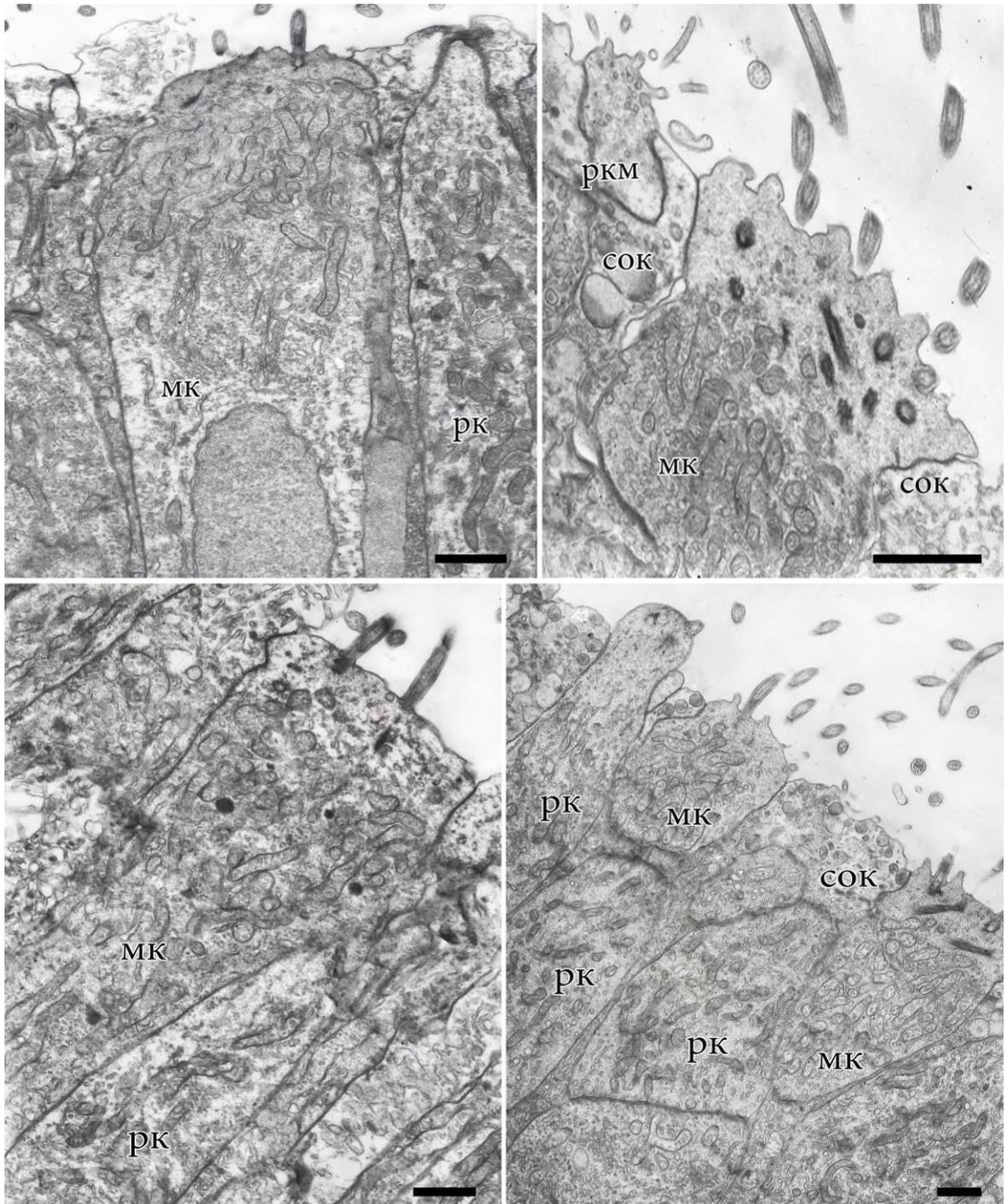


Рисунок 19. Ультраструктурные особенности мерцательных и секреторных опорных клеток у желтокрылки в межнерестовый период. Условные обозначения: МК – мерцательная клетка; рк – рецепторная клетка; ркм – микровиллярная рецепторная клетка; сок – секреторная опорная клетка. Масштаб: 1 мкм.

3.3 Пространственная организация актиновых микрофиламентов в обонятельном эпителии у рыб сем. *Cottoidei*

3.3.1 Межклеточные контакты

В процессе роста дендриты молодых обонятельных клеток достигают поверхности эпителия и формируют плотные и адгезивные контакты (tight и adherens junctions соответственно) с дистальными участками соседних опорных или чувствительных клеток и таким образом окончательно интегрируется в упорядоченную сеть клеточных элементов эпителия [Steinke et al., 2008]. Благодаря этим взаимодействиям, поверхностная мембрана как хеморецепторных, так и опорных клеток всегда разделена на две специализированные морфо-функциональные зоны: поверхностную (которая открывается во внешнюю среду) и базо-латеральную, обращенную в толщу эпителия. Такое разделение обеспечивает разграничение белкового и липидного состава апикального и базолатерального участков клеточной мембраны. Это предопределяет функциональную специфику данных областей клеточных элементов не только в обонятельном [Miragal et al., 1994], но и в других типах эпителиальных тканей [Anderson, Van Itallie, 2009]. В качестве примера, на **рис. 20** показана локализация плотных и адгезивных контактов в верхнем слое эпителия у желтокрылки.

В последние десятилетия интерес к структурному обеспечению межклеточных контактов в обонятельном эпителии существенно возрос в связи с разработкой методов увеличения их проницаемости для усиления интраназального транспорта лекарств в мозг при лечении различных неврологических расстройств [Santoro et al., 2000; Krishan et al., 2014]. В связи с этим, основные результаты по этому важному вопросу получены, в основном, на млекопитающих. В частности, из белков, входящих в состав плотных контактов, в обонятельном эпителии иммуногистохимически первыми были идентифицированы ZO-1 протеин [Miragall et al., 1994] и

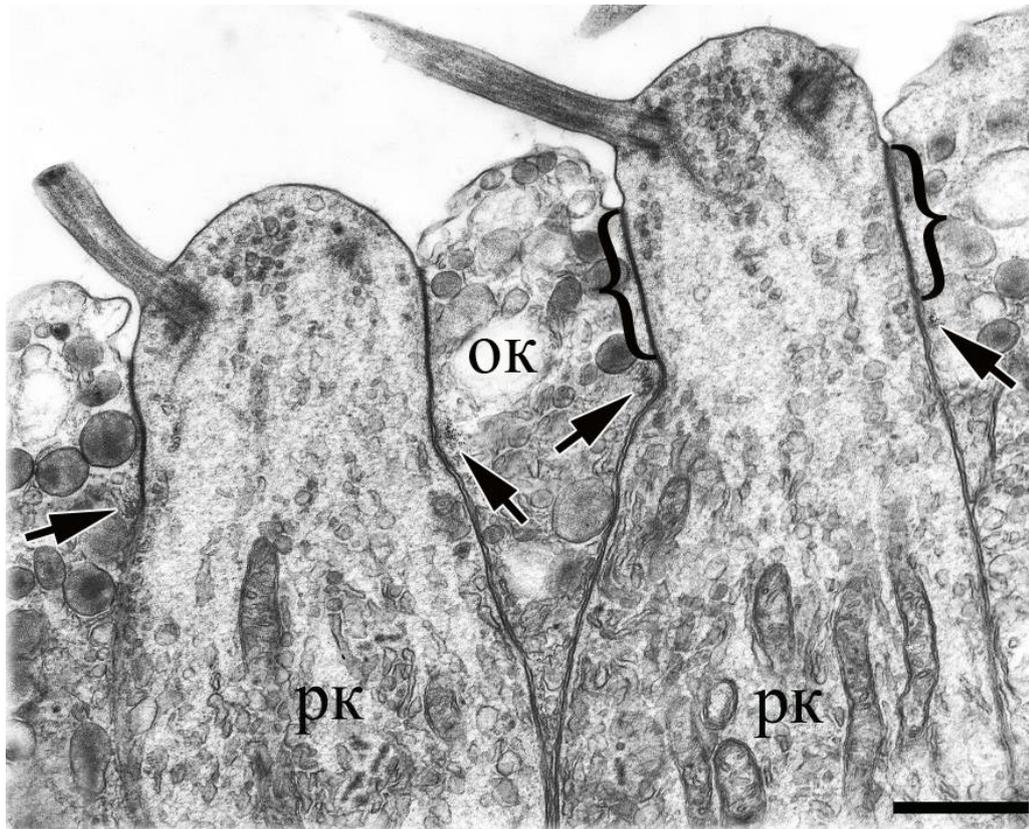


Рисунок 20. Плотные (отмечены фигурными скобками) и адгезивные (показаны стрелками) контакты между рецепторными клетками жгутикового типа и секреторными клетками в обонятельном эпителии у желтокрылки. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка жгутикового типа; ок – секреторная опорная клетка. Масштаб: 1 мкм.

окклюдин – компонент, который обычно обеспечивает поляризацию у эпителиальных клеток, транспортирующих глюкозу [Hussar et al., 2002]. В последнем исследовании этот же белок обнаружен в плотных контактах эндотелиальных клеток в кровеносных сосудах, снабжающих кровью клетки сенсорного аппарата. Таким образом, установлено, что окклюдин обеспечивает также селективный транспорт глюкозы к клеткам эпителия, изолируя его от других потенциальных антигенов, которые могут содержаться в крови. Данные наблюдения указывают на то, что специфические контакты в дистальных отделах эпителия отделяют периферический отдел сенсорной системы от потенциальных чужеродных антигенов, как из внешней среды, так и из крови [Hussar et al., 2002]. Кроме

того, в недавно опубликованных работах показано, что рецепторные клетки экспрессируют и другие молекулы клеточной адгезии – нектин-2 и N-кадгерин, а опорные клетки – нектин-2, нектин-3, E-кадгерин и N-кадгерин [Katsunuma *et al.*, 2016]. Гетерофильные взаимодействия между нектинами и кадгеринами, локализованными в мембранах чувствительных нейронов и опорных клеток, обеспечивают их взаимодействие на уровне апикальных участков в зоне плотных контактов. Причем, у млекопитающих во время эмбрионального периода развития больше половины рецепторных клеток сначала связаны друг с другом, а после рождения они теряют взаимные плотные контакты и посредством нектинов и кадгеринов постепенно окружаются опорными клетками [Katsunuma *et al.*, 2016]. Таким образом, эти исследования показывают, что специфическая экспрессия белков межклеточной адгезии предопределяет мозаичное распределение обонятельных клеток среди опорных элементов эпителия.

Кроме адгезивных белков в зоне плотных контактов во многих тканях присутствуют также нити цитоскелета, в частности актиновые микрофиламенты [Fanning *et al.*, 1998; Takano *et al.*, 2008]. Как показывают недавние исследования, актиновые элементы цитоскелета, ассоциированные с плотными контактами, принимают непосредственное участие в поддержании их целостности в условиях динамических процессов морфогенеза клеток и их микродвижений в ходе жизнедеятельности и последующего апоптоза [Takano *et al.*, 2015].

В литературе отсутствуют данные о возможной локализации актина в плотных контактах между клетками в обонятельном эпителии. Между тем, этот вопрос может быть очень важен, так как в последнее время появляется много сведений о его ключевой роли в обеспечении пластичности других специализированных участков дендритов – дендритических шипиков нейронов центральной нервной системы [Shirao, Gonzalez-Billault, 2013; Kneussel, Wagner, 2013]. Кроме того, хорошо известно, что актин вместе с другими компонентами цитоскелета принимает непосредственное участие в

процессах клеточной дифференцировки и роста нейронов [Kessels *et al.*, 2010; Pasary *et al.*, 213].

3.3.2 Особенности структурной организации актиновых микрофиламентов плотных контактов у рыб сем. Cottoidae

Для детализации тонкого строения плотных контактов в сенсорном аппарате рыб мы провели его цитохимическое окрашивание на F-актин, который, как говорилось выше, наряду с другими белками клеточной адгезии является одним из ключевых компонентов, входящих в состав специализированных контактов в различных тканях. Это представляется особенно важным в связи с изучением сложных процессов нейrogenеза, которые мы исследовали в эпителии у гидробионтов в контроле и в экспериментальных условиях (глава 5).

Окрашивание обонятельных розеток фаллоидином–FITC позволило выявить в поверхностном слое эпителия высокоупорядоченные ячеистые структуры из адгезивных поясков клеток, сформированных актиновыми микрофиламентами. С помощью конфокальной микроскопии мы охарактеризовали специфику расположения цитоскелета в зоне плотных контактов в эпителии у трех эндемичных видов байкальских (желтокрылка, длиннокрылая и большеголовая широколобки) рыб и у гурами, как у одного из представителей аквариумных рыб. Оказалось, что в каждом из изученных в этом плане гидробионтов имеют место как общие, так и свои, специфические способы пространственной укладки актиновых волокон. Общий принцип устройства актиновой сети в сенсорном аппарате предопределяется тем, что поверхность эпителия формируют вершины рецепторных и опорных клеток, площадь поверхности которых в апикальном участке эпителия существенно различается [Hansen, Zeiske, 1998; Zeiske *et al.*, 2003; Kasumyan, Pashchenko, 2015]. Поперечный профиль терминалей рецепторных нейронов намного меньше такового у опорных клеток. По этой

причине после окраски эпителия фаллоидином–FITC актиновая сеть состоит из мелких (диаметр 1,2–1,5 мкм) ячеек, принадлежащих вершинам рецепторных клеток, и более крупных (диаметр 3,5–4,5 мкм) по размеру ячеек, образованных актиновыми филаментами, входящими в состав поясковых ободков вершин опорных клеток. Актиновые профили рецепторных клеток имеют более-менее округлую форму и, как правило, окружены вершинами обкладочных клеток, тип которых (мерцательные или секреторные) при данном способе окраски не может быть определен. Используя этот метод обработки материала, можно объективно оценить характер расположения рецепторных и опорных клеток, а также их количественные соотношения в разных участках эпителия. Характерно, что проведенное ранее иммуноцитохимическое и иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов на другие специфические белки, ассоциированные с плотными и адгезивными контактами, также позволило отчетливо выявить более мелкие контуры дендритов на фоне окружающих их широких обкладочных клеток [Steinke et al., 2008]. Таким образом, окрашивание препаратов на F-актин позволило рельефно обнажить специфические особенности межклеточных взаимодействий клеток на уровне их апикальных участков, открывающихся на поверхность эпителия. Нужно отметить, что применение в этих целях сканирующей электронной микроскопии не дает такой возможности. Многочисленные реснички, жгутики, микровиллярные отростки, отходящие от клеток, а также секреторные выделения обычно закрывают поверхность эпителия, что не позволяет традиционными методами отслеживать контуры клеток.

Установлено, что у длиннокрылой широколобки поверхность эпителия сформирована в виде очень упорядоченной мелкочаеистой сети, сплетенной из пучков актиновых микрофиламентов (**рис. 21, а, б**). Со стороны цитоплазмы она покрывает всю примембранную поверхность обонятельных складок, включая как рецепторные, так и индифферентные зоны. При

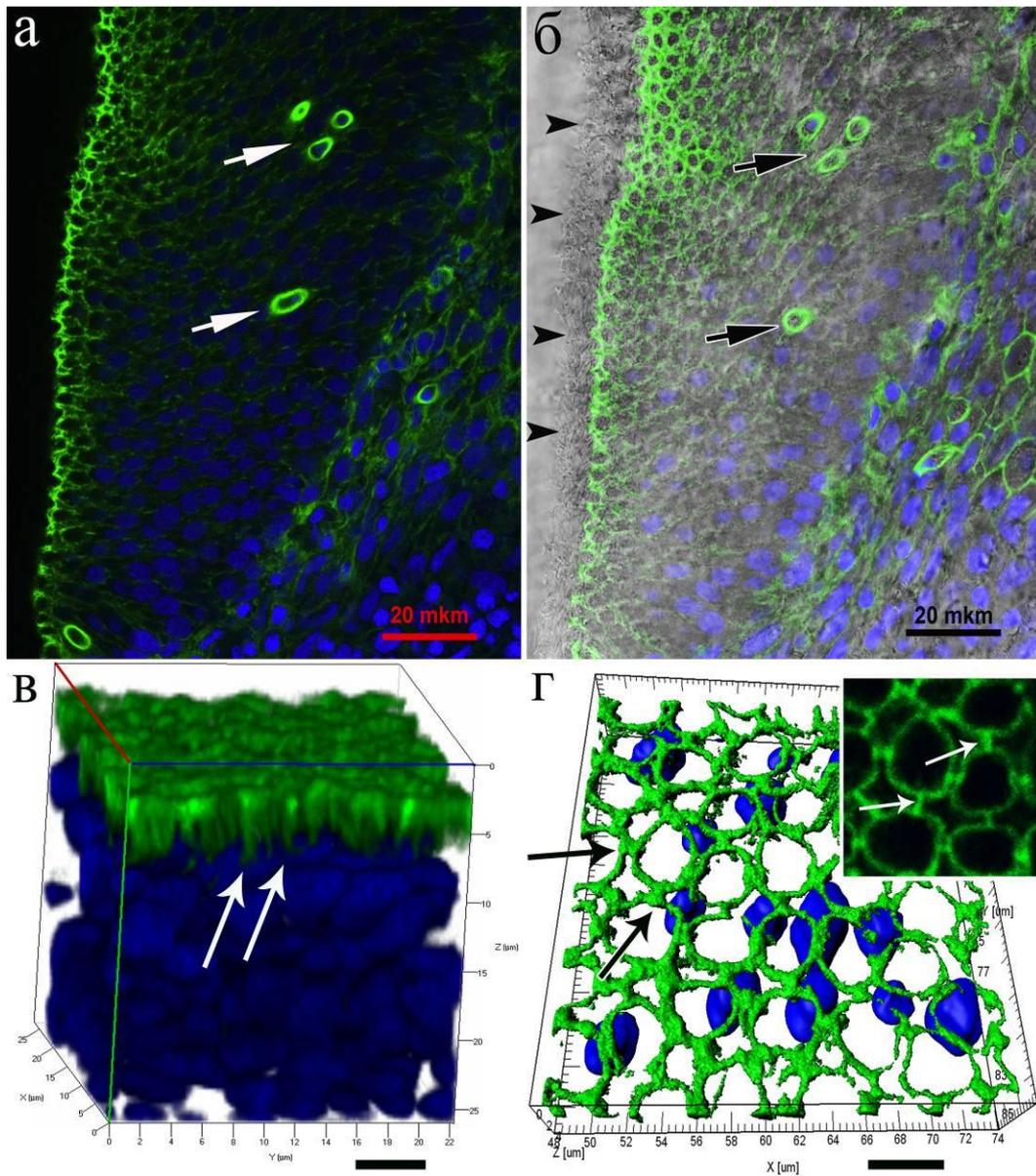


Рисунок 21. Упорядоченная мелкоячеистая сеть актиновых микрофиламентов в поверхностном слое обонятельного эпителия у длиннокрылой широколобки. Окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядра (DAPI, синий); конфокальная микроскопия. А – 2D срез; б – рис "а" в просвечивающем режиме; стрелками указаны профили дендритов молодых рецепторных клеток; фигурными стрелками отмечены многочисленные реснички рецепторных и опорных клеток; в – отдельный фрагмент эпителия с широким слоем актиновых микрофиламентов в зоне плотных контактов клеток (3D-реконструкция); стрелками показаны микровыросты F-актина; г (3D-реконструкция), вставка (2D) – участки поверхности эпителия; стрелками отмечены «перемычки» между опорными клетками. Масштаб: в, г – 5 мкм.

детальном рассмотрении таких ячеек хорошо видно, что они образованы граничащими друг с другом плотными контактами, которые, как отмечалось выше, располагаются в апикальных участках всех типов клеток. Такие контакты в виде лент опоясывают самый верхний отдел дендритов рецепторных клеток и тесно взаимодействуют с аналогичными структурами соседних опорных клеток. Как и у всех изученных нами в этом плане рыб, ширина слоя актиновых микрофиламентов в области плотных контактов на всем их протяжении в среднем составляет 0,25 мкм. При большом увеличении видно, что актиновые микрофиламенты, ассоциированные с плотными контактами, оформлены в виде колец, от которых в толщу эпителия отходят многочисленные тонкие (до 0,5 мкм) тяжи с заостренными концами длиной до 4 мкм. Расстояние между микровыростами обычно находится в пределах от 1 до 1,6 мкм (**рис. 21, в**). Кроме того, видно, что соседние опорные клетки соединены между собой специальными актиновыми «перемычками», что вероятно дополнительно способствует более прочному их взаимному сцеплению (**рис. 21, г**). Таким образом, взаимодействуя друг с другом, актиновые пучки соседних клеток образуют непрерывный органический матрикс, формирующий в поверхностной зоне эпителия характерный, сложно организованный орнамент.

Окраска на актин показывает, что у длиннокрылки рецепторные клетки, как правило, перемежаются с опорными элементами эпителия, образуя мозаичную конфигурацию. У других исследованных представителей байкальских *Cottoidei* (желтокрылка и большеголовая широколобка) после такой окраски поверхность эпителия также образует характерный рисунок (**рис. 22**). Сейчас пока нельзя сказать – насколько характер взаимного расположения вершин нервных и поддерживающих клеток у этих видов рыб является видоспецифичным. Для этого у данных видов рыб нужны специальные, более тщательные исследования клеток во всех складках, входящих в состав их розеток, а также особенности их нейрогенеза.

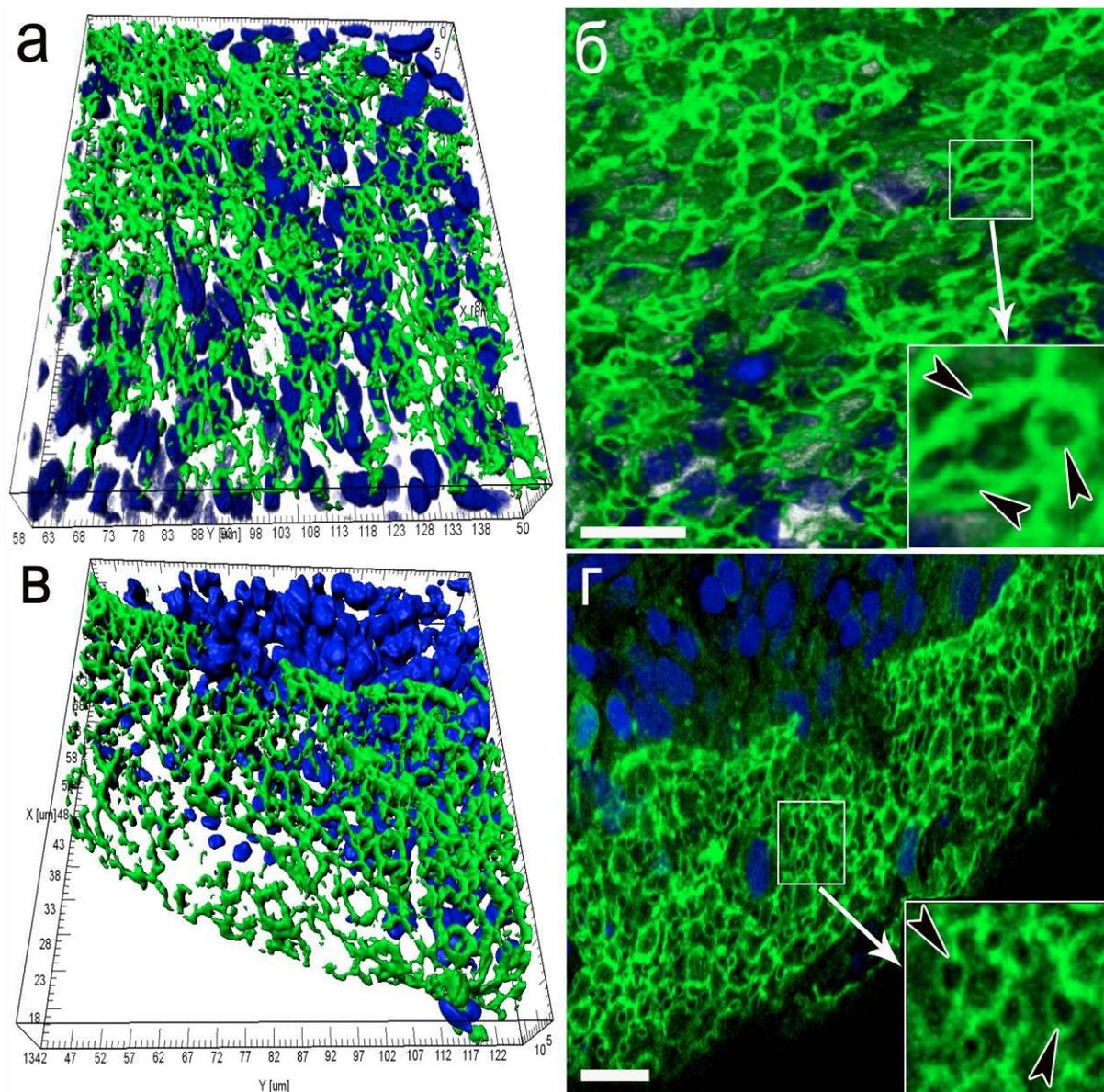


Рисунок 22. Особенности взаимного расположения вершин рецепторных и опорных клеток в обонятельном эпителии у желтокрылки (а, б – 3D-реконструкции; вставка – увеличенный фрагмент выделенного участка) и у большеголовой (в – 3D-реконструкция; г – 2D; вставка – увеличенный фрагмент выделенного участка) широколобки. Окраска на актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядра (DAPI, синий); конфокальная микроскопия; фигурными стрелками отмечены профили вершин рецепторных клеток в соседстве с опорными клетками. Масштаб: 10 мкм.

По мнению многих авторов, чувствительность обонятельной системы во многом предопределяется плотностью рецепторных клеток и особенностями их взаимодействия с опорными элементами эпителия [Yamamoto, Ueda, 1979; Пашенко, Касумян, 2015 и др.]. Используемый нами метод окрашивания вершин клеток в зоне их плотных контактов с помощью фаллоидина-FITC может дать новые сведения о специфике их пространственного распределения. Если получаемые на конфокальном микроскопе изображения подвергнуть компьютерной обработке, то можно получать более упрощенные стилизованные картины поверхности, которые дают возможность точно идентифицировать вершины рецепторных и опорных клеток и таким образом оценивать их количественное соотношение (**рис. 23, а, б**) и способы их взаимного расположения (**рис. 23, в**). Так, предварительные подсчеты показывают, что у обитающей в пелагиали длиннокрылой широколобки отношение количества рецепторных клеток к опорным составляет 1,65. В сравнении с этим, у большеголовой широколобки, живущей в богатой органическими субстратами литорали, этот показатель существенно меньше и равен 0,6. Исходя из этих данных, можно предположить, что в отличие от большеголовой широколобки, более высокая плотность рецепторных клеток у длиннокрылки отражает настройку ее обоняния на менее концентрированный вертикальный профиль органических веществ, характерных для водной толщи открытого Байкала [Тарасова, 1975; Вотинцев и др., 1975]. Таким образом, этот метод позволяет получать точные сведения о соотношении чувствительных и обкладочных клеток, что может быть важным параметром, характеризующим особенности организации периферического отдела обонятельного анализатора животных в связи с их поведением и экологией. При определении такого показателя вероятно нужно учитывать также и другие факторы, например, специфику взаимного расположения не только рецепторных, но и опорных клеток. В частности, оказалось, что у длиннокрылки в отдельных зонах эпителия опорные клетки образуют регулярные ряды, ориентированные во взаимно

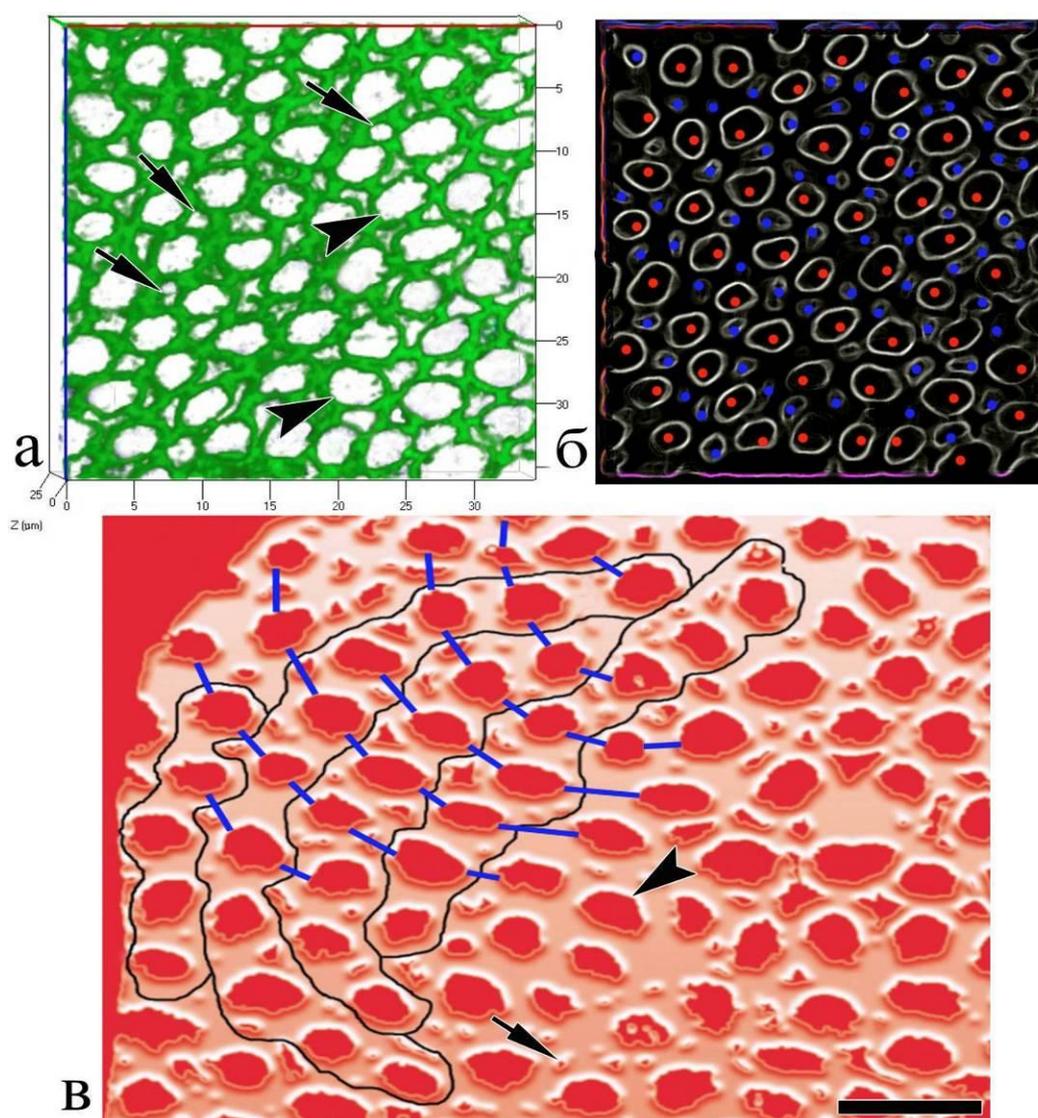


Рисунок 23. Особенности взаимного расположения вершин рецепторных и опорных клеток в обонятельном эпителии у длиннокрылой широколобки, визуализированных после окраски на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый); конфокальная микроскопия. А – поверхность эпителия имеет вид "решетки", образованной вершинами рецепторных и опорных клеток (3D-реконструкция); б – рис "а" после компьютерной обработки, позволяющей определить количественное соотношение клеток (синим выделены профили терминалей дендритов рецепторных клеток; красным – вершины опорных клеток); в – фрагмент обонятельной складки; черным и синим цветом выделены ряды апикальных участков опорных клеток, демонстрирующие упорядоченность их расположения (3D-реконструкция). Простые стрелки указывают на вершины рецепторных, а фигурные – опорных клеток. Масштаб: 10 мкм.

перпендикулярных направлениях (**рис. 23, в**). Причем, как и у других представителей рогатковидных, рецепторные клетки обычно перемежаются с опорными элементами эпителия. В отличие от этого, у жемчужного гурами, кроме обширных зон с таким же мозаичным способом укладки разных типов клеток, отдельные участки эпителия заняты группами из 4–5 рецепторных клеток, которые через плотные контакты вплотную и линейно смыкаются друг с другом (**рис. 24**). На фотографиях видно, что такие цепочки вершин чувствительных клеток выстраиваются параллельными рядами на довольно значительных по площади пространствах. Групповое расположение обонятельных клеток ранее было обнаружено также у других видов рыб [Дорошенко, 1984; Девицина, 1988], а также у хвостатых амфибий [Graziadei, Graziadei, 1976] и млекопитающих [De Lorenzo, 1970]. Предполагается, что каждая группа созревающих обонятельных клеток может формировать функциональную единицу, ответственную за распознавание определенного запаха.

Все эти данные говорят о том, что использование конфокальной микроскопии окрашенных на F-актин препаратов дает возможность выявлять специфические особенности тонкого устройства сенсорного отдела обонятельной системы, что ранее было сложно увидеть при помощи обычных методов морфологии. Таким образом, этот подход может быть использован в плане изучения приспособительных особенностей обонятельного аппарата у рыб и других животных в связи с их биологией и поведением. Кроме того, окраска на F-актин позволила нам получить новые сведения о ранних этапах развития и дифференцировки рецепторных клеток у рыб (глава 5).

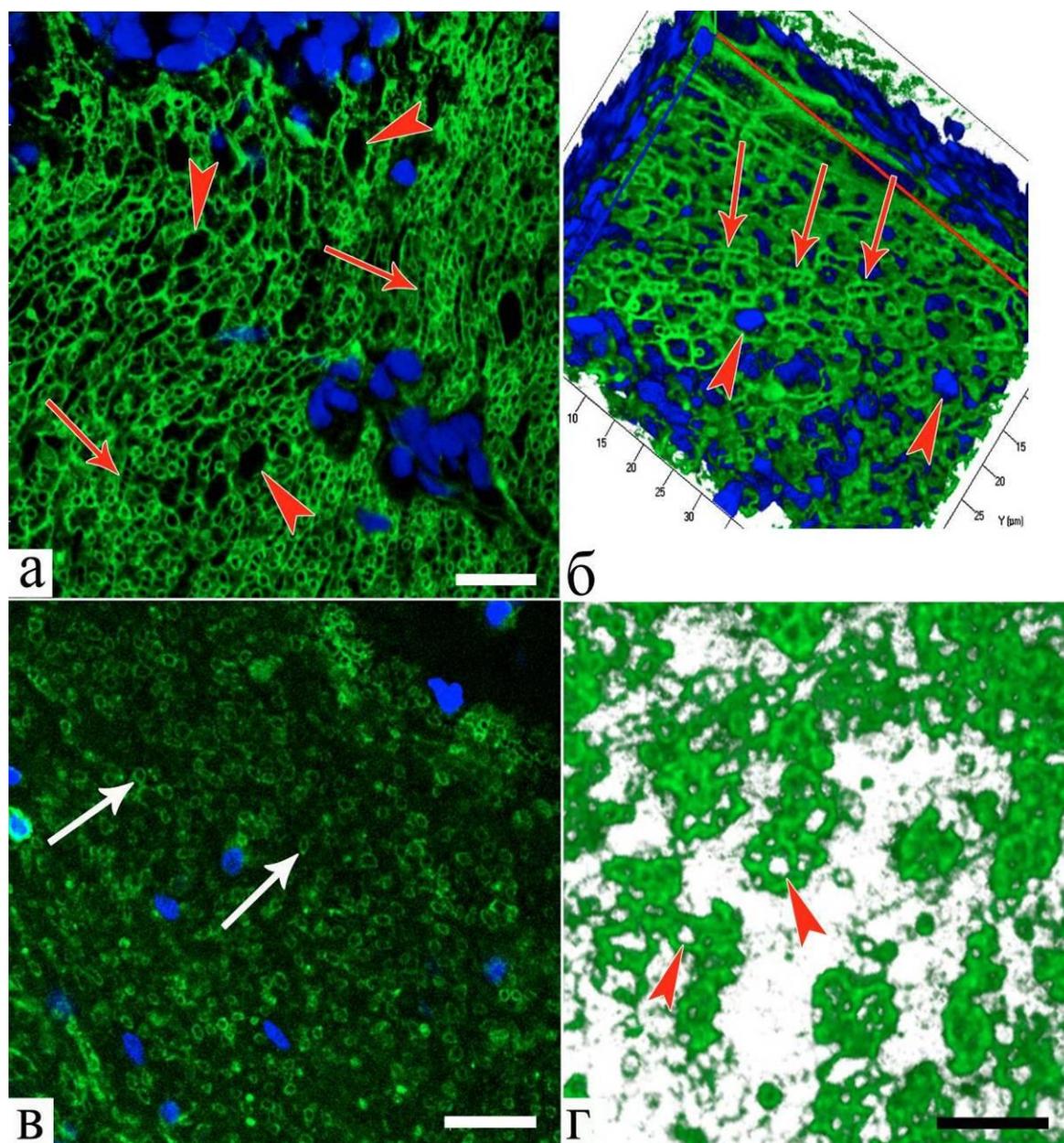


Рисунок 24. Специфические особенности взаимного расположения вершин рецепторных и опорных клеток в обонятельном эпителии у гурами (а, в – 2D реконструкции; б, г – 3D реконструкции. Окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядра (DAPI, синий); конфокальная микроскопия. А, б – зоны эпителия с рецепторными клетками, образующими цепочки (простые стрелки); фигурными стрелками показаны профили плотных контактов с опорными клетками; в, г – зоны эпителия, в которых вершины рецепторных клеток (белые стрелки) очень тесно взаимодействуют с вершинами опорных клеток (фигурные стрелки). Масштаб: 10 мкм.

ГЛАВА 4. ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У ЖЕЛТОКРЫЛКИ В НЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД

4.1 Рецепторные клетки

У рыб в период выбора гнезда и формирования полового поведения (фаза активного нереста) в обонятельных клетках обнаруживаются хорошо выраженные ультраструктурные изменения. В жгутиковых и микровиллярных клетках выявляются признаки интенсивных ядерно-цитоплазматических взаимодействий. В ядерной мембране наблюдается повышенная плотность пор (**рис. 25, а, б**). По сравнению с предшествующим периодом их количество на единицу площади увеличено в 1,4–1,7 раз (с 9 до 12–15 пор на 1 мкм²; $p \leq 0.01$). В промежутках между порами со стороны цитоплазмы с мембраной ядра выявляются многочисленные рибосомы, располагающиеся регулярными группами. Результатом активизации белкового синтеза является появление участков ядерной мембраны с увеличенным просветом перинуклеарного пространства. В непосредственной близости от пор и в прилежащих зонах локализуются также митохондрии с хорошо выраженными кристами. Обычно они вплотную примыкают к ядерной мембране в верхнем полюсе ядра, вблизи с зоной расположения ядрышка. Такое специфическое расположение митохондрий, вероятно, не является случайным и отражает локальность энергозависимых процессов, происходящих между ядром и цитоплазмой. Характерно, что по данным конфокальной микроскопии, при переходе к нересту в сенсорном аппарате рыб выявляется повышенный объем функционально активных митохондрий (**рис. 25, в**). Это вероятно обусловлено активацией как рецепторных, так и опорных мерцательных клеток (сравнительная оценка объемов функционально активных митохондрий в эпителии в донерестовый период и во время репродукции приведена в разделе 4.2). Нужно отметить, что при

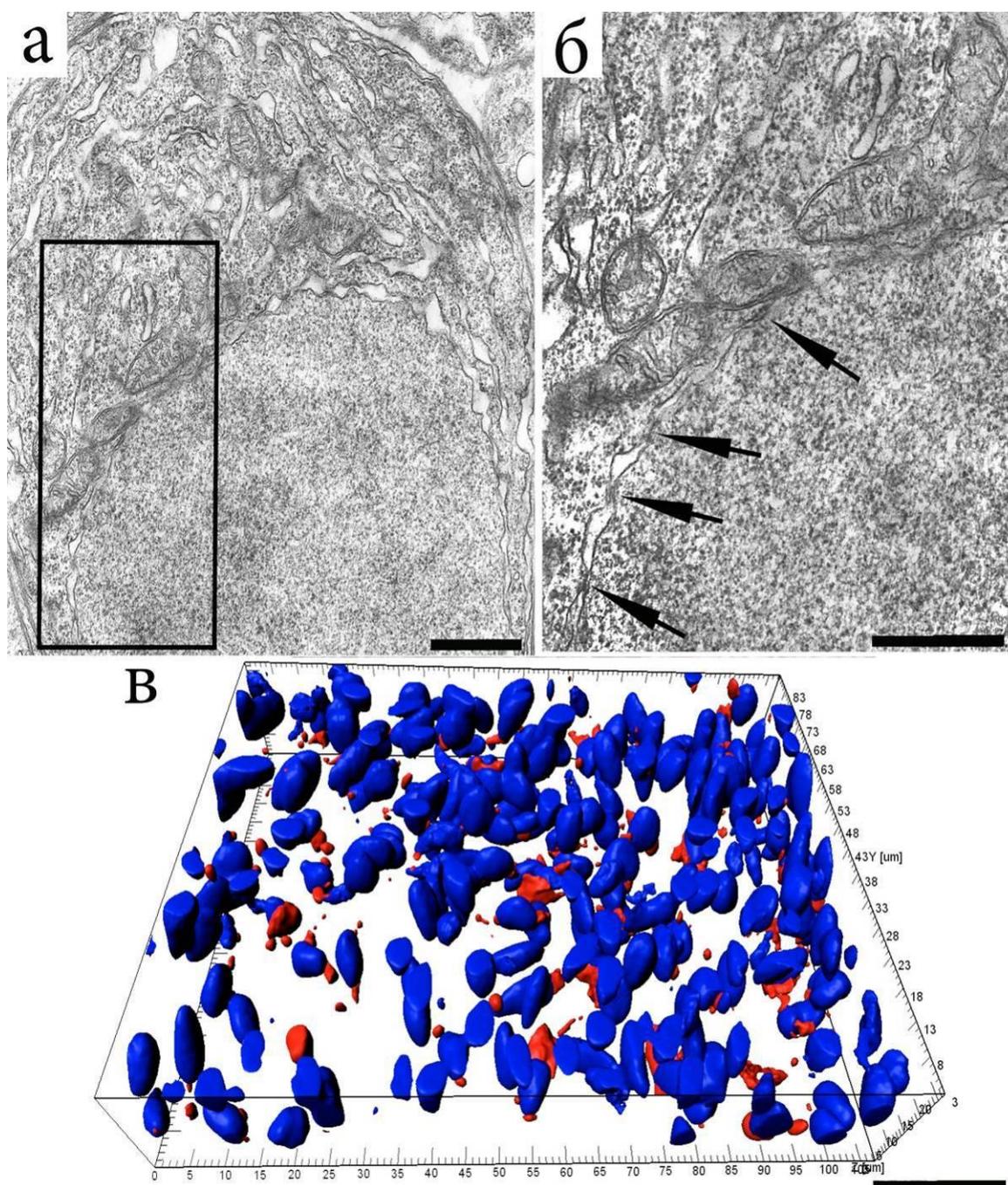


Рисунок 25. А – специфическая локализация митохондрий, вплотную прилегающих к верхнему полюсу ядра в рецепторных клетках у желтокрылки в репродуктивный период; б – увеличенный фрагмент фото "а"; стрелками показаны ядерные поры; в – особенности распределения флуоресцентного сигнала от функционально активных митохондрий в эпителии у нерестовых рыб по данным конфокальной микроскопии. Окраска на митохондрии (MitoTracker® Orange, красный) и ядерный материал (DAPI, синий); 3D-реконструкция. Масштаб: а, б – 500 нм; в – 20 мкм.

интерпретации изображений, полученных при окраске MitoTracker® Orange, необходимо учитывать, что увеличенные размеры флуоресцентного сигнала от митохондрий отражают не размеры митохондрий, а область суммарной продукции флуоресцентного сигнала от связанного с ними красителя.

Кроме того, в эту фазу во многих рецепторных клетках ядрышко смещено к верхнему полюсу ядра и приобретает хорошо выраженную структурированность. При просмотре большого количества материала весьма часто в срез попадают клетки, у которых ядрышко приближено к ядерной мембране так, что часть его гранулярного компонента выходит через поры в цитоплазму (**рис. 26**). В отличие от неполовозрелых рыб, на начальных этапах нереста в цитоплазме жгутиковых и микровиллярных клеток содержится резко увеличенное число, как свободных, так и связанных с каналами ретикулума рибосом. Как правило, они собраны в виде полирибосомальных комплексов, которые занимают значительное пространство цитоплазмы в надъядерной области и, частично, под ядром (**рис. 27**). Увеличение количества рибосом является одним из отчетливо выраженных структурных изменений, наблюдающихся в обонятельных клетках в этот период. На гистограмме видно, что число рибосом в это время в 1,4 раза выше, чем в межнерестовый сезон (**рис. 28**). Кроме того, в чувствительных клетках выявляются хорошо выраженные микротрубочки: в верхних участках тела клетки они образуют параллельные пучки, которые продолжают на всем протяжении периферического отростка, заканчиваясь в матриксе обонятельной булавы (**рис. 29**).

Сравнивая морфологический материал, взятый у желтокрылок на разных этапах их жизненного цикла, можно заметить, что тубулин принимает такую высокополимеризованную форму только в период функциональной мобилизации чувствительной клетки, когда поведение рыб свидетельствует о доминировании раздражителей феромональной природы. Естественно, возникает вопрос: каково назначение такой реорганизации компонентов цитоскелета? Из поведенческих экспериментов [Дмитриева, Остроумов,

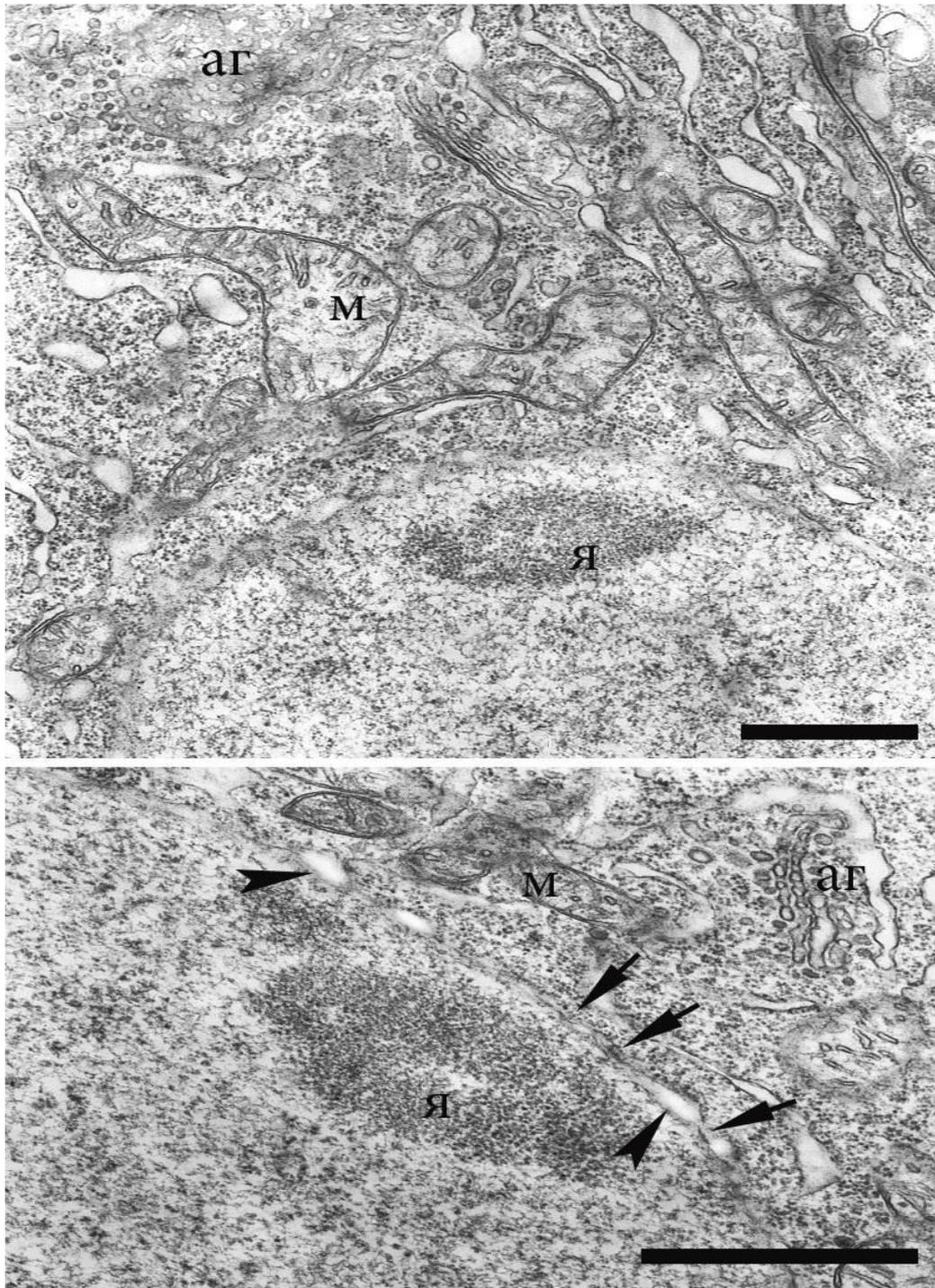


Рисунок 26. Перикарион обонятельных клеток в нерестовый период. Повышенное количество рибосом. Хорошо структурированное ядрышко располагается у верхнего полюса ядра и приближено к ядерным порам (отмечены стрелками). Фигурными стрелками показаны увеличенные просветы периплазматического пространства ядерной оболочки. Условные обозначения: аг – аппарат Гольджи, м – митохондрии, я – ядрышко. Масштаб: 1 мкм.

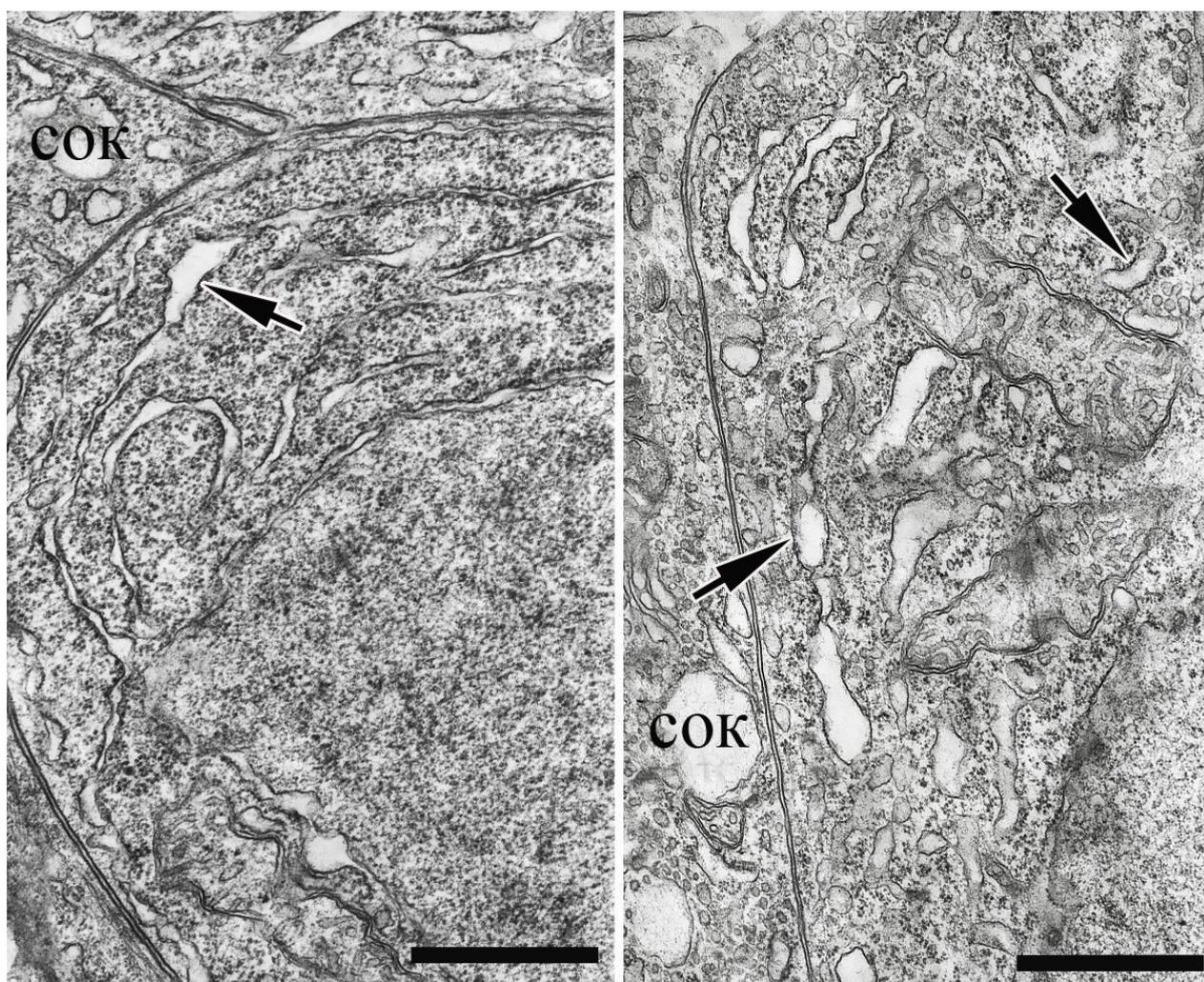


Рисунок 27. Большое количество свободных и связанных с каналами эндоплазматического ретикула рибосом в обонятельных нейронах у рыб в нерестовый период. В отдельных участках каналы ретикула фрагментированы и расширены (показано стрелками). Повышенная секреторная активность секреторных опорных клеток. Условные обозначения: сок секреторная опорная клетка. Масштаб: 1 мкм.

1992] видно, что рыбы к началу размножения теряют ольфакторное восприятие пищевых раздражителей, демонстрируя при этом высокодифференцированную чувствительность к половым феромонам. Вероятно, именно во время этой переходной фазы обонятельный анализатор перенастраивается на восприятие феромонов – качественно новых, биологически значимых агентов, запускающих нерестовое поведение. Как отмечалось выше, некоторые морфологические показатели метаболической

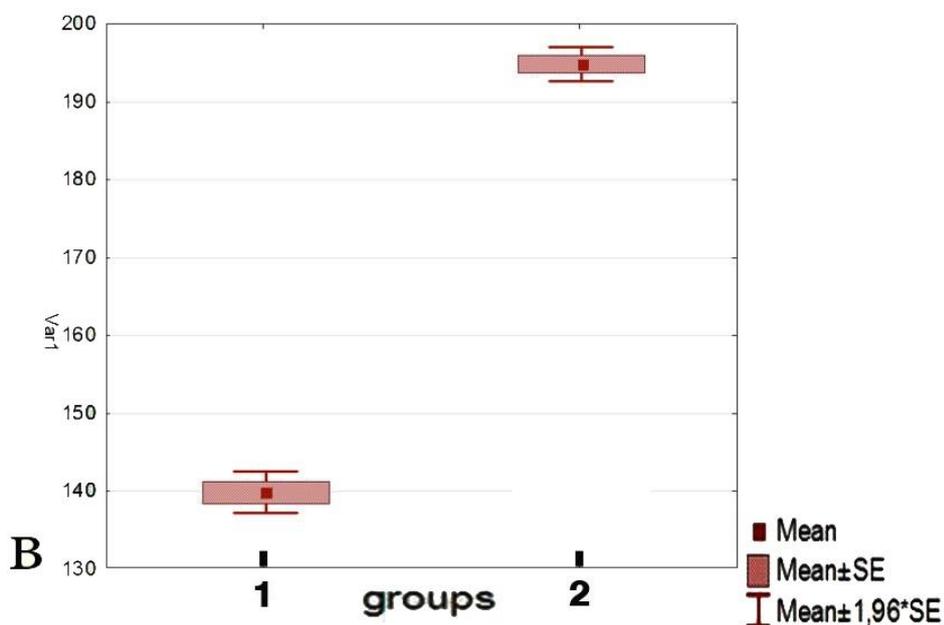
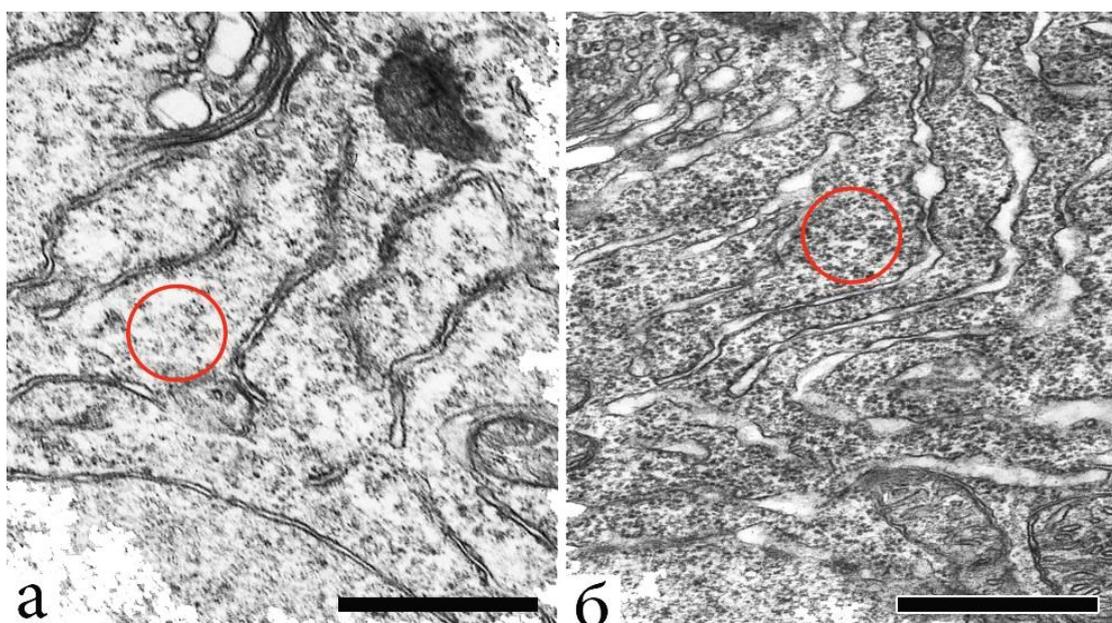


Рисунок 28. Сравнительная оценка оптической плотности свободных рибосом в рецепторных клетках у рыб в донерестовую фазу и во время размножения. Пример сравниваемых областей выделен красным. А – неполовловозрелый период; б – нерест; в – график, отражающий возрастание оптической плотности рибосом в цитоплазме клеток во время репродукции (2) в сравнении с предшествующим периодом (1); $p \leq 0.01$. Масштаб: 1 мкм.

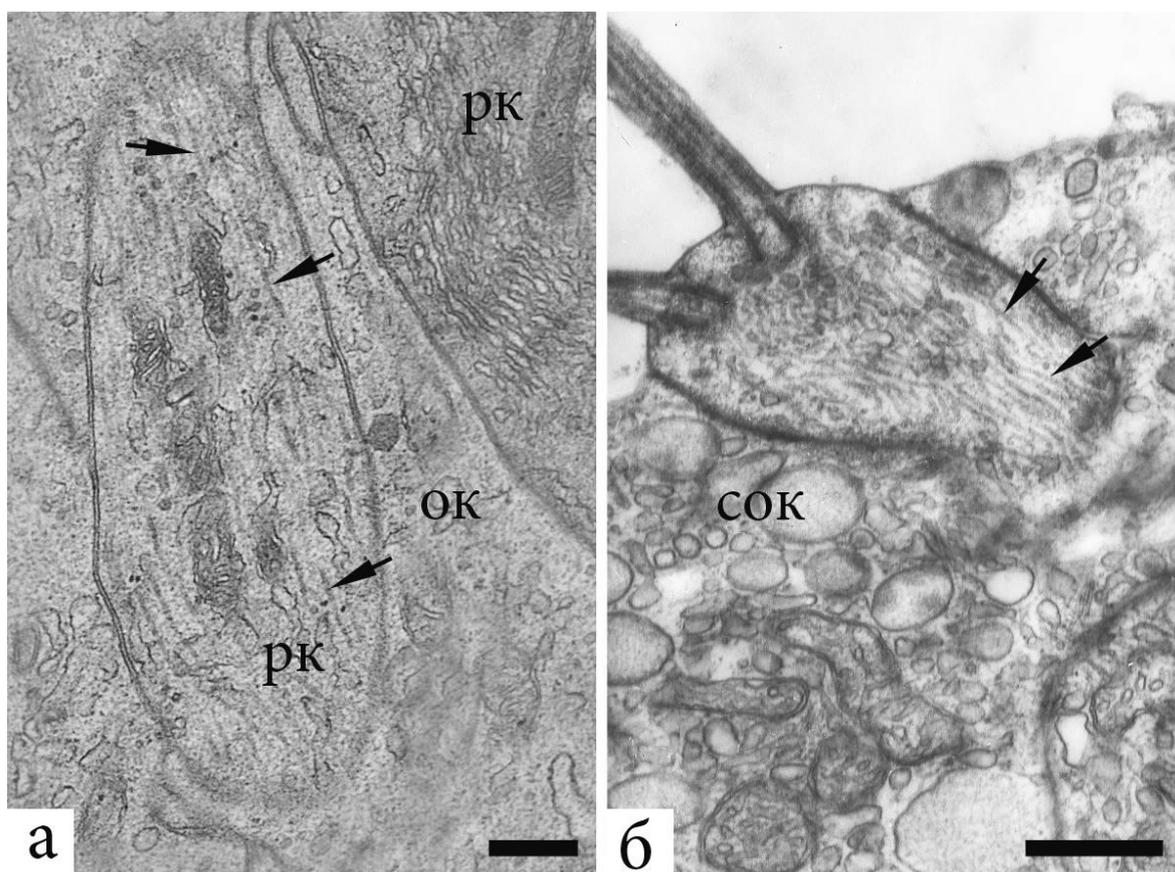


Рисунок 29. Упорядоченная система микротрубочек (показаны стрелками) в дендритах чувствительных нейронов в репродуктивный период. А – периферический отросток; б – апикальный участок клетки. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; сок – секреторная опорная клетка. Масштаб: 0,5 мкм.

активизации наблюдаются в приядерной зоне рецепторных клеток. Возможно, что такая перестройка должна развиваться и на уровне поверхностной мембраны рецептивного отдела клетки, где, как известно, осуществляются первичные процессы восприятия запахов [Menco *et al.*, 1997; Pifferi *et al.*, 2010]. В частности, эти изменения могут сказаться на плотности мембранных рецепторов, их специфичности и обеспеченности соответствующими ферментными системами сигнальных путей, участвующих в трансформации внеклеточных сигналов. Таким образом, наши данные показывают, что выявляемая в нерестовую фазу система цитоплазматических микротубул может быть средством экстренной транспортировки данных молекулярных комплексов от места их синтеза в околоядерной зоне в

направлении апикального участка клетки, где они могут непосредственно вовлечены в первичные процессы трансформации хемокоммуникативных сигналов. Следовательно, упорядоченная организация цитоскелета является важным звеном для перевода обонятельных клеток к состоянию повышенной специфической чувствительности к половым феромонам. Такая система коммуникации между телом клетки и рецепторной зоной дендрита у нерестящихся рыб функционирует, по-видимому, ограниченное время. Как выяснилось, микротрубочки вновь разбираются, когда мотивация к поиску и выбору полового партнера у желтокрылок резко ослабевает, и они приступают к охране икры.

Учитывая, что для обонятельных нейронов так же, как и для В-лимфоцитов [Burnet, 1957] характерна моногенная и моноаллельная экспрессия рецепторных белков, возникает вопрос – могут ли вышеописанные ультраструктурные перестройки сопровождаться возрастанием их специфичности, что характерно для В-клеток памяти [Seifert, Küppers, 2016], обеспечивающих защитный иммунитет против повторяющихся инфекционных агентов? Этот вопрос касается одной из самых сложных проблем, связанных с выявлением молекулярных и цитологических основ нейрональной пластичности обонятельных клеток. К настоящему времени нет достоверных данных о возможности переключения синтеза одорант-связывающих белков на их более специфичные формы.

Важной структурной особенностью рецепторных клеток в начальную фазу родительского поведения (охрана оплодотворенной икры, обеспечение ее жизнеспособности) является наличие у них необычно широкого периферического отростка. Его диаметр в 1,5–3 раза превышает свойственную ему величину в донерестовый период. Обычно увеличение диаметра дендрита наблюдалось по всей его длине, исключая, как правило, зону плотных контактов, расположенную проксимально от обонятельной булавы. В некоторых случаях выявлялись также клетки, у которых просвет

шейки увеличен так, что ее диаметр сравнился с поперечным сечением нижележащих отделов периферического отростка.

Кроме митохондрий и элементов гладкого эндоплазматического ретикулума на всем протяжении дендрита выявляется большое количество пузырьков со светлым содержимым (рис. 30, 31). Их величина варьирует от 0,1 до 0,5 мкм. Такие пузырьки в большом количестве обнаруживаются в теле рецепторных клеток – вблизи хорошо выраженного аппарата Гольджи. Здесь они локализуются как разряженными, так и более концентрированными группами. Характерно, что микротрубочки в этих клетках также поддерживают свою четкую структурированность. В некоторых клетках они видны в виде более или менее вертикально ориентированных коротких фрагментов, расположенных на всем протяжении периферического отростка, локализуясь между митохондриями и светлыми пузырьками. В других случаях удавалось наблюдать микротрубочки, организованные в виде пучков. На срезах, прошедших вдоль вертикальной оси клетки, пучки из параллельно направленных микротрубочек не всегда ориентированы строго вертикально. Иногда, по ходу периферического отростка они сгруппированы в виде спирали, пронизывающей матрикс дендрита от его основания до терминали. В таких случаях в разных участках дендрита в срез попадают микротрубочки, как в поперечном, так и в продольном сечении.

У рецепторных клеток с активизированным синтезом вакуолей диаметр периферического отростка уменьшается лишь в дистальном участке – в зоне плотных контактов, с помощью которых дендрит взаимодействует с опорными клетками. Из электронограмм видно, что такое изменение профиля дендрита сказывается на взаимной ориентации расположенных здесь микротрубочек. При подходе к узкому участку дендрита микротрубочки принимают здесь более упорядоченную организацию,

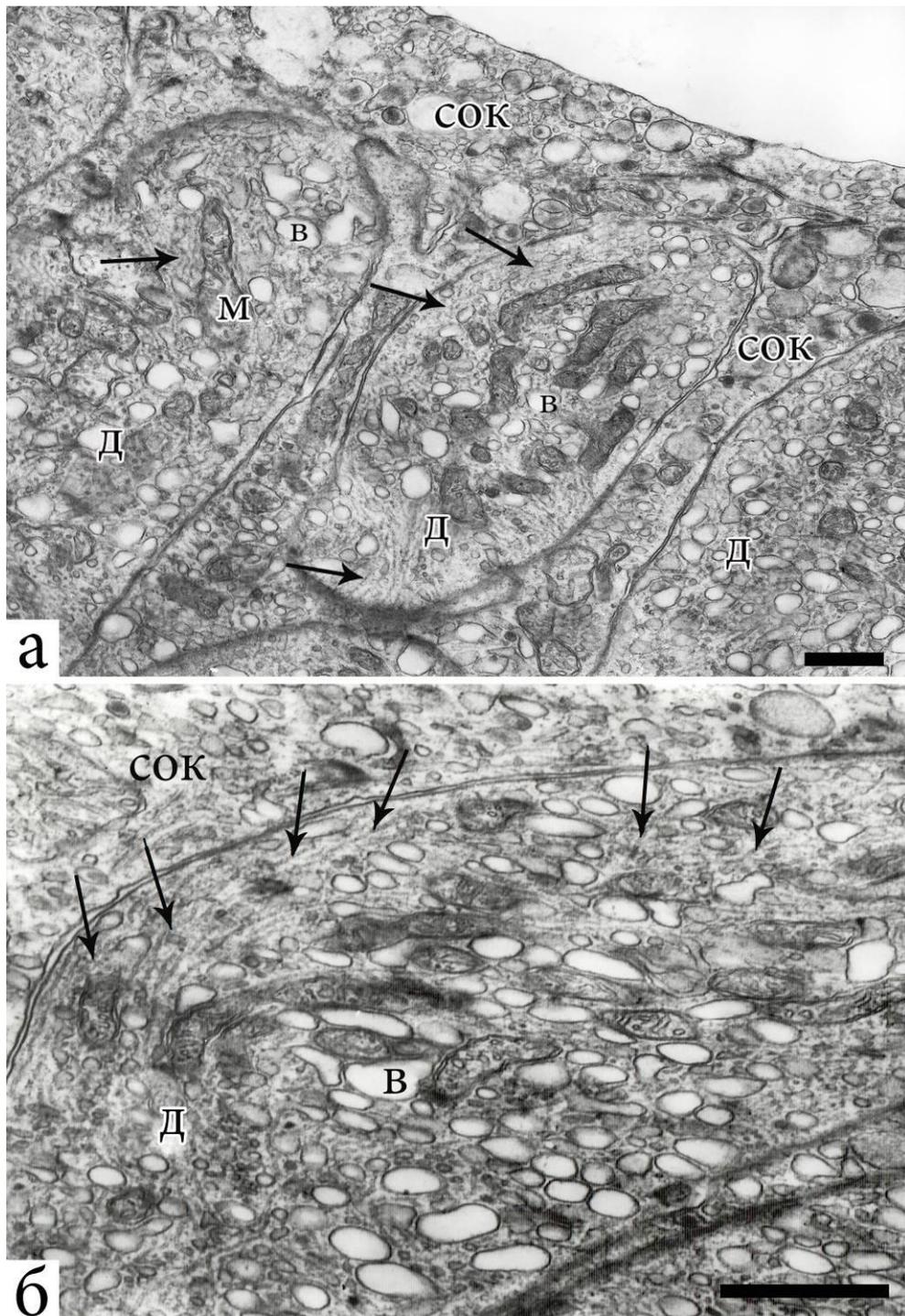


Рисунок 30. Направленный транспорт везикул к апикальному участку дендрита при переходе самцов рыб в фазу родительского поведения. А – три дендрита с большим количеством везикул в окружении опорных клеток секреторного типа; б – высокая плотность микротрубочек вблизи с везикулами. Условные обозначения: д – дендрит; сок – секреторная опорная клетка; в – везикула; стрелками показаны микротрубочки. Масштаб: 1 мкм.

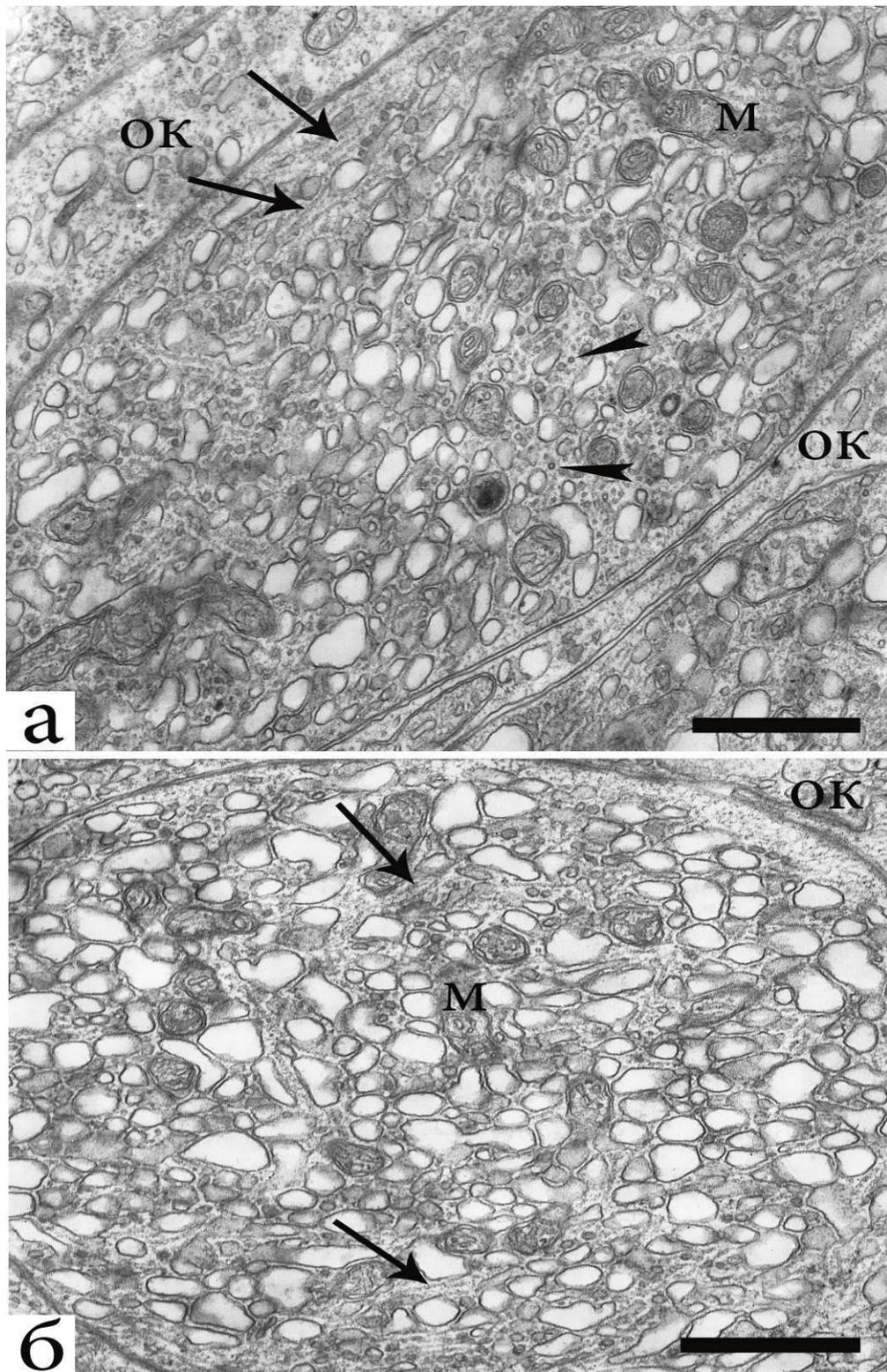


Рисунок 31. Дендриты обонятельных клеток в фазу активной нейросекреции. А – продольный срез; б – сильно расширенный профиль периферического отростка рецепторной клетки с большим количеством секреторных пузырьков (поперечный срез). Условные обозначения: ок – опорная клетка; м – митохондрии; большое количество микротрубочек в продольном (простые стрелки) и поперечном (фигурные стрелки) сечении. Масштаб: 1 мкм.

выстраиваясь параллельно друг другу (**рис. 32, а**). Оказалось, что плотность и взаимная ориентация микротрубочек влияют на величину вакуолей, которые транспортируются вдоль периферического отростка к вершине клетки. Особенно ярко это влияние проявляется в области плотных контактов (под обонятельной булавой). Светлые пузырьки, доставленные сюда из тела клетки, имеют разный диаметр. В суживающемся участке дендрита крупные вакуоли (0,3–0,5 мкм) фрагментируются на более мелкие везикулы (0,1–0,2 мкм) и уже в таком преобразованном виде поступают в обонятельную булаву. Далее, внутри нее они вновь объединяются с образованием более крупных вакуолей (**рис. 32, б**).

На серийных ультратонких срезах достоверно показано, что клетки, в которых идет интенсивный синтез пузырьков и их транспорт вдоль периферического отростка, имеют булаву без жгутиков (или микровилл). Сканирующая микроскопия подтверждает это положение (**рис. 33**). Известно, что вся площадь поверхностной мембраны жгутиков и микровилл участвует в обеспечении первичных процессов хеморецепции [Piffer et al., 2010]. Вероятно клетки, у которых отсутствуют эти структуры, теряют способность к восприятию запахов. Важность этого морфо-функционального отдела требует более подробного рассмотрения вопроса о том, каким образом клетки могут лишаться поверхностного хемочувствительного аппарата. Как уже отмечалось, светлые пузырьки, образованные в теле клетки, обнаруживаются не только на всем протяжении периферического отростка, но и в самой вершине клетки. Можно предположить, что в процессе такого переноса вакуолей важную роль играют микротрубочки, которые начинаются в теле клетки и заканчиваются в терминали дендрита. На срезах видно, что по мере поступления в матрикс булавы они вплотную сближаются с поверхностной мембраной, встраиваются в нее и выделяют содержимое в обонятельную слизь (**рис. 34, а**). Таким образом, вершина клетки не является

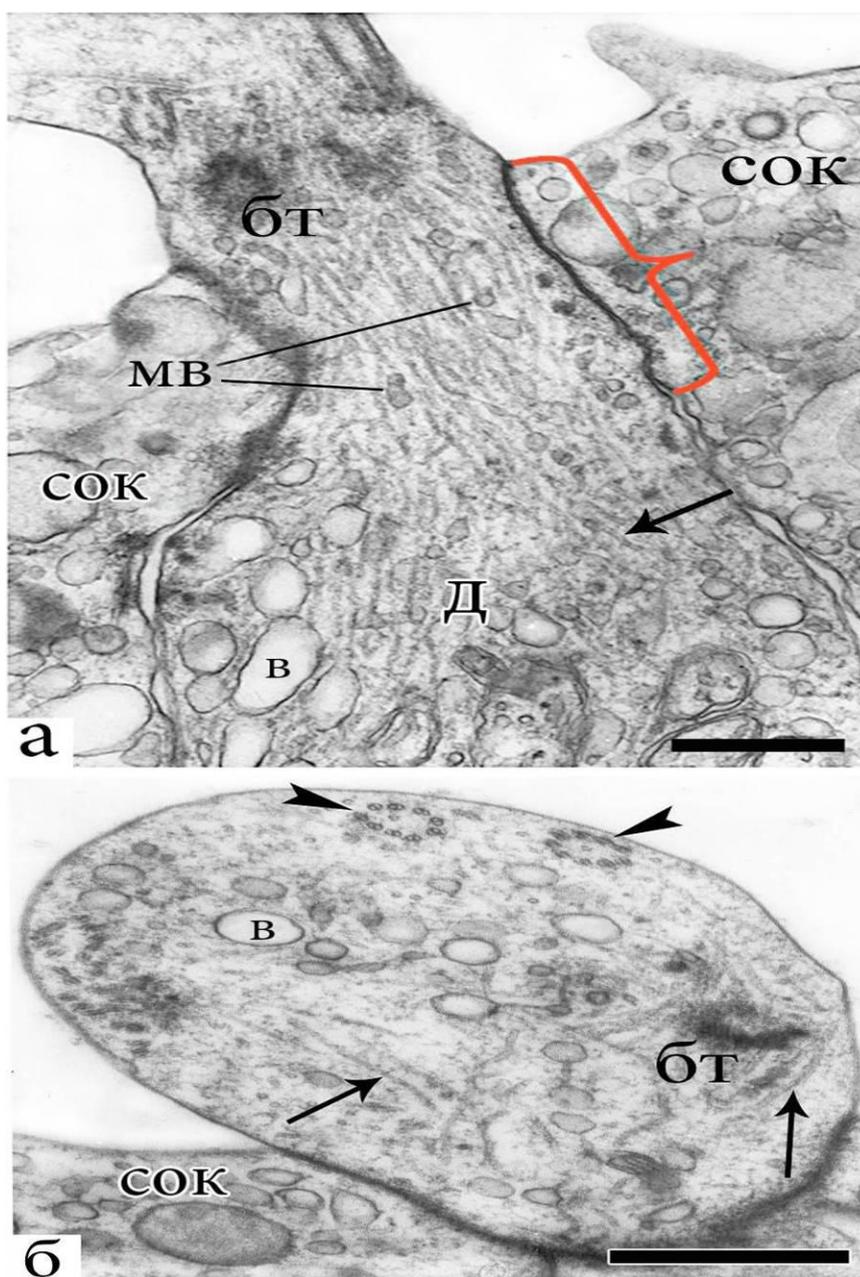


Рисунок 32. Секреторные пузырьки в апикальных отделах дендрита. А – дистальный участок периферического отростка с высокой плотностью микротрубочек. Фигурной скобкой обозначена область плотных контактов; б – обонятельная булава с небольшим количеством крупных секреторных пузырьков. Видны цитоплазматические микротрубочки (простые стрелки) и поперечные срезы микротубулярных аппаратов ресничек (фигурные стрелки), погруженных в матрикс цитоплазмы; Условные обозначения: д – дендрит; сок – секреторная опорная клетка; в – секреторные везикулы; бт – базальное тельце. Масштаб: 0,5 мкм.

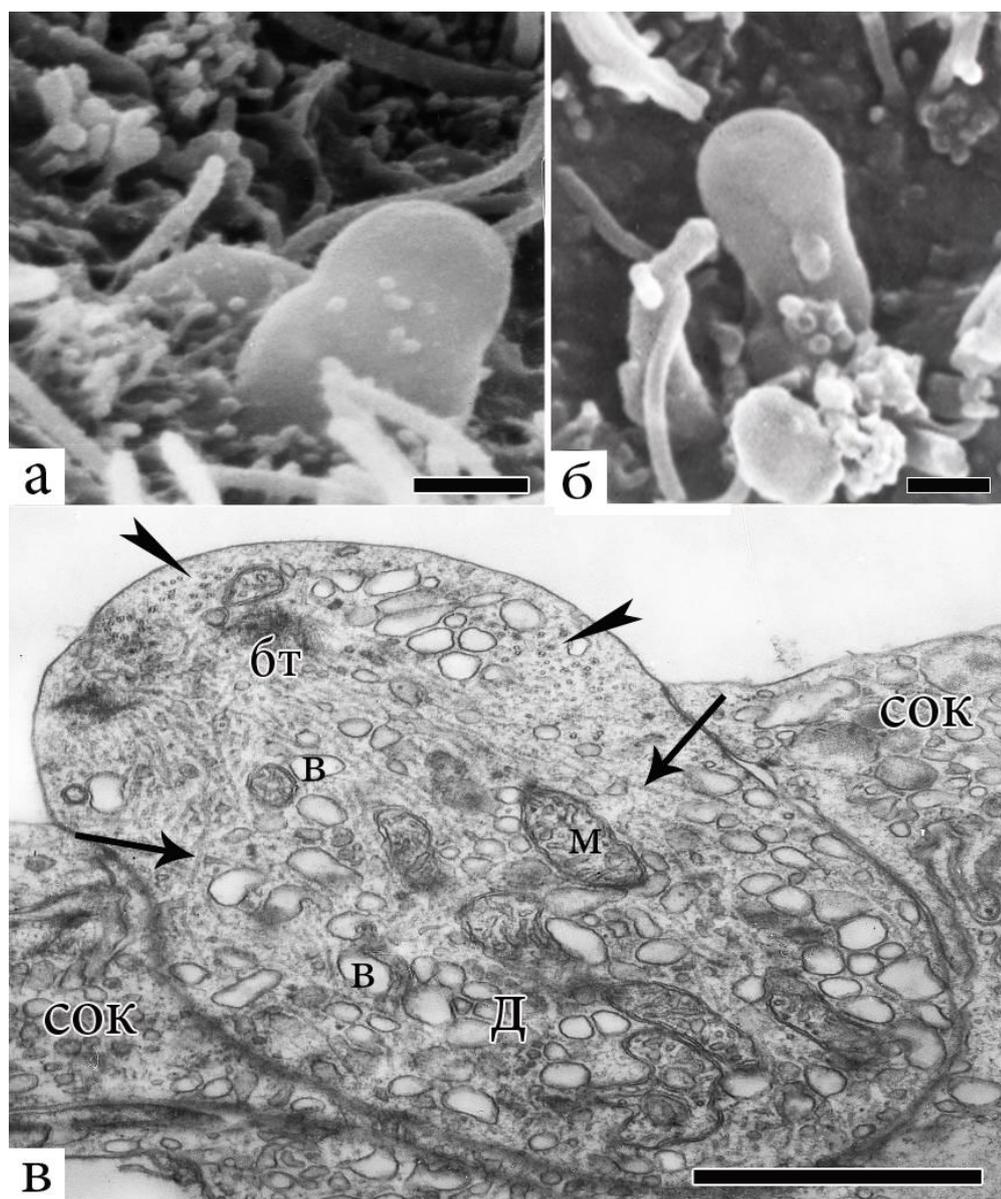


Рисунок 33. Вершины рецепторных клеток при их перестройке на режим дендритной нейросекреции. А, б – увеличенный объем обонятельной булавки без чувствительных ресничек/микровилл (сканирующая электронная микроскопия); в – внутри вершины содержится большое количество секреторных везикул, микротрубочек и митохондрий. Условные обозначения: д – дендрит; в – везикулы; сок – секреторная опорная клетка; м – митохондрии; простые стрелки – цитоплазматические микротрубочки; фигурные стрелки – микротрубочки ресничек, погруженных внутрь клетки. Масштаб: 1 мкм.

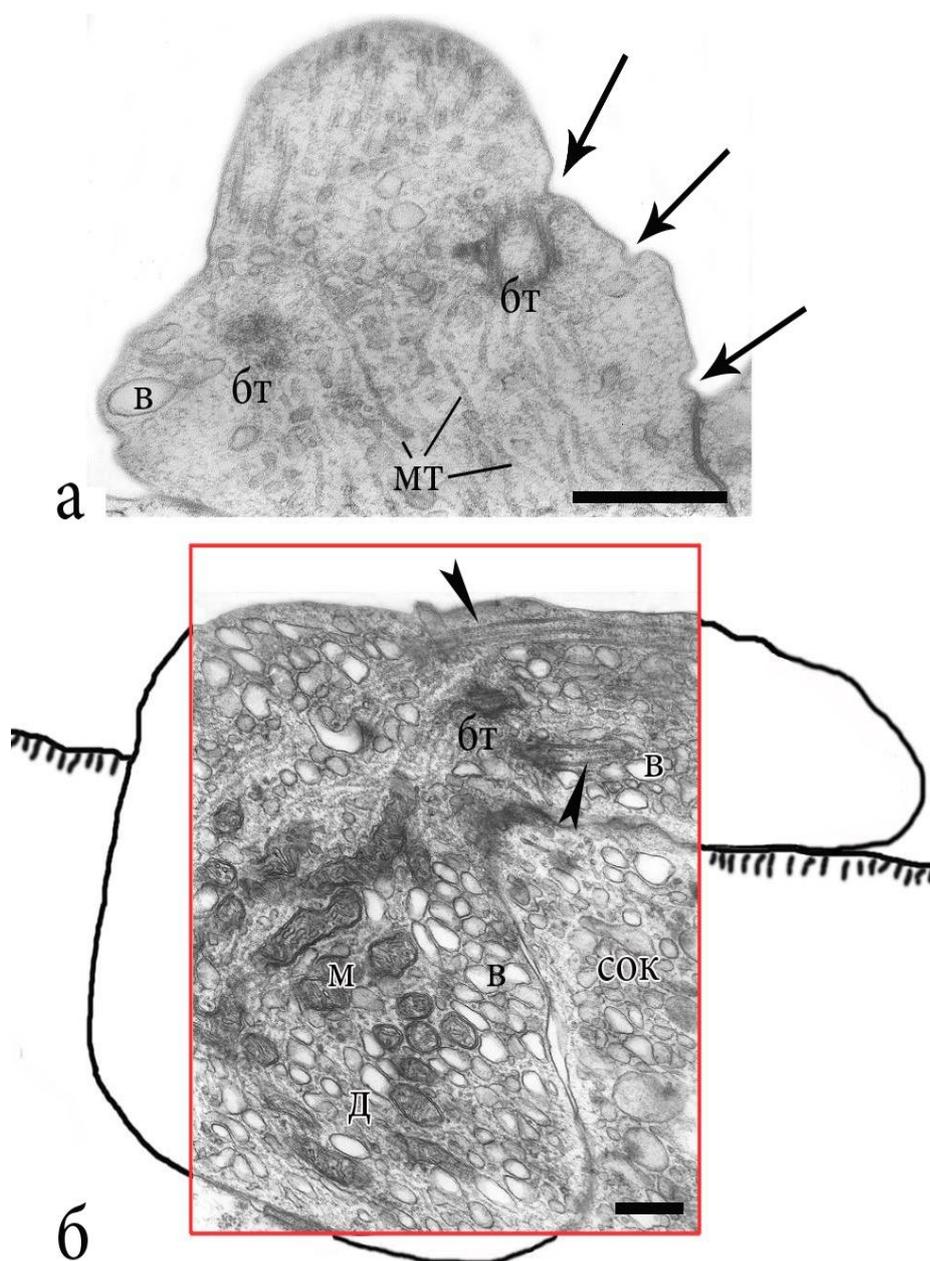


Рисунок 34. Структурная трансформация вершины рецепторной клетки в процессе дендритной нейросекреции. А – встраивание секреторных везикул (простые стрелки) в поверхностную мембрану булав; б – фрагмент вершины клетки после изменения ее формы (выделены контуры всего профиля среза клетки). Условные обозначения: д – дендрит; сок – секреторная опорная клетка; мт – микротрубочки дендрита; в – везикулы; м – митохондрии; фигурные стрелки – микротрубочки ресничек. Масштаб: 0,5 мкм.

местом депонирования пузырьков. Клетки, в которых активируется сборка секреторных везикул, обонятельная булава вначале сохраняет обычную для них форму. Затем, по мере встраивания мембранного материала пузырьков в поверхностную мембрану, ее объем постепенно увеличивается. Она деформируется, вытягиваясь на длину, иногда в 2–4 раза превышающую ее первоначальную величину. У таких клеток обонятельная булава не удерживается в прежнем положении. Она изменяет свою вертикальную направленность, изгибается, иногда принимая положение, параллельное поверхности эпителия (рис. 34, б; 35). В этой растущей зоне присутствует значительное количество пузырьков, которые непрерывно доставляются сюда из тела клетки. По морфологическим признакам видоизмененная булава во многом напоминает передний участок растущего аксона – конус роста. Характерно, что у таких клеток базальные тельца жгутиков сохраняются на прежнем месте, оказываясь прикрытыми в верхних отделах булавки большим скоплением пузырьков (рис. 35). Нами проведены детальные морфологические исследования апикальных отделов рецепторных клеток в процессе их такой структурной дифференцировки. На разноплоскостных срезах выявлены промежуточные фазы, возникающие в структурах обонятельной булавки при ее переходе на режим секреции. При этом один из важных вопросов состоял в изучении структурных изменений жгутикового аппарата. Известно, что обонятельные жгутики подвергаются деструктивным изменениям в процессе естественной гибели клетки [Graziadei, Graziadei, 1976], после эндогенного воздействия гормонов [Pankhurst, Lithgoe, 1983], или в результате влияния других неблагоприятных физико-химических факторов [Дорошенко, Мотавкин, 1986].

На нашем материале видно, что жгутики могут не сбрасываться наружу, как это происходит при воздействии поверхностно-активных веществ (глава 6). В процессе дендритной нейросекреции они обнаруживаются в матриксе обонятельной булавки, причем, базальное тельце

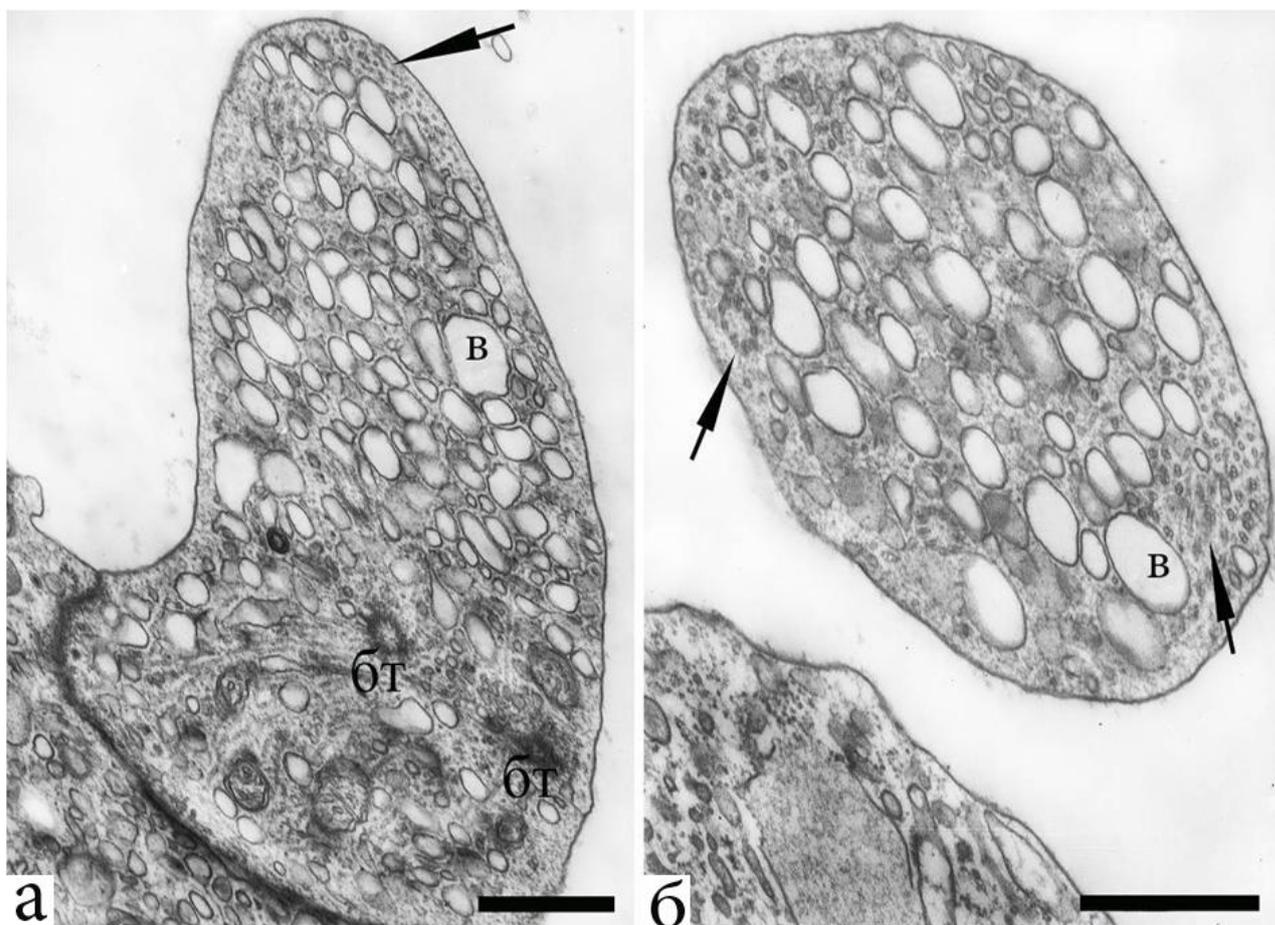


Рисунок 35. Структурная трансформация вершины рецепторной клетки для обеспечения нейросекреции на поверхность обонятельного эпителия. За счет встраивания мембранного материала секреторных пузырьков вершина клетки формирует конус роста (а), который постепенно удлиняется и изменяет свою вертикальную направленность (б). Условные обозначения: в – секреторные везикулы; бт – базальное тельце; стрелками отмечена дезагрегация микротрубочек ресничек, погруженных внутрь терминали дендрита. Масштаб: 0,5 мкм.

и микротрубочки жгутиков могут какое-то время сохранять свою структурную организацию, сохраняя свойственную им схему взаимного расположения $((9 \times 2) + 2)$ (рис. 36, а). Характерно, что внутри терминали дендрита микротубулярный аппарат жгутиков не окружен наружной мембраной, всегда замыкающей их в целостную структуру вне клетки.

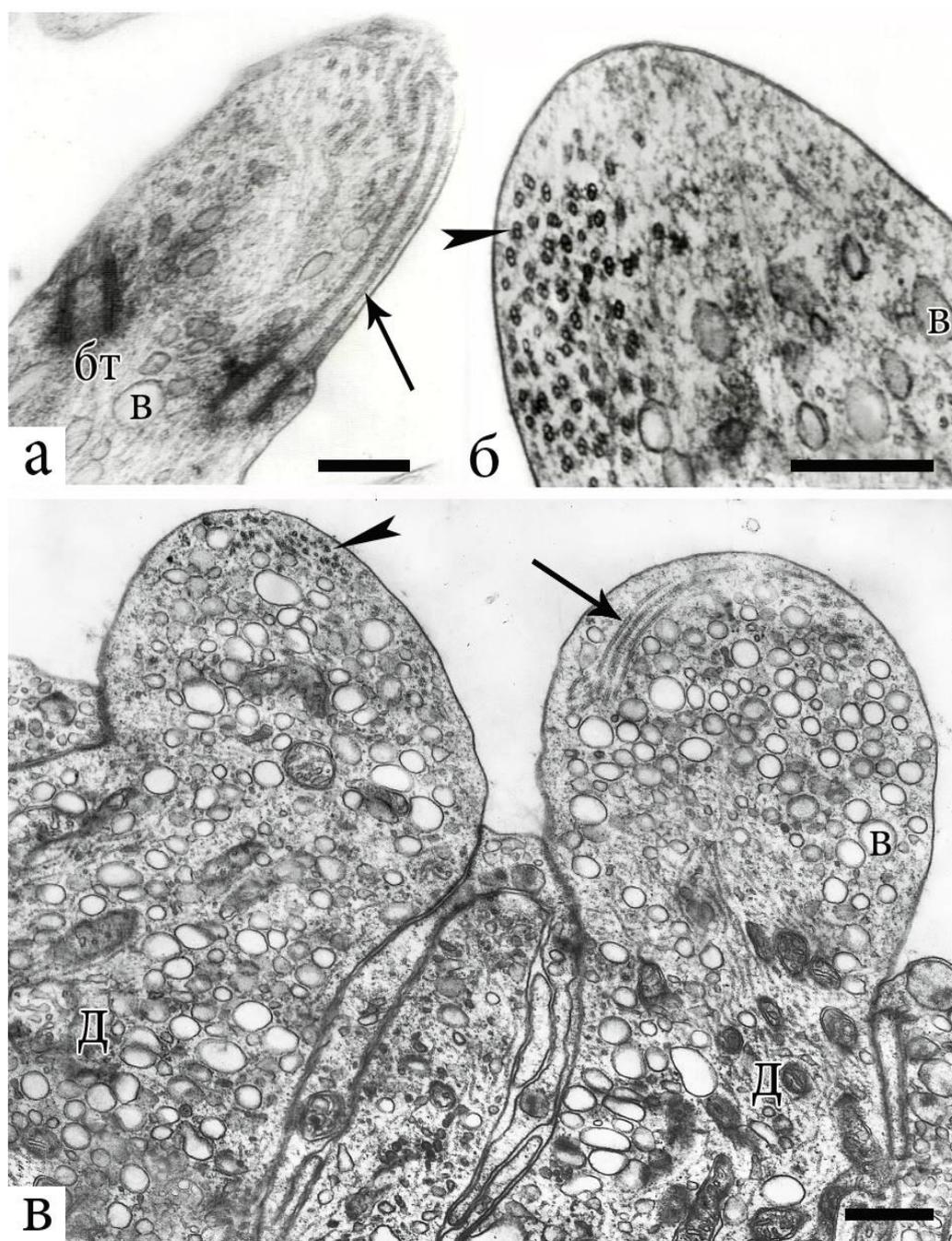


Рисунок 36. Морфологические изменения вершин рецепторных клеток в разные фазы их структурной дифференцировки. А – аксонема реснички локализуется внутри булавы; б – дезагрегация микротрубочек реснички на поздних этапах трансформации булавы; в – дистальные участки двух обонятельных клеток в ходе дендритной нейросекреции. Условные обозначения: д – дендрит; в – секреторные везикулы; простые стрелки – продольный срез микротрубочек ресничек; фигурные стрелки – поперечный срез реснички. Масштаб: 0,5 мкм.

Изучение видоизмененных вершин рецепторных клеток показывает, что реснички, погруженные внутрь дендрита, постепенно дезагрегируются. У таких клеток часто наряду с обычными $((9 \times 2) + 2)$, выявляются также аксонемы, в которых принцип их строгого взаимного расположения существенно нарушен (**рис. 36, б, в**). При этом структурные связи между дуплетами соседних микротрубочек повреждаются, что ведет к их взаимному смещению и разрушению исходной нативной архитектоники. В результате такой дезориентации они видны в виде неупорядоченно расположенных одиночных и сдвоенных микротрубочек. Существенно то, что и в этом случае микротрубочки, составляющие ранее девять периферических дуплетов аксонемы, по-прежнему располагаются парами. На срезах, прошедших параллельно расположению микротрубочек, хорошо видно, что они не прерываются, сохраняя целостность на всем своем протяжении. Это говорит о высокой структурной стабильности жгутиковых микротрубочек. Фотографии, отражающие поэтапные изменения вершин клеток, свидетельствуют о том, что непрерывный прирост поверхностной мембраны терминали дендрита за счет встраивания секреторных везикул может быть причиной «погружения» аксонем жгутиков внутрь булавы. Возможно, что этому процессу может способствовать и то, что базальные тельца ресничек сохраняются на прежних местах и не перемещаются в направлении растущих участков вершины клетки. Вероятно в результате такого "обрастания" жгутик теряет свойственные ему ранее двигательные и хеморецепторные свойства. Несмотря на то, что объем терминали дендрита выглядит увеличенным, тем не менее, суммарная площадь ее поверхности оказывается резко сниженной. Процесс ультраструктурных перестроек обонятельной булавы, наблюдающихся у гидробионтов в ходе их репродуктивного поведения, показан на схеме (**рис. 37, а**). Аналогичное возрастание объема апикального участка за счет встраивания везикул происходит и у микровиллярных рецепторных клеток. Отличительная особенность вершин этих клеток состоит в том, что они не содержат микротрубочек, как это наблюдается у

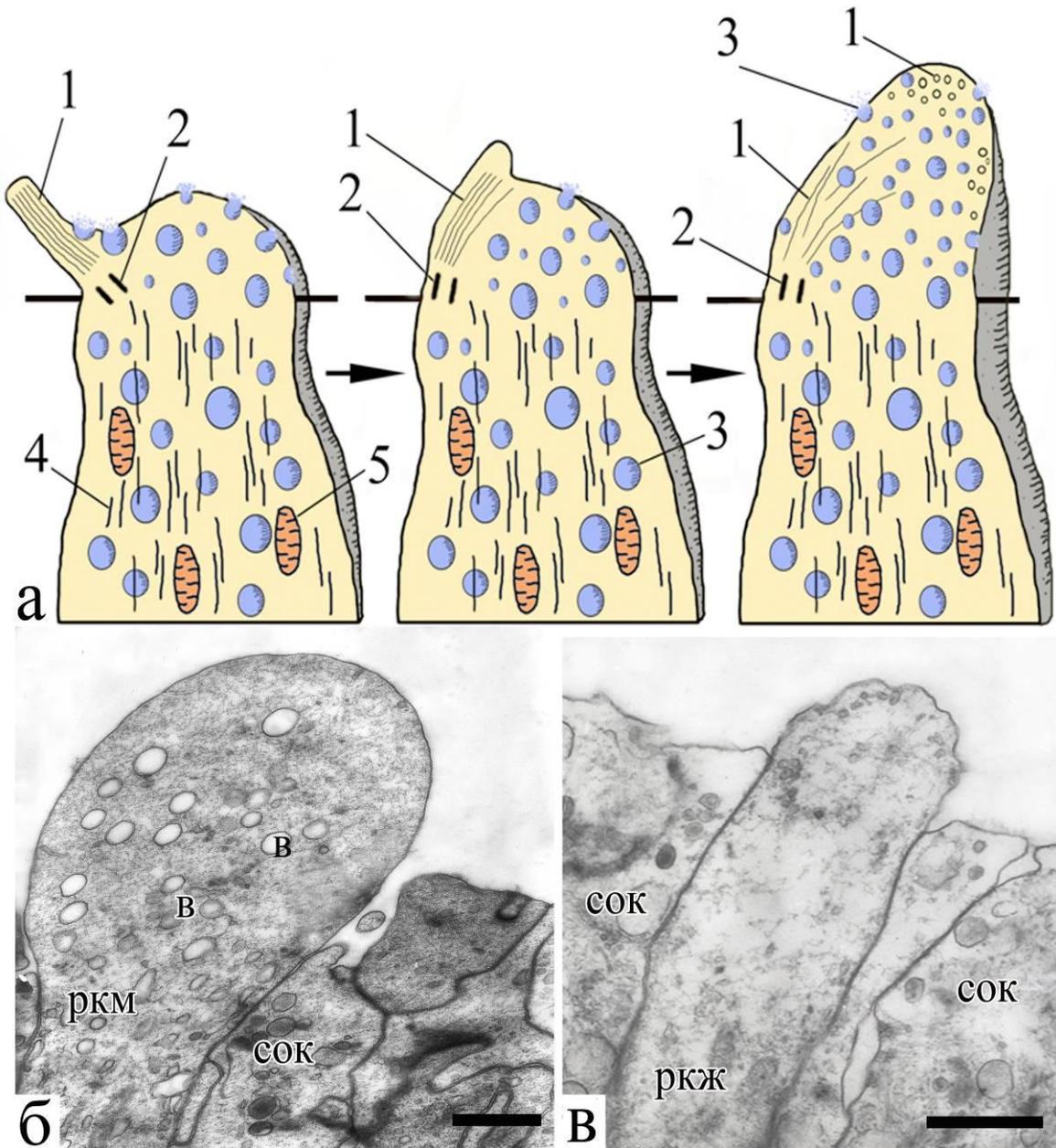


Рисунок 37. А – обобщенная схема последовательных этапов структурной реорганизации вершины рецепторной клетки жгутикового типа при ее переключении на режим дендритной нейросекреции у желтокрылки. Условные обозначения: 1 – жгутики; 2 – базальные тельца; 3 – секреторные пузырьки; 4 – микротрубочки дендрита; б – апикальный участок рецепторной клетки микровиллярного типа с секреторными везикулами у рыб в период охраны оплодотворенной кладки; в – дегенеративные изменения терминали дендрита рецепторной клетки у рыб при переходе к родительскому поведению. Условные обозначения: ркм – рецепторная клетка микровиллярного типа; ркж – рецепторная клетка жгутикового типа; сок – секреторная опорная клетка.

клеток жгутикового типа. На **рис. 37, б** показана обонятельная булава микровиллярной такой клетки с поступающими в нее вакуолями со светлым содержимым.

Таким образом, уже в конце нерестового периода рецепторные клетки начинают терять жгутики и микровиллы, в которых локализованы рецепторные компоненты. Объем самой обонятельной булавки увеличивается за счет встраивания мембранного материала пузырьков в ее апикальный участок, вероятно, замещая при этом располагавшиеся там рецепторные зоны. За счет этого специализированная обонятельная клетка, по-видимому, теряет способность к хеморецепции. При переходе самцов желтокрылок в фазу родительского поведения в рецепторных клетках наблюдаются нейродегенеративные изменения, сопровождающиеся деструкцией основных структурных компонентов, как тела клетки, так и ее дендрита, включая терминаль с чувствительными ресничками или микровиллами (**рис. 37, в**). К этому времени рыбы перестают питаться, реагировать на половые феромоны и приступают к охране икры.

Анализируя структуру обонятельных клеток в фазу секреции, возникает вопрос: можно ли их теперь называть рецепторными, поскольку они не имеют свойственный обычным клеткам комплекс специализированных структур, обеспечивающих хеморецепцию? Напротив, они лишены жгутикового (или микровиллярного) аппарата, активно синтезируют секреторные пузырьки, транспортируют их вдоль периферического отростка к верхнему полюсу клетки и путем экзоцитоза выделяют содержимое в обонятельную слизь. Как видно из описания, их морфологические особенности соответствуют признакам типичной секреторной клетки. Из приведенных данных можно сказать, что структурные перестройки, отчетливо выраженные вначале в теле обонятельной клетки, в дальнейшем распространяются и на ее дистальный участок. Причем, обонятельная булава в ходе этих изменений лишается жгутиков (или микровилл) и трансформируется для обеспечения новой

функции – нейросекреции. Такие морфологические изменения апикального отдела чувствительных клеток очень напоминают процесс необратимых дегенеративных изменений, которыми всегда заканчивается их жизненный цикл. Внешнее сходство особенно хорошо проявляется в фазу, когда в том и в другом случае вершина клеток еще имеет свойственную им форму, но уже лишена поверхностного хемочувствительного аппарата. Вероятно, нужно различать процессы адаптивных ультраструктурных перестроек рецепторных клеток, которые направлены на формирование последовательных фаз сложного поведения животного с естественными процессами их гибели, постоянно происходящими в эпителии. При сопоставлении этих двух состояний только на ультраструктурном уровне можно убедиться в очевидной разнице между дегенерацией чувствительных клеток и активными процессами их дифференцировки, при которой клетки вначале проявляют признаки усиления рецепторной функции, а затем (на более поздней стадии) переходят на режим дендритной нейросекреции. Таким образом, отсутствие поверхностных чувствительных структур у рецепторной клетки не является показателем ее дегенерации: во время нереста жгутики обнаруживаются внутри обонятельной булавы, где каждый из них сохраняет свойственную им морфологию. Здесь же располагаются хорошо структурированные базальные тельца, многочисленные светлые пузырьки, микротрубочки, продолжающиеся из периферического отростка, а также хорошо выраженные в теле клетки признаки интенсивного белкового синтеза – высокая плотность рибосом и многочисленные митохондрии. Все эти структурные признаки характеризуют терминаль дендрита и клетку в целом в метаболически активном состоянии, никак не похожем на картину дегенеративных изменений (обобщенная схема морфологических изменений обонятельных клеток в разные фазы репродуктивного поведения рыб дана на **рис. 38**). Характерно, что в период нереста только у 20 % клеток периферический отросток и обонятельная булава заполнены пузырьками в такой степени, что

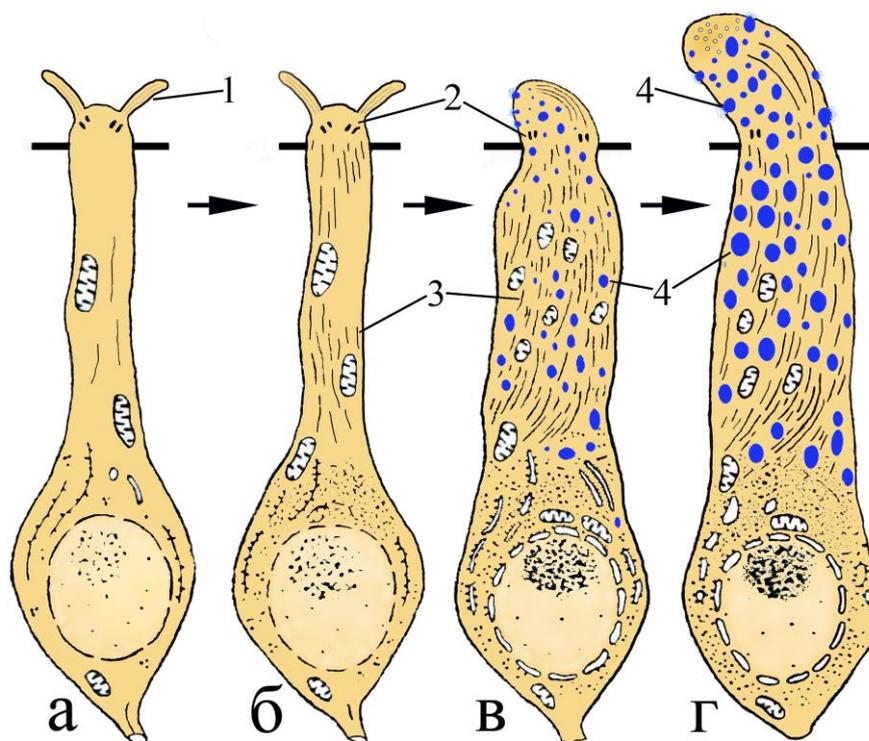


Рисунок 38. Ультраструктурные особенности рецепторных клеток в донерестовый период (а) и в разные фазы репродуктивного поведения (б–г) у желтокрылки; б – период вызревания и вымета половых продуктов; в, г – фаза родительского поведения (охрана оплодотворенной икры). Условные обозначения: 1 – жгутики; 2 – базальные тельца; 3 – микротрубочки дендрита; 4 – секреторные пузырьки.

их можно идентифицировать как секреторные. Это говорит о том, что активация синтеза светлых пузырьков происходит избирательно и не охватывает в одинаковой степени все обонятельные клетки. На **рис. 39, а** показаны поперечные срезы двух рядом расположенных периферических отростков рецепторных клеток, окруженных телами опорных элементов. Этот срез хорошо демонстрирует картину их различного структурного развития, хотя эти клетки отстоят друг от друга на незначительном расстоянии. На профиле одного из отростков наблюдаются обычные для этой зоны чувствительной клетки органеллы – митохондрии и элементы гладкого эндоплазматического ретикулаума, тогда как в аналогичной области соседнего нейрона дополнительно выявляются многочисленные секреторные пузырьки.

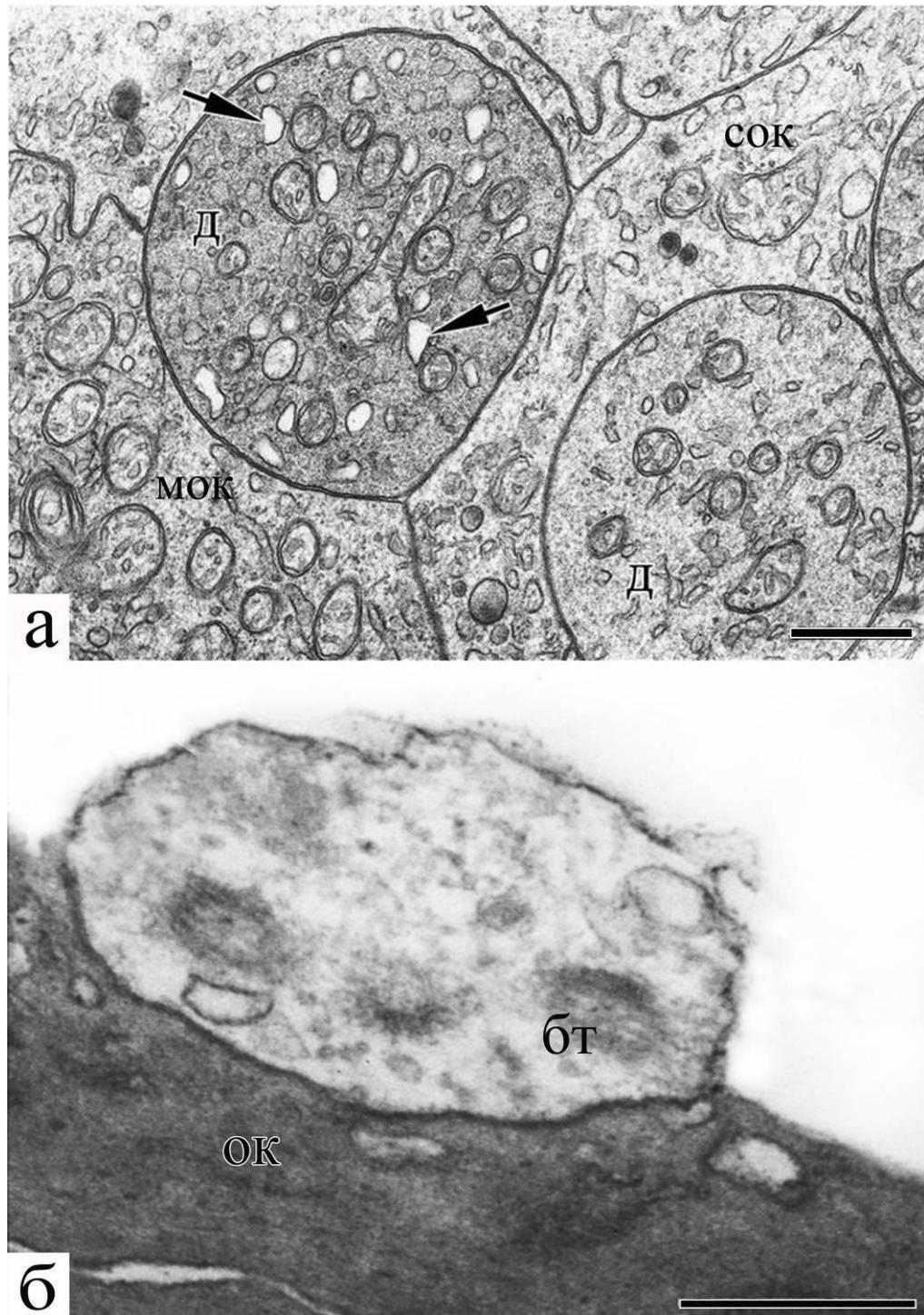


Рисунок 39. Избирательная дендритная нейросекреция и дегенерация в обонятельном эпителии у желтокрылки. А – два профиля дендритов, в одном из которых наблюдается транспорт секреторных пузырьков (показаны стрелками); б – вершина дегенерирующей обонятельной клетки с просветленным матриксом. Условные обозначения: д – дендрит; сок – секреторная опорная клетка; мок – мерцательная опорная клетка; ок – опорная клетка; бт – базальное тельце. Масштаб: 0,5 мкм.

Такой выборочный характер активации синтеза вакуолей в разных клетках можно видеть во всех складках обонятельной розетки. Обнаруженные факты морфологической неоднородности нейронов эпителия, вероятно, предопределяются их разной специфичностью к одорантам и интересны в связи с обсуждаемым феноменологическим сходством механизмов их функционирования с клетками иммунной системы (раздел 5.1).

Как долго может продолжаться возникший в обонятельной клетке секреторный процесс? Способна ли она вновь возвращаться к исходному состоянию, приобретая прежнюю структурную организацию, включая ее апикальный отдел? На наших препаратах среди вершин рецепторных клеток, заполненных вакуолями, встречались такие же по форме терминали дендритов, но с просветленным матриксом, в котором различались фрагменты деструктированных базальных телец (**рис. 39, б**). Нами не были получены однозначные подтверждения того, каким рецепторным клеткам принадлежат такие булавы – истощенным в результате возникшего в них секреторного процесса, или типичным клеткам, дегенерирующим в конце их жизненного цикла. Неясен также вопрос о том, сохраняются ли центральные отростки у клеток, рецепторный отдел которых в ходе морфологических перестроек лишается хемочувствительных элементов. Как упоминалось в разделе 1.2, в обонятельном эпителии постоянно происходят процессы естественной дегенерации чувствительных клеток, при которой деструктивным изменениям подвергаются и их аксоны. Этот факт, а также трудности установления структурного соответствия между телом клетки и профилем ее центрального отростка не позволяют сейчас однозначно ответить на этот вопрос.

Проведенные исследования указывают на то, что ультраструктурные перестройки в чувствительных клетках направлены как на активацию этих клеток для специфической рецепции феромонов во время полового взаимодействия партнеров, так и на экстренное выключение этой функции,

что необходимо в фазу перехода самцов к формированию оплодотворенной кладки и охране развивающихся икринок. Таким образом, уровень структурного развития клеток ольфакторного эпителия у рыб зависит от периода их жизненного цикла. В частности, в нерестовый период в рецепторных клетках формируются структурные перестройки, направленные не только на повышение готовности этих клеток к рецепции половых феромонов, но и развиваются дальнейшие активные изменения, завершающие этот период и необходимые для обеспечения следующей, качественно новой формы репродуктивного поведения. Следовательно, в смене фаз сложного нерестового поведения существенную роль играют не только центральные механизмы нервной системы, но и перестройки периферического хемочувствительного аппарата.

4.2 Структурные особенности мерцательных и секреторных опорных клеток у рыб во время нереста

При переходе рыб к стадии вызревания и вымета половых продуктов ультраструктурные изменения обнаруживаются не только в рецепторных, но и в поддерживающих клетках эпителия. В частности, в сравнении с донерестовым периодом, в основании базальных телец жгутиков мерцательные клетки содержат повышенное количество митохондрий **40 (а–в)**. Такая закономерность подтверждается также методами конфокальной микроскопии при одновременном цитохимическом окрашивании митохондрий и актиновых микрофиламентов в составе поясковых ободков вершин клеток. Как отмечалось в разделе 3.3, поверхностные профили опорных элементов более широкие, чем у рецепторных клеток и легко выявляются при обработке препарата фаллоидином-FITC. На рис. **40, г** и **41, а** видно, что апикальные участки мерцательных клеток с хорошо выраженным флуоресцентным сигналом от митохондрий очень упорядоченно рассредоточены в обонятельной складке. Увеличение числа

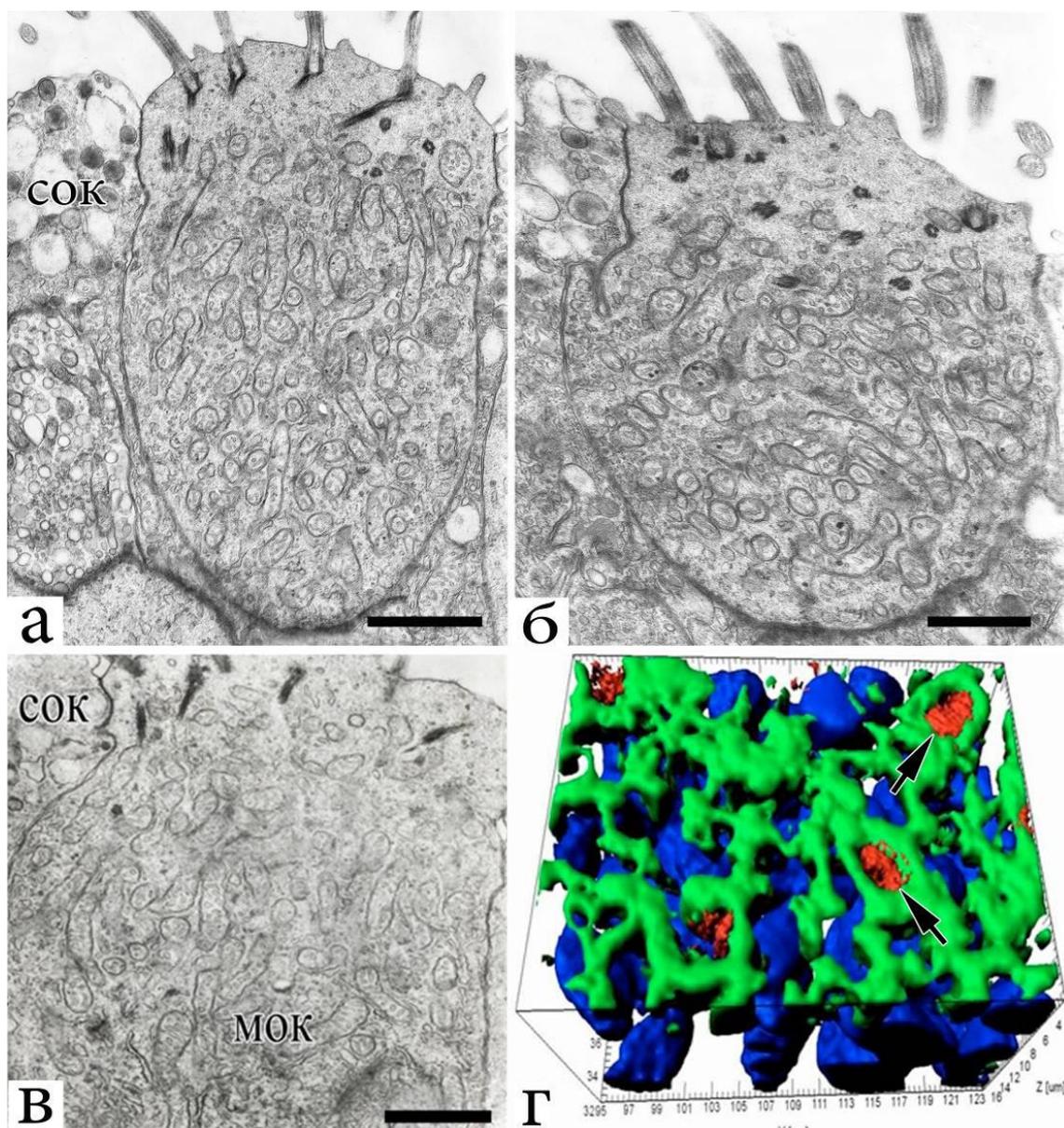


Рисунок 40. Увеличение количества митохондрий в апикальных участках мерцательных опорных клеток в обонятельном аппарате у желтокрылки в нерестовый период по данным электронной (а–в) и конфокальной (г) микроскопии (3D-реконструкция); окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый), ядра (DAPI, синий) и функционально активные митохондрии (MitoTracker® Orange, красный), отмечены стрелками; Условные обозначения: мок – мерцательная опорная клетка; сок – секреторная опорная клетка. Масштаб (а – в): 1 мкм.

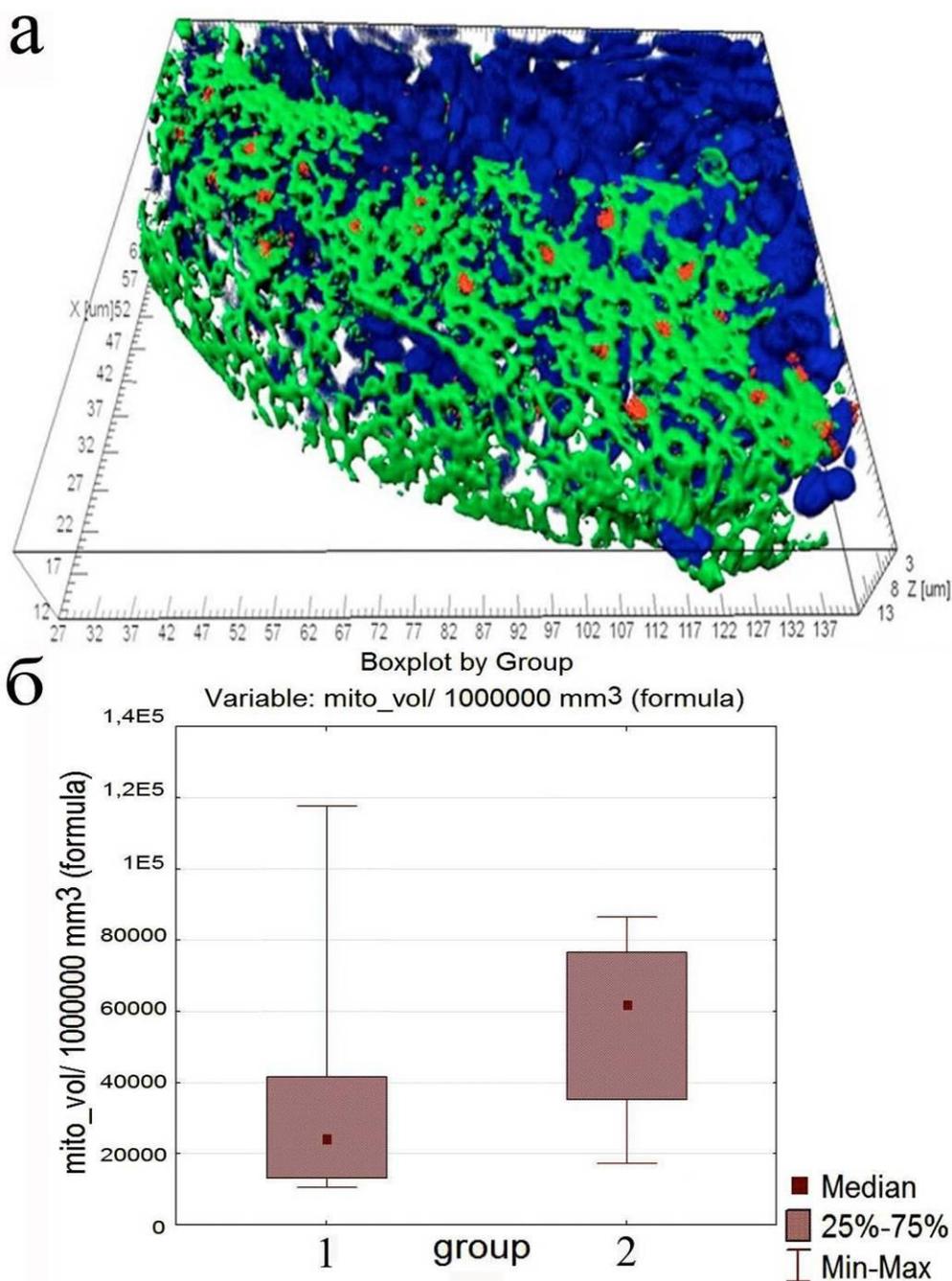


Рисунок 41. А – особенности цитохимического выявления функционально активных митохондрий в отдельной обонятельной складке у желтокрылки в нерестовый период (окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый), ядра (DAPI, синий) и митохондрии (MitoTracker® Orange, красный); (3D-реконструкция); б – в сравнении с предшествующим периодом (1), во время нереста наблюдается существенное увеличение объема, занимаемого митохондриями (2). График построен по данным количественного анализа Z-стеков (конфокальная микроскопия); * $p_u = 0,035$.

митохондрий указывает на готовность их жгутикового аппарата к более длительному и интенсивному движению. Это может иметь важное приспособительное значение в связи с предположением о том, что реснички мерцательных клеток так же, как и рецепторных, могут быть чувствительны к одорантам [Getchel *et al.*, 1986]. По-видимому, таким образом может быть повышена вероятность хеморецепции феромонов, действующих на чувствительные клетки, как правило, в очень низких концентрациях [Дмитриева, Остроумов, 1992; Stacey, Sorensen, 2006; Stacey, 2011; Walaszczyk *et al.*, 2013]. Статистический анализ всего пула митохондрий (включая митохондрии рецепторных и других типов клеток), выявляемых в эпителии в фазу репродукции, превышает данные показатели в предшествующий донерестовый период в 2,3 раза ($p_u \leq 0,05$) (рис. 41, б). Это говорит о повышенном уровне энергетического обмена сенсорного аппарата у рыб, настроенных на восприятие жизненно важных биологически активных соединений, обеспечивающих их размножение.

Кроме того, в этот период в слизистых клетках наблюдаются признаки существенного усиления секреторной активности. В цитоплазме клеток хорошо выявляются равномерно расширенные каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума с многочисленными розетками рибосом и аппарат Гольджи, вблизи которого локализуются многочисленные вакуоли различной величины (0,2–0,8 мкм.) и электронной плотности (рис. 42).

Опираясь на данные электронной микроскопии и известные факты о функциональной специфике слизи (раздел 1.1.2), можно предположить, что в репродуктивный период происходит изменение физико-химических параметров слизи, что может влиять на процессы обонятельной рецепции. Биохимическое изучение слизи может быть интересно также в связи выше высказанным нами предположением о том, что в состоянии дендритной секреции рецепторные клетки могут продуцировать одорант-связывающие белки в водорастворимой форме. В разделе 3 приводились данные о том, что в донерестовый период между мерцательными и секреторными

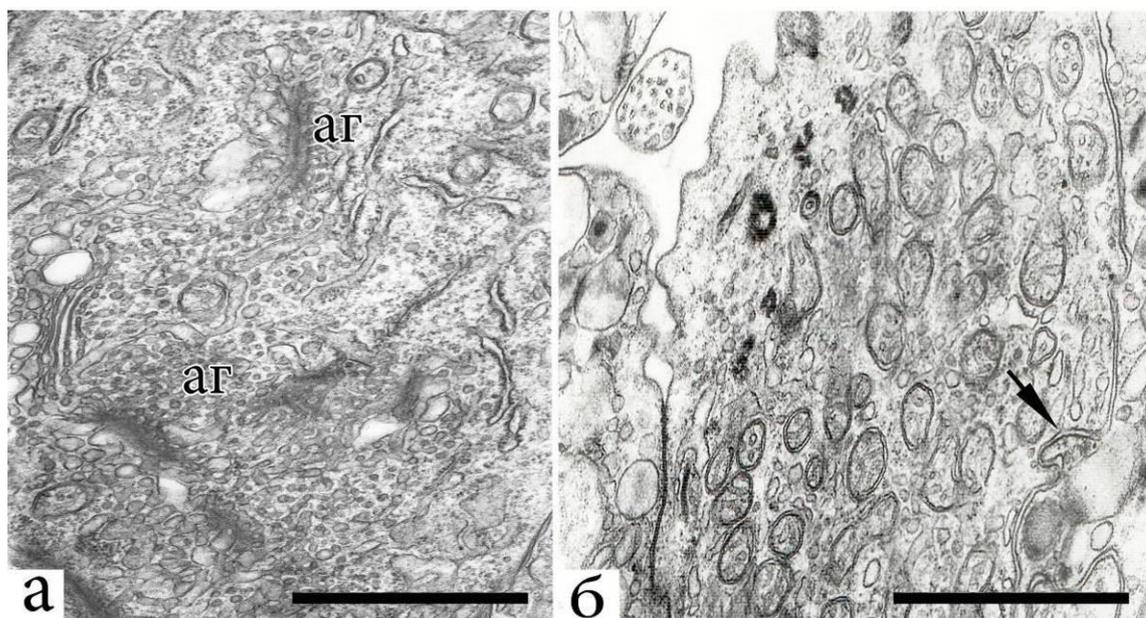


Рисунок 42. Структурные особенности секреторных опорных клеток в ольфакторном эпителии у желтокрылки в нерестовый период. А – приядерная область секреторной клетки (хорошо выражен аппарат Гольджи и каналы шероховатого эндоплазматического ретикулама); б – инвагинация секреторных гранул в мерцательную клетку показана стрелкой. Условные обозначения: аг – аппарат Гольджи. Масштаб: 2 мкм.

клетками имеются отдельные участки взаимопроникновений (**рис. 15**). Такие же взаимодействия между опорными клетками обнаруживаются и в репродуктивную фазу. Причем, в этот период из секреторных клеток в составе глубоких цитоплазматических выростов в цитоплазму мерцательных клеток проникают и секреторные пузырьки (**рис. 42, б**). Возможно, такие выросты вместе с содержимым могут отшнуровываться и таким способом мерцательные клетки могут усваивать вещества, образованные в слизистых клетках. Значение этих процессов неизвестно и нуждается в дальнейшем изучении.

ГЛАВА 5. СТИМУЛ-ЗАВИСИМАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И НЕЙРОГЕНЕЗ В ОБОНЯТЕЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ У РЫБ

5.1 Феномен дендритной нейросекреции у хеморецепторных клеток

Впервые выявленный нами у рыб феномен трансформации обонятельных нейронов в клетки секреторного типа ставит вопрос о механизмах, запускающих такое преобразование клеток и о вовлечении в эти процессы других типов клеток эпителия. Важным также является вопрос об универсальности данного физиологического явления в рамках функционирования сенсорного аппарата у животных, принадлежащих разным систематическим группам.

Начиная с самых ранних работ [Schultze, 1856; Догель, 1886] и до настоящего времени считается общепризнанным положение о морфологической стабильности хеморецепторных клеток, согласно которому их вершина всегда содержит реснички (или микровиллы) и предназначена только для обеспечения хеморецепции. Это важное, исторически сложившееся представление формировалось на протяжении длительного промежутка времени при изучении представителей самых разных классов животных. Нужно отметить, что в ряде работ уже были описаны отдельные элементы структурных изменений обонятельных клеток, которые возможно, являются свидетельством их реорганизации на режим дендритной нейросекреции. Ключевые компоненты таких перестроек – пузырьки со светлым содержимым в разных количествах были выявлены в дендритах и вершинах рецепторных клеток, у рыб, [Bannister, 1965], кроликов [De Lorenzo, 1957], лягушек [Reese, 1965], пресмыкающихся [Hansen, 2007], приматов [Loo, 1977], человека [Polyzonis *et al.*, 1979] и у некоторых других видов животных. В дендритах обонятельных клеток костистых рыб пузырьки также были обнаружены. В качестве примера на **рис. 43** представлены

фотографии и обобщающая схема строения апикального участка рецепторных клеток у гольяна и трехиглой колюшки, у которых везикулы со светлым содержимым также находятся в указанных отделах клеток [Bannister, 1965]. Возможно, что в некоторых из приведенных выше публикациях появление пузырьков в матриксе булавки могло быть вызвано микропиноцитозом жидкости и внеклеточных веществ, которые клетка может захватывать из внешней среды. Способность терминалей нейронов к эндоцитозу является их характерным свойством. В частности, посредством эндосом, формирующихся в результате интернализации внеклеточных лигандов, запускаются многие внутриклеточные сигнальные пути [Cosker, Segal, 2014]. Известно, что в месте образования пиноцитозного пузырька происходит поглощение соответствующего участка плазматической мембраны. Представляется, что появление большого количества везикул в обонятельных клетках у желтокрылки не могло быть следствием интенсивного поглощения внеклеточных веществ и их последующего транспорта в нижележащие отделы клетки. Активные процессы пиноцитоза обычно приводят к значительной редукции поверхностной мембраны, что несовместимо с наблюдающимся у рыб существенным приростом терминали дендрита. Напротив, цитологические данные показывают, что многочисленные пузырьки образуются в приядерной зоне вследствие интенсивной работы аппарата Гольджи и далее с помощью микротрубочек направляются к вершине клетки, где они встраиваются в поверхностную мембрану, выделяя содержимое в обонятельную слизь.

К сожалению, в работах, посвященных ультраструктуре обонятельных клеток, не всегда указывается период жизни животного, стадия половой зрелости, или какие-либо другие показатели, отражающие его функциональное состояние и особенности экологии. Кроме того, в данной литературе не было выявлено фактов существенного увеличения

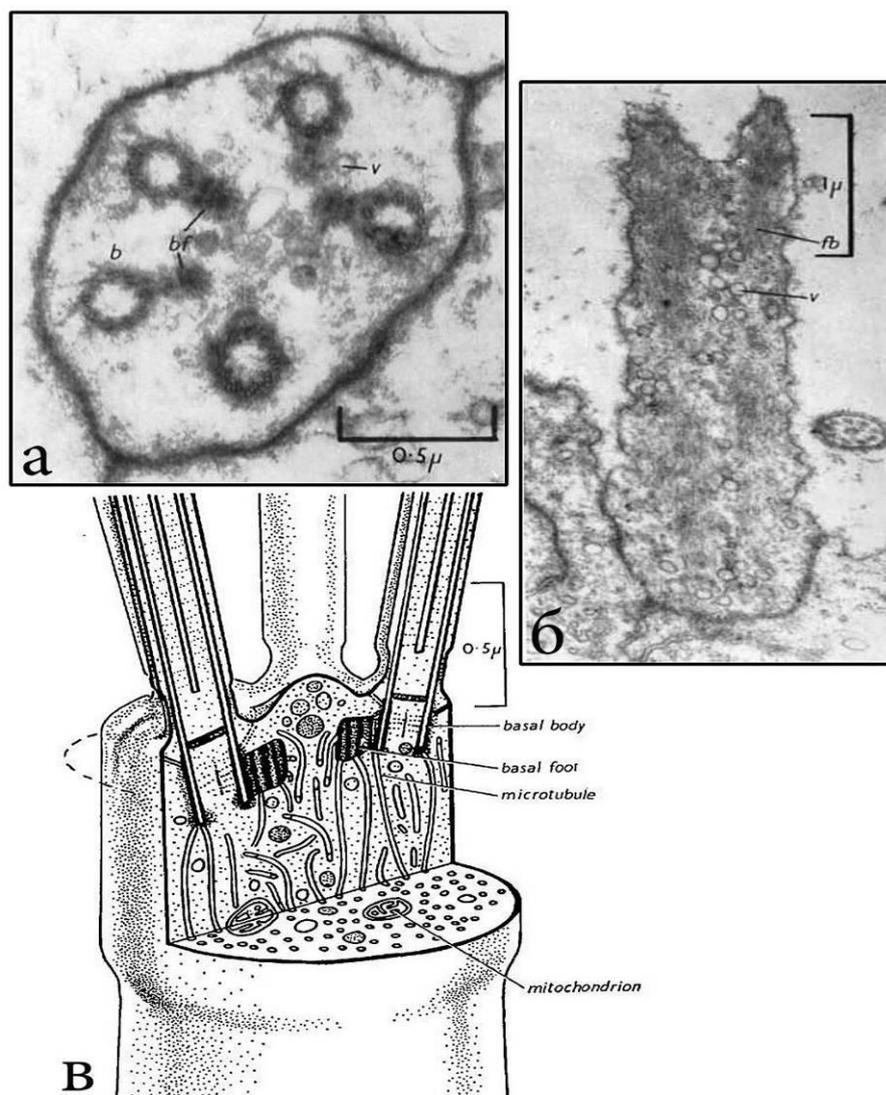


Рисунок 43. Пузырьки в рецепторных клетках обонятельного эпителия у обыкновенного гольяна и трехиглой колюшки [Bannister, 1965]. А – поперечный срез дистального участка клетки жгутикового типа; б – клетка с палочковидной вершиной; в – схематичное изображение обонятельной булавы клетки с ресничками и пузырьками. Условные обозначения: б – базальные тельца; bf – корешки цилий; v – везикулы.

секреторной функции Аппарата Гольджи, которые бы сопровождалась значительными морфологическими перестройками апикального участка клетки. По этой причине обнаруженные в клетках случаи транспорта везикул вдоль дендрита до настоящего времени не привлекали к себе большого внимания. Тем не менее, можно полагать, что обнаруженные нами у

желтокрылок процессы дендритной нейросекреции могут иметь важное биологическое значение. В связи с этим, первостепенным является вопрос о химическом составе секреторных пузырьков, содержимое которых выделяется на поверхность эпителия.

Известно, что дифференцировка клеток сенсорного аппарата рыб и других животных может зависеть не только от гормональных перестроек в организме [Hara, Zielinski, 2006; Moffatt, 2003; Doty, 2009; Kawai *et al.*, 2009], но и от действия химических факторов внешней среды, которые могут контролировать экспрессию генов [Harden *et al.*, 2006]. Исходя из этого, можно предположить, что одорантная стимуляция клеток может быть важным фактором, вызывающим их перерождение для обеспечения дендритной нейросекреции.

В настоящее время в литературе имеется мало работ, посвященных изучению процессов, происходящих в обонятельных клетках после продолжительного воздействия пахучих веществ. Главным образом, данные исследования касаются биохимических перестроек, которые развиваются в клетках в течение первых нескольких минут после начала запаховой экспозиции. Установлено, что связывание молекул одоранта приводит к повышению внутриклеточной концентрации цАМФ и открытию нуклеотид-связанных каналов, через которые в клетку проникают ионы K^+ , Na^+ и Ca^{2+} [Kurahashi, Shibuya 1990]. Кроме того, в процессе активации клетки фосфолипаза C вместе с диацилглицеролом и инозитолтрифосфатом также увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} [Rebecchi, Pentyala, 2000; Szebenyi *et al.*, 2014]. Показано, что обонятельная чувствительность рецепторных клеток уменьшается, несмотря на продолжающееся присутствие одоранта. Одним из механизмов такой ранней адаптации является деградация сАМР с помощью фосфодиэстеразы, что приводит к закрытию ионных каналов, регулируемых циклическими нуклеотидами [Firestein *et al.*, 1991]. Второй путь инактивации клеток – выход ионов кальция через Na/Ca^{2+} обменники, что приводит к закрытию Ca^{2+} -

активируемого канала для ионов Cl^- [Reisert, Matthews, 1998]. Обнаружено, что третий способ адаптации может реализовываться через Ca^{2+} /кальмодулин опосредованную десенситизацию нуклеотид-зависимых каналов [Zufall, Leinders-Zufall, 2000; Song *et al.*, 2008]. Недавно полученные данные показывают, что ослабление первичных процессов хеморецепции может осуществляться также посредством b-аррестин- опосредованного эндоцитоза и интернализации обонятельных рецепторов, связанных с G-белками [Antunes, 2014]. Кроме того, на генетически модифицированных обонятельных нейронах с нокаутом OMP также наблюдалось снижение трансдукции ольфакторного сигнала, что говорит о его непосредственном участии в регуляции первичных процессов хеморецепции [Reisert *et al.*, 2007]. Отдельные исследования, проведенные на первичной культуре обонятельных клеток, показывают, что длительное (до 13 мин) воздействие пахучих веществ запускает в них Ca^{2+} -зависимые процессы программированной гибели клеток, сопровождающиеся соответствующими цитохимическими перестройками [Brauchi *et al.*, 2006]. В аналогичных работах [Carr *et al.*, 2001], выполненных на ольфакторном эпителии крыс, в обонятельных клетках возрастало количество различных цитопротекторных белков теплового шока, обеспечивающих целостность эпителия при стрессорных воздействиях.

Нужно подчеркнуть, что многие из этих исследований были проведены на млекопитающих, поэтому неизвестно – в какой мере они могут быть представлены у рыб в контроле, а также в результате их более длительной (многосуточной) или периодической стимуляции смесью веществ. Слабо изученными остаются также цитохимические перестройки, которые могут сопровождать адаптивные изменения обонятельных клеток, происходящие при таких повышенных сенсорных нагрузках.

Сравнительный анализ полученных нами данных показывает, что в процессе нереста динамика ультраструктурных изменений обонятельных рецепторных клеток сходна с таковой у В-лимфоцитов иммунной системы в

процессе их стимулзависимой дифференцировки [Косицын и др., 1993; Клименков и др. 2011; Klimenkov *et al.*, 2015]. Вопрос о существовании феноменологического сходства механизмов функционирования обонятельных и иммунных клеток поднимался уже давно и сохраняет свою актуальность до настоящего времени [Thomas, 1974; Boyse *et al.*, 1982; Chen, Lancet, 1984; Lancet *et al.*, 1993; Farbman, 1992; Shykind, 2005; Марков, Куликов, 2006; Magklara, Lomvardas, 2013; Margolis, Getchell, 2013]. Это связано с тем, что и иммунная, и обонятельная система решают одну и ту же задачу, связанную с распознаванием чужеродных молекул, называемых антигенами. О возможности существования общих с иммунными клетками принципов функционирования рецепторных клеток свидетельствует два наиболее важных свойства, характерных для них: полиморфизм семейства генов, кодирующих обонятельные рецепторы и их моноспецифичность [Buck, Axel, 1991; Chess *et al.*, 1994; Serizawa *et al.*, 2004]. Лимфоциты также моноспецифичны (Burnet, 1976) и имеют сопоставимый по численности набор генов, кодирующих их рецепторы [Tonegawa, 1983].

Кроме того, для обоих типов клеток характерна способность существенно изменять уровень экспрессии генов, кодирующих хеморецепторы, а также свойственный для них феномен альтернативного сплайсинга, который может сопровождать экспрессию генов [Young *et al.*, 2003]. Есть еще один важный аспект сходства этих двух систем, который касается белков МНС. Хорошо известно, что в ходе иммунной защиты эти белки непосредственно участвуют в распознавании чужеродных молекул, представляя фрагменты процессированных молекул иммунокомпетентным клеткам. В литературном обзоре (раздел 1.5) отмечалось, что в процессе одортипии (распознавании индивидуальных пахучих веществ) водорастворимые формы этих белков в качестве персональных маркеров очень широко используются в процессе химической коммуникации у разных видов животных [Singh *et al.*, 1988; Wedekind, 1995; Knapp *et al.*, 2006; Yamazaki, Beauchamp, 2007]. К этому можно добавить еще два важных факта,

полученных совсем недавно. Анализ генома человека показал, что промоторы, контролирующие экспрессию генов обонятельных рецепторов и белков МНС, также обладают очень высоким точечным полиморфизмом [Ignatieva et al., 2014]. И последнее обстоятельство, которое также говорит об эволюционном параллелизме обонятельной и иммунной систем: в мембранах лимфоцитов обнаружены обонятельные и вкусовые рецепторы [Malki et al., 2015]. Таким образом, проводя аналогию между механизмами трансформации обонятельных клеток на режим секреции со стимул-зависимой дифференцировкой В-лимфоцитов, можно допустить, что такие перестройки хеморецепторных клеток в обонятельном аппарате у нерестовых желтокрылок также могли быть вызваны продолжительным воздействием химических сигналов, а в данном случае – феромонов.

5.2 Ультраструктурные перестройки рецепторных клеток после продолжительного воздействия гетерогенной смесью аминокислот и пептидов

Для изучения роли продолжительной запаховой стимуляции в качестве пускового механизма в развитии дендритной нейросекреции нужны адекватные методологические подходы. В этом смысле, гидробионты являются наиболее подходящими экспериментальными животными, поскольку в водной среде можно легко поддерживать нужные концентрации действующих веществ. Известно, что у разных видов рыб представлено от нескольких десятков до 150 функционально активных генов [Saraiva, Korsching, 2007; Alioto, Ngai, 2006], кодирующих обонятельные рецепторы, каждый из которых экспрессируется в отдельном нейроне и предопределяет его моноспецифичность [Buck and Axel, 1991]. В связи с этим, в качестве предъявляемых стимулов мы использовали не однотипные раздражители, а более разнообразные по структуре и молекулярной массе нетоксичные вещества – гетерогенную смесь аминокислот и пептидов. По нашим

представлениям, это должно существенно увеличить число активированных нейронов и таким образом позволит создать более подходящие условия для их избирательной хемотимуляции. Исходя из этого, цель данного раздела работы состояла в изучении адаптивных цитохимических перестроек клеток периферического ольфакторного аппарата рыб в связи с длительным воздействием нетоксичной смеси водорастворимых веществ – аминокислот и пептидов (массовая доля – 0,0002 %). Выбор данных химических агентов обусловлен тем, что аминокислоты и другие низкомолекулярные вещества являются эффективными раздражителями для обонятельной системы рыб (Касумян, 2002). В данных экспериментах мы использовали одного из эндемичных представителей Байкала – каменную широколобку (*P. knerii*). Исследовали ультраструктурные изменения клеток эпителия, содержание функционально активных митохондрий, активных форм кислорода, а также изменения количественных показателей нейрогенеза.

Установлено, что длительная (15 суток) одорантная стимуляция рыб смесью аминокислот и пептидов вызывает в обонятельном эпителии избирательную дифференцировку рецепторных нейронов. Кроме чувствительных клеток со свойственным для контроля уровнем развития внутриклеточных компонентов (**рис. 44, а**) в эпителии выявляются также немногочисленные метаболически активные нейроны, у которых существенно возрастает интенсивность ядерно-цитоплазматических отношений. При этом ядрышко приобретает повышенную осмиофильность и перемещается к верхнему полюсу ядра (**рис. 44, б–г**). В таких клетках в 1,3 раза ($p \leq 0.01$) увеличивается количество как мембраносвязанных, так и свободных рибосом, что отражает диаграмма (**рис. 45**). Кроме активации белоксинтезирующей системы наблюдается усиление секреторной функции аппарата Гольджи. Нужно отметить, что так же, как и во время нереста, такие морфологические перестройки обонятельных клеток после длительной одорантной стимуляции не распространяются на все рецепторные клетки и

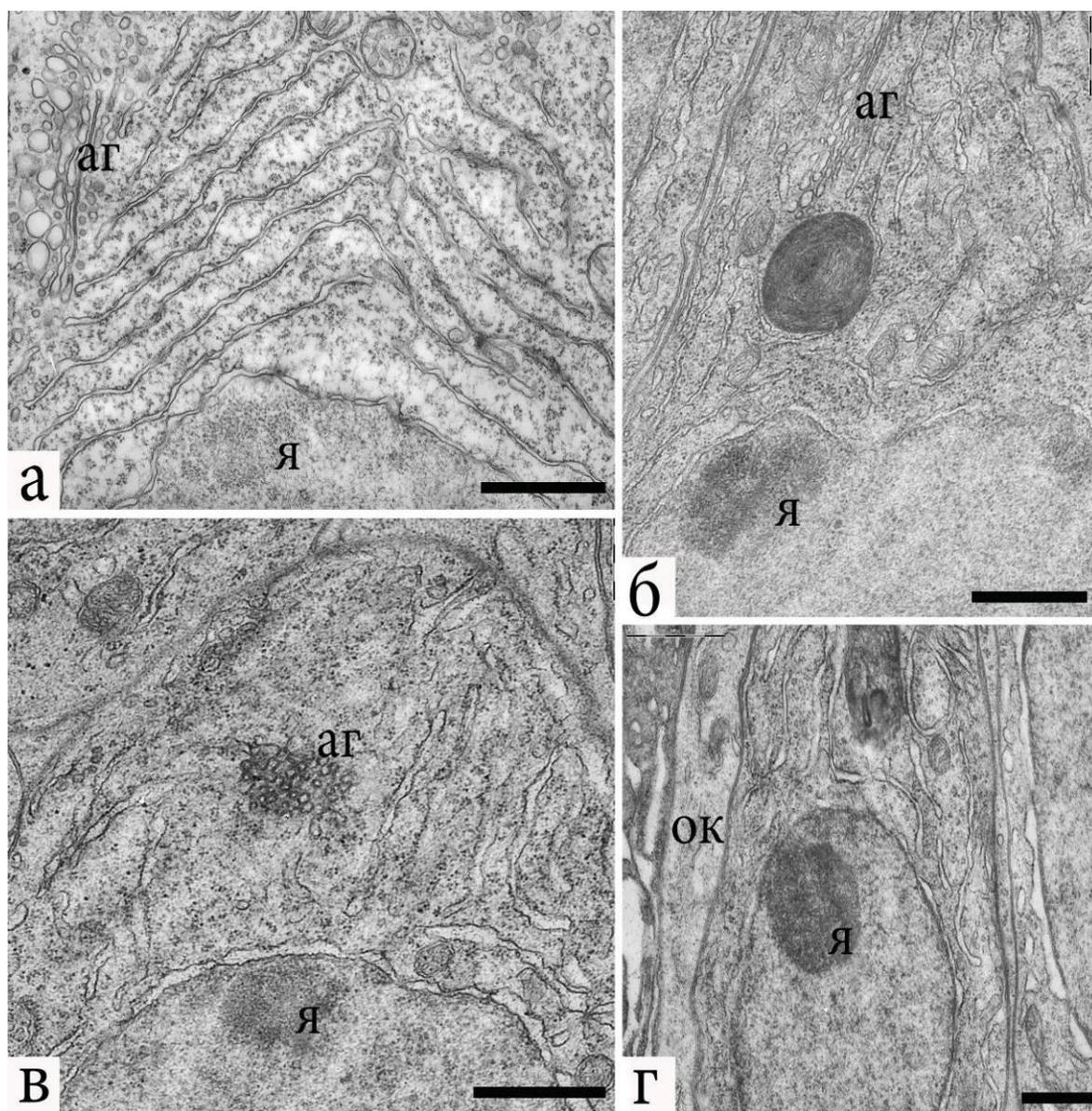


Рисунок 44. Структурные особенности перикарионов рецепторных клеток в контроле и после длительной хемотимуляции каменной широколобки гетерогенной смесью аминокислот и пептидов. А – контроль; б – г – эксперимент: повышенная плотность рибосом, ядрышко сближено с верхним полюсом ядра; активизация ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Условные обозначения: я – ядрышко; аг – аппарат Гольджи; ок – опорная клетка. Масштаб: а – г – 1 мкм.

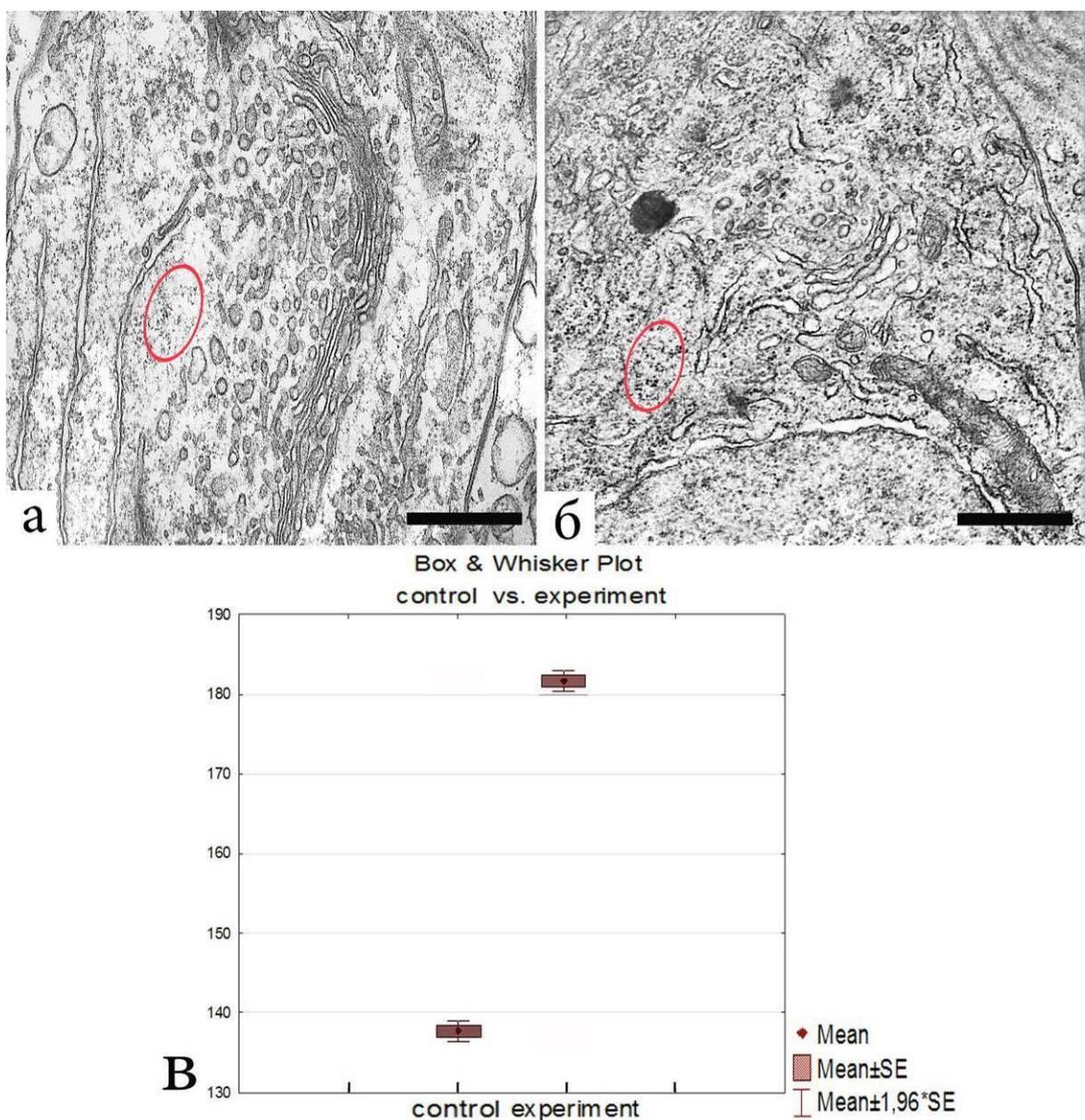


Рисунок 45. Сравнительная оценка количества цитоплазматических рибосом в контроле (а) и после продолжительной хемотимуляции рыб гетерогенной смесью аминокислот и пептидов (б). В качестве примера в перикарионе рецепторных клеток отмечены зоны сравнения. Статистический анализ плотности рибосом (в); $p \leq 0.01$. Масштаб: 1 мкм.

носят выборочный характер. Благодаря этому в апикальном слое эпителия часто обнаруживаются рядом расположенные терминалы дендритов как свойственных для контроля клеток, так и клеток, трансформирующихся на режим дендритной нейросекреции (рис. 46).

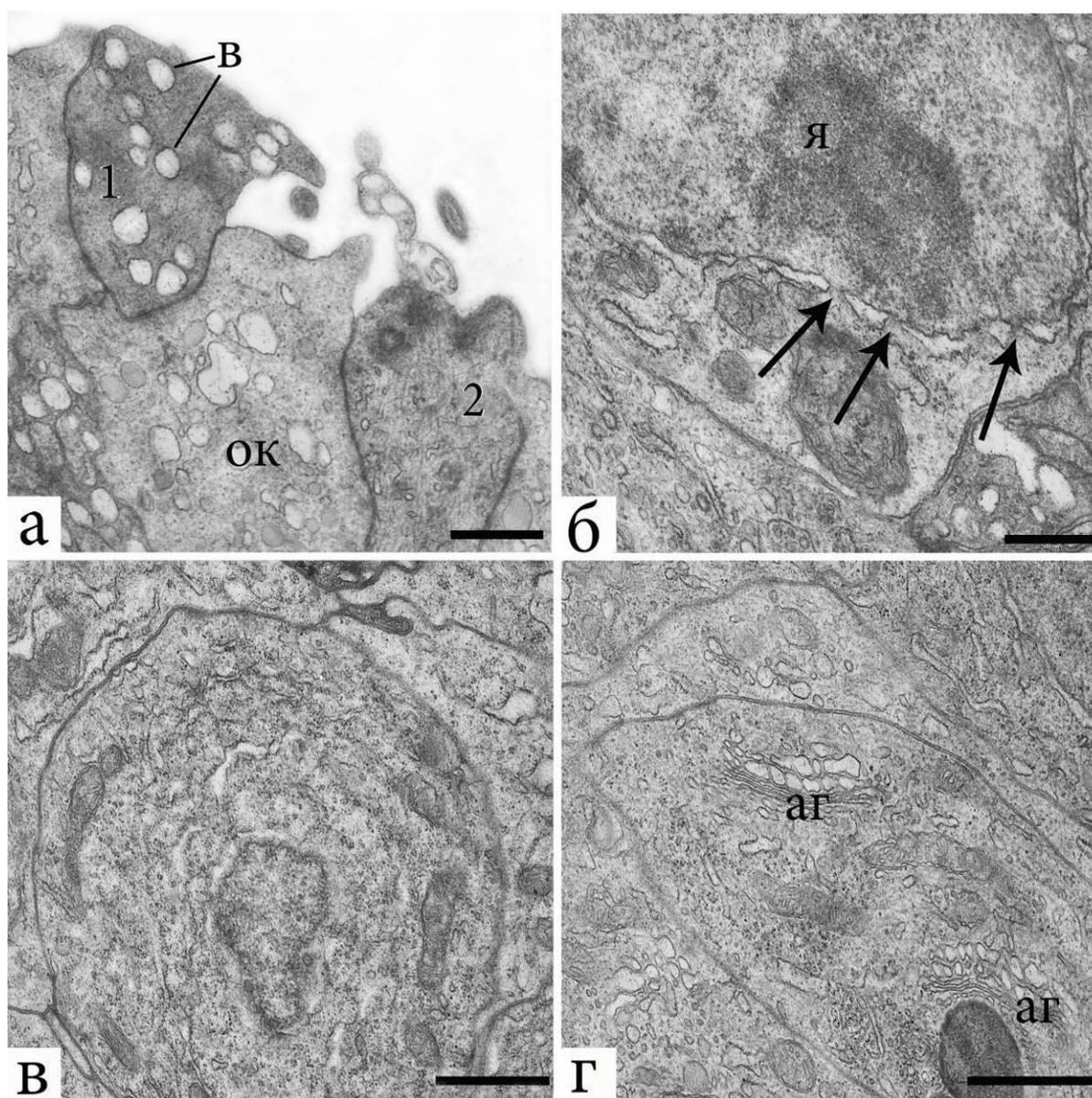


Рисунок 46. Ультраструктурные перестройки обонятельных нейронов у каменной широколобки после продолжительной хемотимуляции гетерогенной смесью пептидов и аминокислот. А – вершина клетки (1) в фазу дендритной нейросекреции и вершина (2) неизменённого рецепторного нейрона; б – увеличенное количество пор (показаны стрелками); в – высокая плотность рибосом в теле нейрона; г – повышенная секреторная активность аппарата Гольджи. Условные обозначения: ок – опорная клетка; аг – аппарат Гольджи; в – везикулы. Масштаб: а, б – 0,5 мкм; в, г – 1 мкм.

Согласно нашей гипотезе [Клименков и др., 2011], данные вершины могут принадлежать клеткам, претерпевающим стимул-зависимую

дифференцировку в клетки с дендритной нейросекрецией. Таким образом, согласно данным представлениям, у экспериментальных рыб из всего набора обонятельных клеток морфологические перестройки претерпевали только те клетки, рецепторы которых изначально имели высокую аффинность к лигандам. Это говорит об избирательности данных морфологических перестроек.

Обсуждая проблему феноменологического сходства процессов стимул-зависимой дифференцировки обонятельных клеток и В-лимфоцитов, возникает вопрос – могут ли стимулированные запахowymi молекулами обонятельные нейроны (так же, как и В-клетки) переключать синтез рецепторных белков с мембраносвязанной формы на водорастворимую с сохранением их специфичности? В таком случае, новосинтезированные белки могли бы связывать молекулы ольфакторных раздражителей непосредственно в обонятельной слизи, обеспечивая тем самым соответствующую адаптивную блокировку избыточно действующих веществ – селективную аносмию. Несмотря на привлекательность этой гипотезы, известно, что одорант-связывающие белки относятся к семейству серпентиновых рецепторов (рецепторы, сопряженные с G-белком) и до настоящего времени не обнаружены их водорастворимые модификации. Данная трактовка полученных результатов дает почву для дальнейшего развития "олигогенной" гипотезы [Mombaerts, 2004] кодирования рецепторных белков, согласно которой обонятельные клетки на разных этапах своего адаптивного развития могут экспрессировать не один, а несколько генов, кодирующих рецепторы к запаховым молекулам. Нельзя исключать также и того, что в процессе дендритной нейросекреции нейроны могут перестраиваться на синтез каких-то других белков, или более коротких нейропептидов с нереперторной функцией. Поскольку химический состав секреторных пузырьков неизвестен, в настоящее время сложно однозначно определить функциональное назначение этого процесса. Тем не менее, уже сейчас можно сказать, что феномен трансформации обонятельных нейронов

в клетки секреторного типа свидетельствует о более существенной структурно-функциональной пластичности рецепторных клеток, чем это считалось ранее.

5.3 Сравнительные аспекты дендритной нейросекреции

Рассматривая вопрос о функциональном назначении описанных выше процессов, можно отметить, что по морфологическим признакам обонятельные клетки с дендритной нейросекрецией во многом схожи с классическими нейросекреторными клетками (НСК) гипоталамуса, «профессионально» специализированными для синтеза и выделения нейrogормонов различной химической природы. Наряду с классическими нейромедиаторами, нейропептиды (выделяемые как аксонами, так и дендритами НСК) в настоящее время признаются в качестве еще одного класса сигналов, которые участвуют в обработке информации в мозге и в обеспечении его пластичности [Поленов, 1993; Угрюмов, 1989; Ludwig, Leng, 2006; Salio, 2006]. Для НСК характерны повышенная складчатость ядерной оболочки, крупные размеры ядрышек, расположение которых меняется в зависимости от интенсивности нейросекреторного процесса [Watchler *et al.*, 1987; Поленов, 1993]. В фазу повышенной функциональной активности они приобретают высокую степень развития гранулярного эндоплазматического ретикулума и хорошо выраженный аппарат Гольджи, который в большом количестве производит нейросекреторные гранулы с гомогенной электроплотной сердцевиной с прозрачным гало и пограничной мембраной. В некоторых типах НСК такие гранулы непосредственно транспортируются в дендрит. В частности, у НСК эпендимного типа нейросекреторные гранулы из перикариона с помощью микротрубочек перемещаются в вентрикулярные дендриты, где они накапливаются, образуя булавовидные расширения. Экспериментальные данные показывают, что активация дендритного экзоцитоза

нейротрансмиттеров у НСК носит регулируемый характер и сопряжена с функционированием потенциал-зависимых кальциевых каналов [Kennedy, Ehlers, 2011]. Известно, что обонятельные нейроны не имеют эфферентной регуляции в связи с чем, мы полагаем, что в отличие от этого, процесс дендритной нейросекреции у них не носит регулируемого характера и осуществляется конститутивно – по мере доставки везикул к вершине клетки.

Таким образом, накапливается все больше сведений о том, что в центральной нервной системе дендриты выступают в качестве одного из основных источников нейропептидов [Son *et al.*, 2013]. Причем, после экзоцитоза они могут действовать не только в области синапсов, но и, учитывая продолжительный период их полураспада [Mens *et al.*, 1983], диффундируют в межклеточное пространство и могут действовать на более удаленные мишени [Son, *et al.*, 2013]. В связи с этим, в отличие от быстродействующих нейромедиаторов, в последнее время нейропептиды рассматриваются в качестве наиболее подходящего средства химической коммуникации между популяциями нейронов [Landgraf, Neumann, 2004; Ludwig, Leng, 2006]. Все эти данные указывают на то, что феномен дендритной нейросекреции, характерный для некоторых типов НСК центральной нервной системы, вероятно, не является экстраординарным свойством и для обонятельных нейронов. Как уже говорилось выше, трансформация хеморецепторных клеток на режим дендритной нейросекреции может носить адаптивный характер и предназначена для выполнения какой-то новой специфической функции.

5.4 Дегенеративные изменения клеток ольфакторного эпителия при продолжительной одорантной стимуляции рыб

Характерно, что после интенсивного одорантного воздействия смесью аминокислот и пептидов у 10–15 % рецепторных нейронов каналы эндоплазматического ретикулума фрагментированы и в отдельных участках расширены. В периферическом отростке наряду с целостными, они содержат митохондрии с хорошо выраженными признаками их частичного или полного набухания. Такие органеллы имеют просветленный матрикс с рыхлым электроноплотным осадком и деструктивными изменениями крист (**рис. 47**). Нарушение структуры митохондрий наблюдается также и в опорных элементах эпителия – в мерцательных и секреторных клетках.

Известно, что уровень мембранного потенциала митохондрий отражает эффективность работы их электрон-транспортной системы. При необратимых дегенеративных изменениях митохондрий падение мембранного потенциала может предшествовать их гибели и каскаду внутриклеточных реакций, ведущих к апоптозу клетки [Iijima, 2006]. В связи с этим, для объективной оценки состояния митохондрий после длительной запаховой стимуляции мы использовали специфическую окраску обонятельного эпителия на функционально активные митохондрии, при которой CellROX deep red reagent селективно связывается только с нативными митохондриями (сохраняющими мембранный потенциал) и дает соответствующий флуоресцентный сигнал. С помощью этого метода в экспериментах, проведенных на гурами (*T.leeri*) показано, что в сравнении с контролем (**рис. 48**), при избыточной одорантной стимуляции значительная доля митохондрий сенсорного аппарата рыб теряет свою функциональную активность (**рис. 49, а–в**). Это подтверждается также сравнительным анализом объемов, занимаемых митохондриями в клетках эпителия у контрольных и экспериментальных рыб (**рис. 49, г**). График показывает, что в опыте, в сравнении с контролем, объем, занимаемый функционально

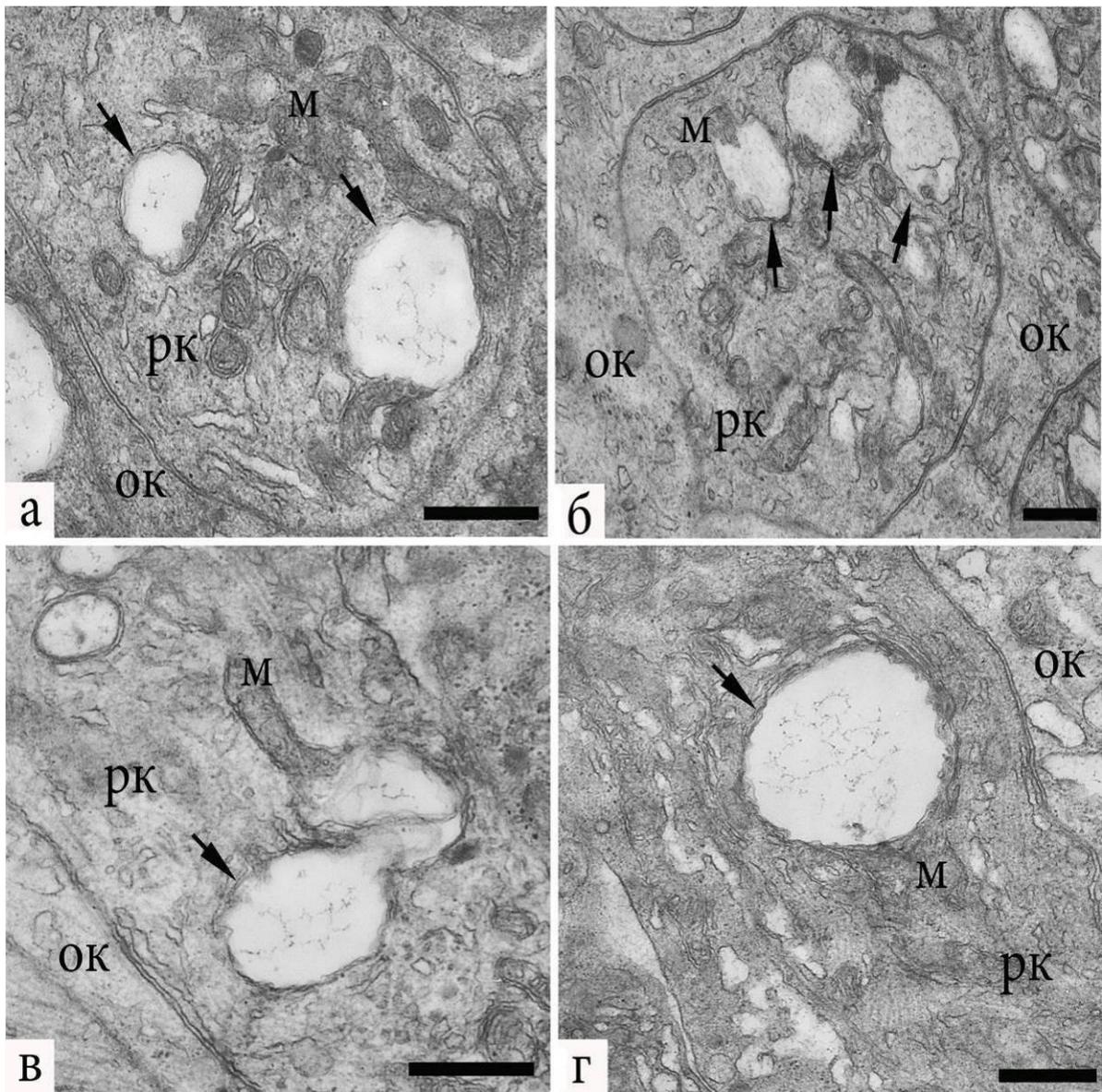


Рисунок 47. Дегенеративные изменения митохондрий (показаны стрелками) в дендритах обонятельных клеток после продолжительной одорантной стимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов; поперечные (а, б) и продольные (в, г) срезы дендритов. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка; м – митохондрии. Масштаб: 0,5 мкм.

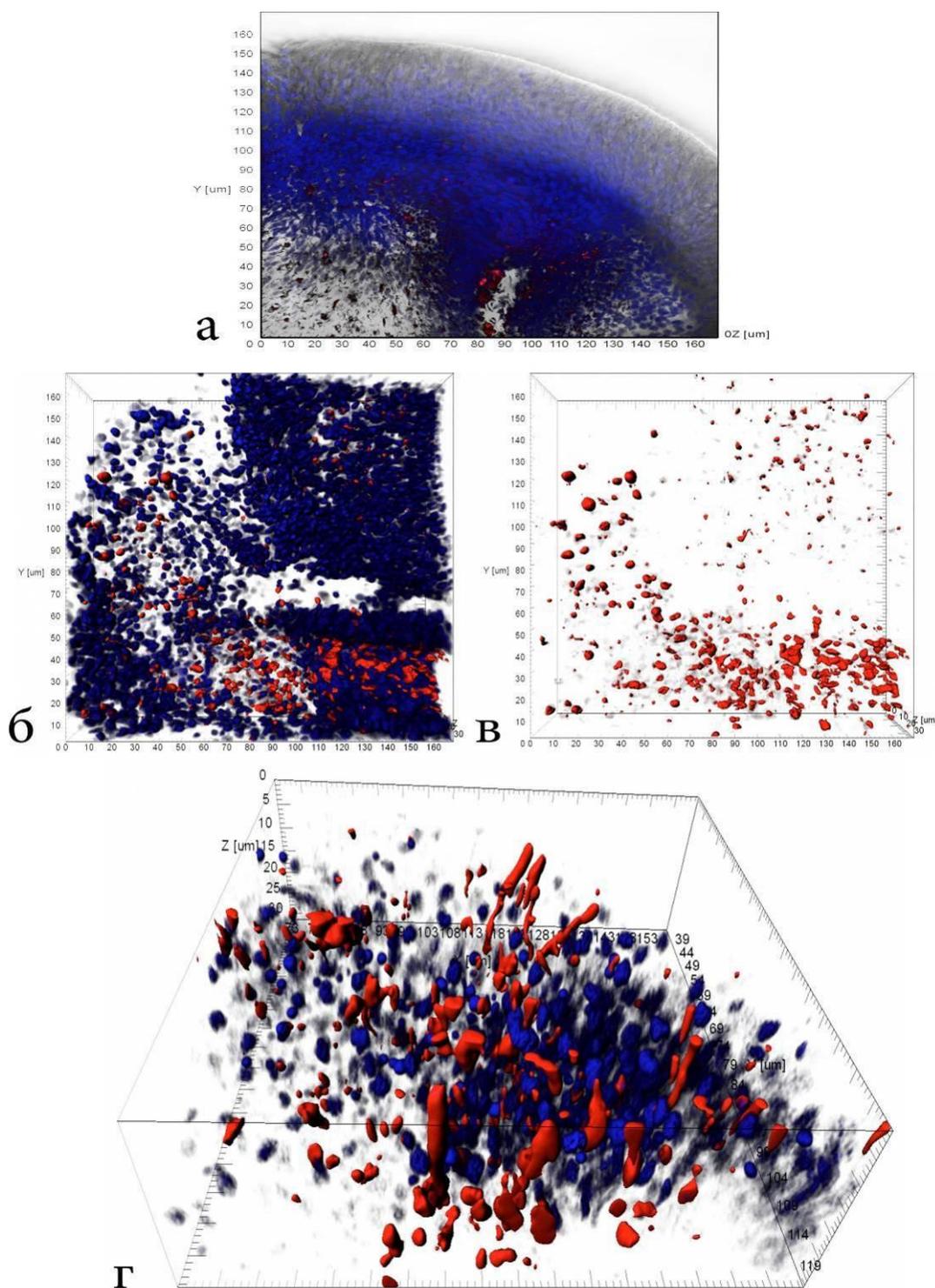


Рисунок 48. Цитохимическая идентификация митохондрий и ядер клеток обонятельного эпителия у гурामी в контроле. Окраска на митохондрии (MitoTracker® Orange, красный) и ядерный материал (DAPI, синий); конфокальная микроскопия. А – фрагмент обонятельной складки (просвечивающий режим); б – г – 3D-реконструкции участков эпителия, содержащих хорошо выраженный флуоресцентный сигнал от митохондрий; в – фото «б» в красном канале.

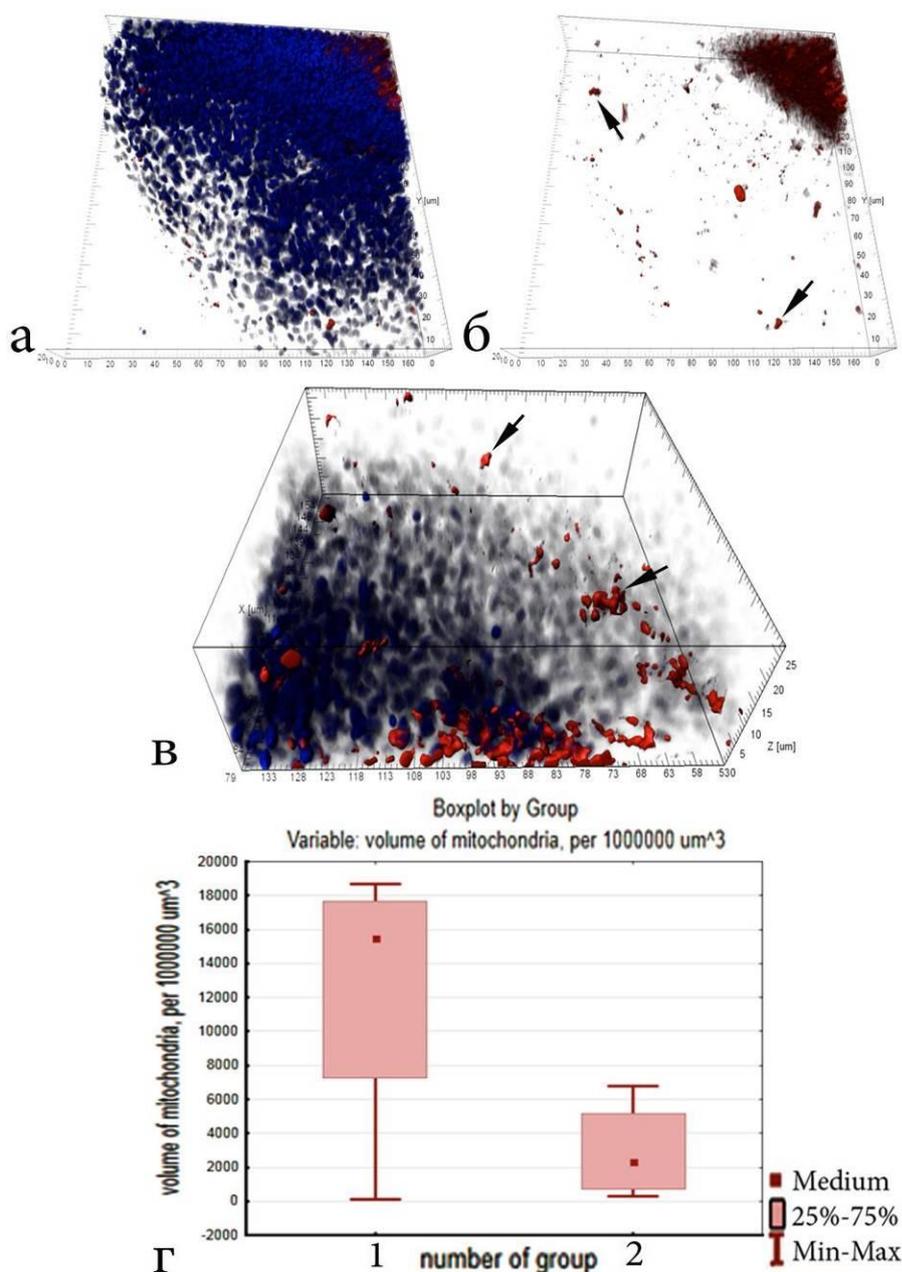


Рисунок 49. Дегенеративные изменения митохондрий в клетках обфакторного эпителия у гурами после длительной экспозиции рыб в гетерогенной смеси пептидов и аминокислот; окраска на митохондрии (MitoTracker® Orange, красный) и ядерный материал (DAPI, синий), 3D-реконструкции; конфокальная микроскопия. А – в – участки эпителия, содержащие низкий, в сравнении с контролем, флуоресцентный сигнал от митохондрий; б – фото «а» в красном канале, г – объемы, занимаемые флуоресцентным сигналом от функционально активных митохондрий в обфакторном эпителии у гурами в контроле (1) и после продолжительной хеомстимуляции смесью аминокислот и пептидов (2). График построен по данным количественного анализа Z-стеков (конфокальная микроскопия); * $p_u \leq 0,05$ в сравнении с группой контроля.

активными митохондриями, снижается в 6,2 раза ($p_u \leq 0,05$). Как уже говорилось выше, такое снижение энергетического состояния митохондрий может предшествовать их гибели, сопровождающейся необратимыми изменениями клеток.

Каковы причины выявленных структурно-функциональных изменений митохондрий? Известно, что первичные процессы обонятельной рецепции, реализуемые посредством цАМФ и инозитолтрифосфата, приводят к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [Nakamura, 2000; Ronnett *et al.*, 2002; Spehr *et al.* 2002]. Электрофизиологические исследования, проведенные на клетках разных типов, показывают, что митохондрии очень чувствительны к избытку ионов кальция в цитоплазме, особенно в условиях окислительного стресса [Duchen, 2000]. Ионы кальция активизируют фосфолипазу А₂, локализованную во внутренней мембране митохондрий, что ведет к гидролизу фосфолипидов и повреждению целостности мембран. В результате этих процессов повышается их проницаемость для катионов, которые вместе с фосфатом накапливаются в матриксе, что приводит к накоплению воды внутри митохондрий, их набуханию и нарушению процессов окислительного фосфорилирования [Carraro, Bernardi, 2016]. Кроме того, полученные недавно данные свидетельствуют о возможности существования во внутренней мембране митохондрий большой проводящей поры (permeability transition pore), которая в присутствии Ca^{2+} может открываться и приводить к их набуханию и высвобождению в цитозоль водорастворимых апоптотических белков: цитохрома С [Liu *et al.*, 1996; Kluck *et al.*, 1997], некоторых прокаспаз [Susin *et al.*, 1999], а также АИФ (Apoptosis Inducing Factor)-фактора, непосредственно вызывающего апоптоз клетки [Susin *et al.*, 1999; Daugas *et al.*, 2000]. Установлено, что открытие такого митохондриального канала может быть обусловлено также влиянием АФК [Schriewer *et al.*, 2013], основным источником которых в условиях окислительного стресса являются сами митохондрии [Bredesen, 1995; Starkov, 2008]. Таким образом, наши данные указывают на то, что дегенеративные

изменения митохондрий в клетках ольфакторного аппарата рыб могли возникнуть в результате хронического стресса, развивающегося в результате усиленных режимов их одорантной стимуляции. Причем, в эти процессы вероятно вовлечены не только ионы Ca^{2+} , но и, как говорилось выше, АФК, которые, являются ключевым звеном при развитии многих патологических процессов в клетке.

С помощью конфокальной микроскопии мы исследовали интенсивность образования АФК в клетках эпителия у контрольных и опытных рыб, используя CellROX deep red reagent. Этот индикатор образует флуоресцентные продукты после ковалентного взаимодействия со свободными радикалами клетки. На **рис. 50** видно, что в контроле, продукты, регистрирующие АФК, представлены в виде мелкодисперсного флуоресцирующего в красном спектре осадка, равномерно распределенного в толще эпителия. В отличие от этого, у экспериментальных рыб такие продукты, наряду с мелкодисперсной составляющей, имеют вид более концентрированных отдельных кластеров. Характерно, что эти кластеры, как правило, не образуют больших скоплений, находясь друг от друга на более-менее равноудаленном (20–50 мкм) расстоянии (**рис. 51, а–г**). Сравнительная статистическая обработка Z-стеков изображений с продуктами АФК свидетельствует о том, что по сравнению с контролем, у экспериментальных гидробионтов в отдельных участках нейроэпителия этот показатель возрастает в 3,5 раза ($p_u \leq 0,05$) (**рис. 51, д**). Это говорит о том, что кроме структурно-функциональных повреждений митохондрий и формирования энергодефицита в деструктивные внутриклеточные перестройки вовлечены и другие биохимические процессы, активизирующие образование АФК. Недавно опубликованные исследования показывают, что кроме прямого токсического влияния на митохондрии, АФК вместе с ионами Ca^{2+} могут выступать также в качестве сигнальных молекул при запуске самых разных внутриклеточных реакций. В частности, показано, что образующиеся в условиях окислительного стресса АФК могут выполнять компенсаторную

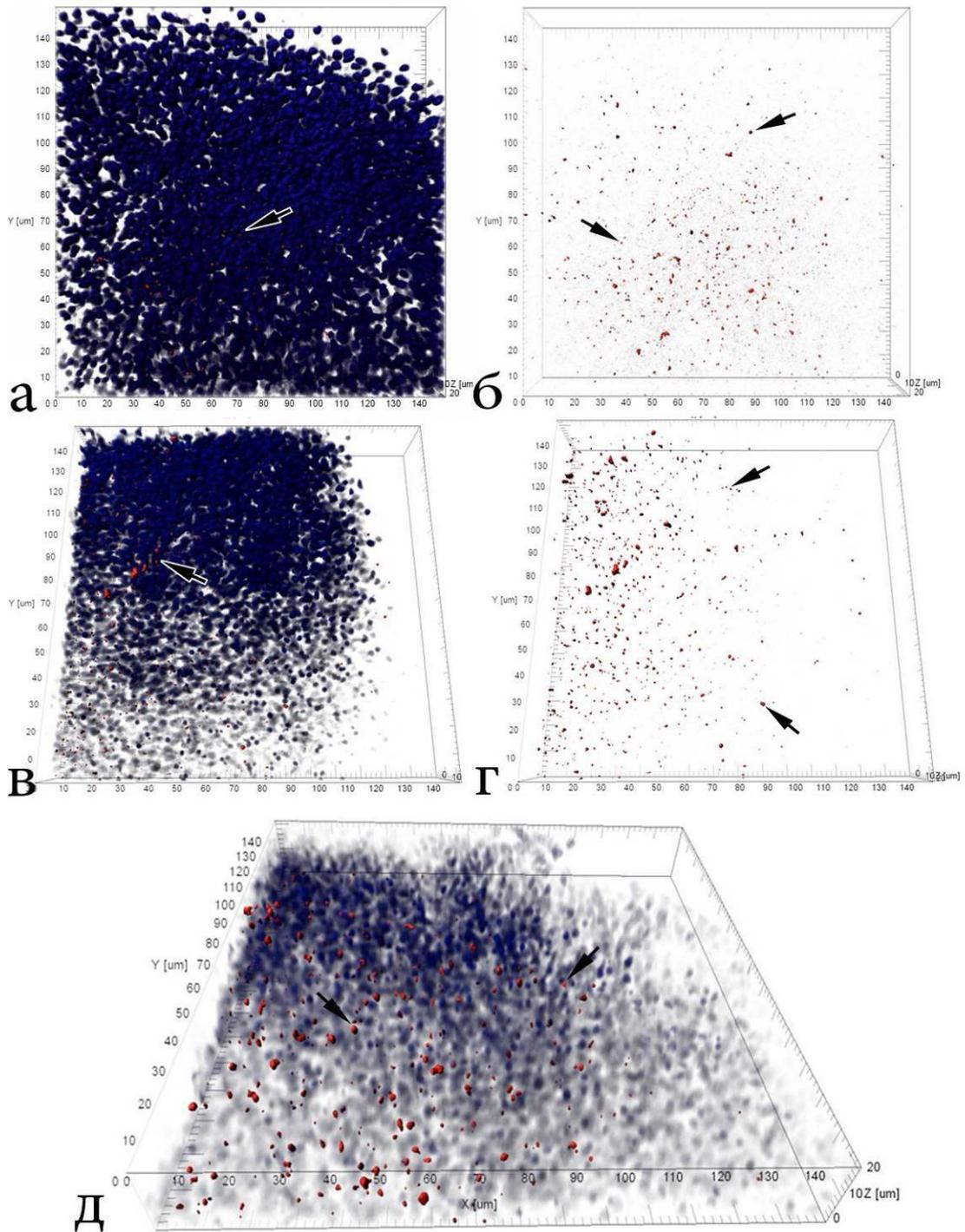


Рисунок 50. Продукция АФК в обонятельном эпителии у гурами в контроле. Окраска на АФК (CellROX deep red reagent, красный) и ядра (DAPI, синий); конфокальная микроскопия, 3D-реконструкции, поканальное разделение. А, в, д – отдельные участки обонятельного эпителия с мелкими кластерами АФК; б, г – аналогичные участки в красном канале. Продукты цитохимических реакций на АФК показаны стрелками.

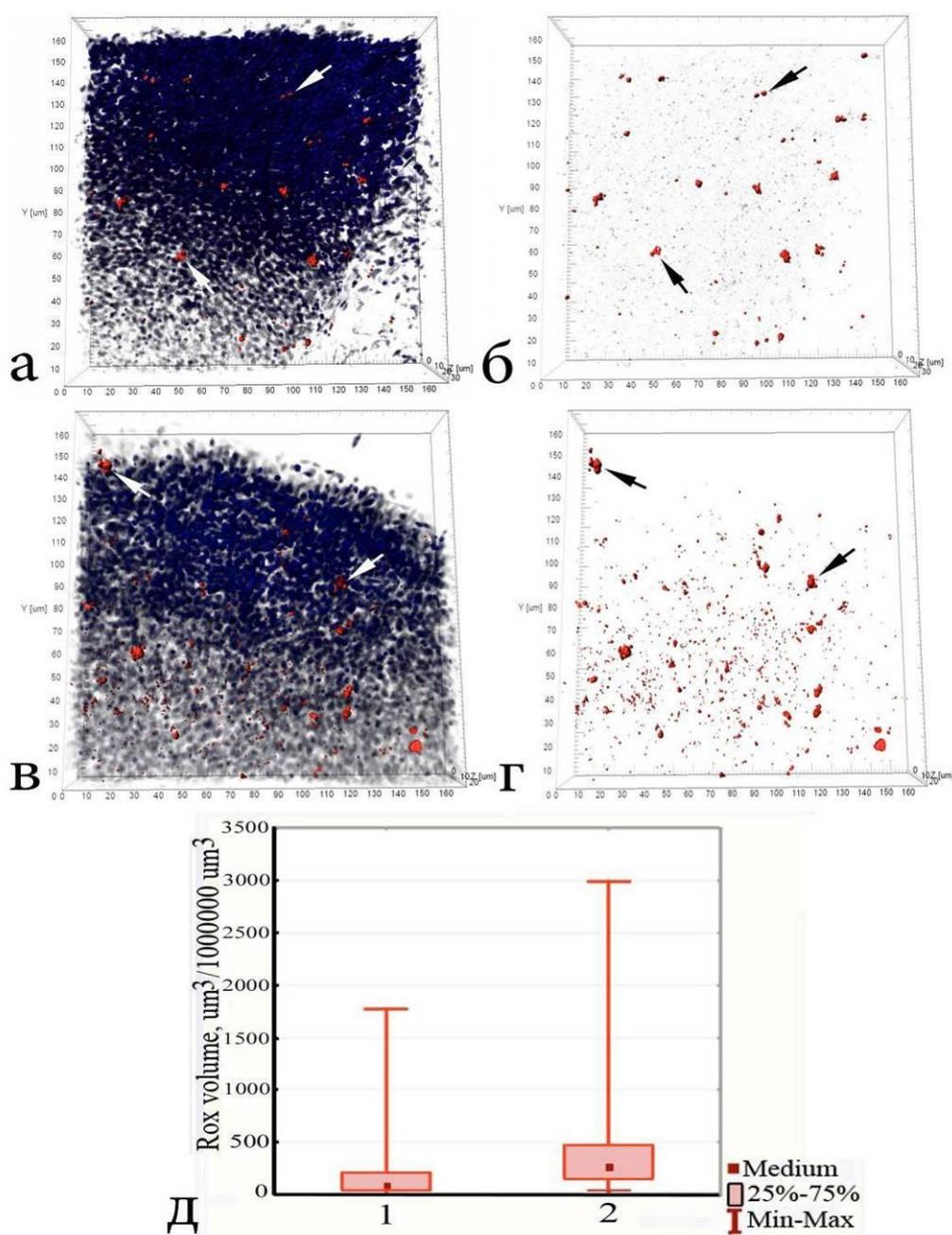


Рисунок 51. Увеличение продукции АФК в обонятельном эпителии у гурами после продолжительной хемотимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов. Окраска на АФК (CellROX deep red reagent, красный) и ядра (DAPI, синий); конфокальная микроскопия, 3D-реконструкции, поканальное разделение. А, в – участки эпителиа с многочисленными крупными кластерами АФК; б, г – аналогичные участки в красном канале. Продукты цитохимических реакций на АФК показаны стрелками; д – сравнительная оценка продукции АФК в контроле (1) и в эксперименте (2). График построен по данным количественного анализа Z-стеков (конфокальная микроскопия); * $p_u \leq 0,05$ в сравнении с контролем.

функцию: они активируют синтез митохондриальной ДНК и таким образом увеличивают дыхательную активность клетки [Moreno-Loshuertos *et al.*, 2006; Vaughman, Mootha, 2006]. Мы полагаем, что в условиях продолжительной одорантной стимуляции и устойчивого повышения концентрации Ca^{2+} этот компенсаторный механизм (если он имеет место) не может долго поддерживать необходимый уровень процессов окислительного фосфорилирования, что в конечном итоге приводит к гибели клетки.

Большой объем экспериментальных работ указывает на то, что митохондриальная дисфункция, вызванная нарушением метаболизма Ca^{2+} и окислительный стресс являются главными детерминантами гибели разных типов клеток [Görlach *et al.*, 2015; Bholá, Letai, 2016], включая нейроны [Iijima, 2006; Niizuma *et al.*, 2010]. Об этом же свидетельствуют наши данные: кроме дегенеративных изменений митохондрий в сенсорном аппарате экспериментальных рыб мы выявляли также многочисленные картины фрагментации ядер клеточных элементов эпителия – пикноза и кариорексиса, которые являются одним из показателей завершающей стадии программированной гибели клетки [Zamzami, Kroemer, 1999]. Ядра таких клеток имеют вид фрагментированных округлых образований размером от 0,5 до 3 мкм с конденсированным хроматином (**рис. 52**). Без дополнительного цитохимического окрашивания невозможно определить принадлежность таких измененных ядер к рецепторным или опорным клеткам эпителия. Тем не менее, морфологическим подтверждением избирательной гибели рецепторных клеток при оксидативных повреждениях внутриклеточных структур являются также обнаруженные в базальных слоях 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. 53**).

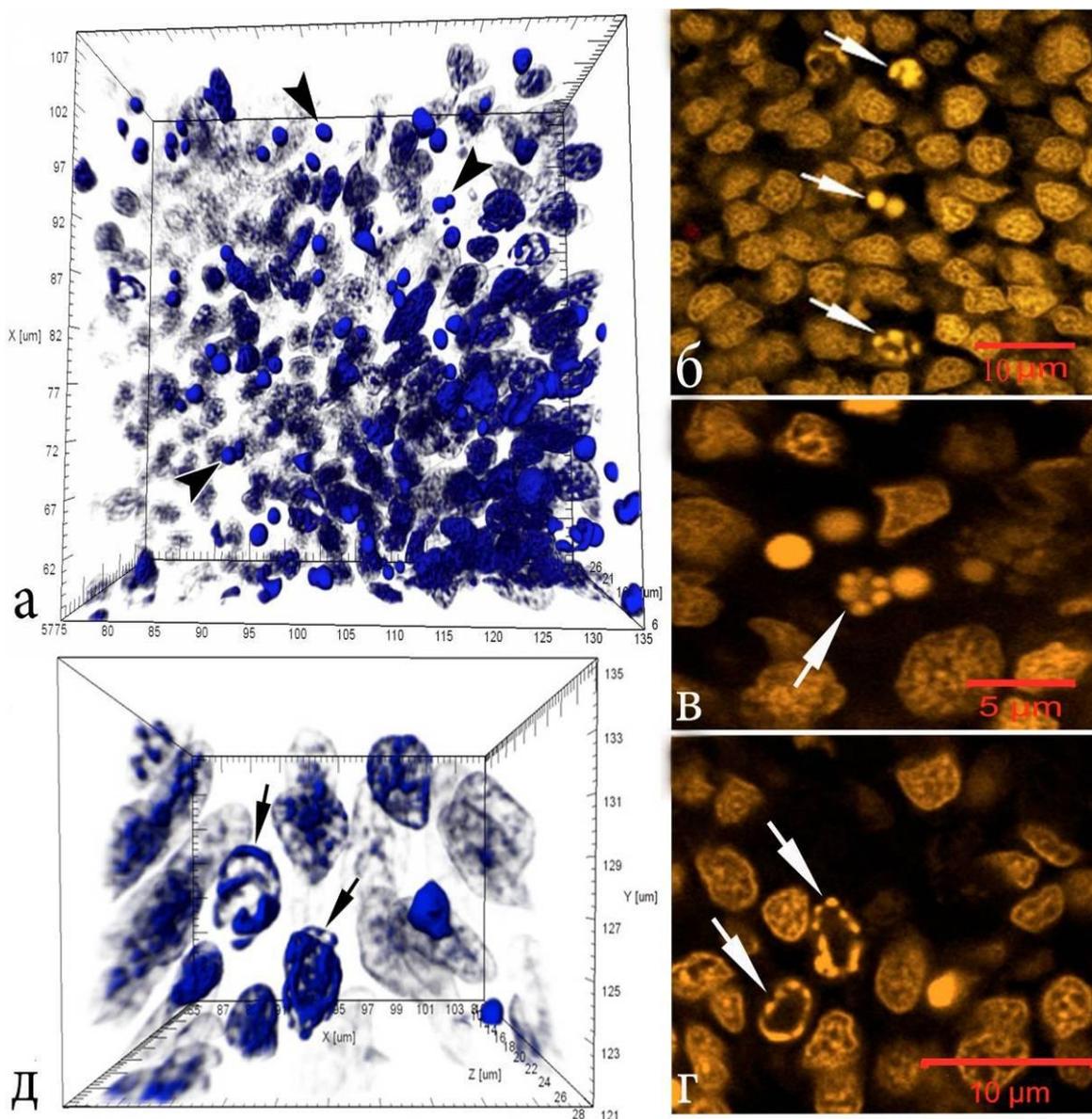


Рисунок 52. Апоптотические тельца (а–в) и ядра с конденсированным хроматином (д, г) и в обфакторном эпителии у гурами после продолжительного воздействия гетерогенной смеси аминокислот и пептидов; окраска на ядра (DAPI, синий; желтый); конфокальная микроскопия. А, д – 3D-реконструкции; б – г – 2D-срезы.

Данные факты говорят о том, что дегенеративные изменения не охватывают в одинаковой степени все нейроны. Определенная популяция клеток оказывается более устойчивой к предложенному спектру химических агентов. Можно предположить, что такая избирательность нейронов

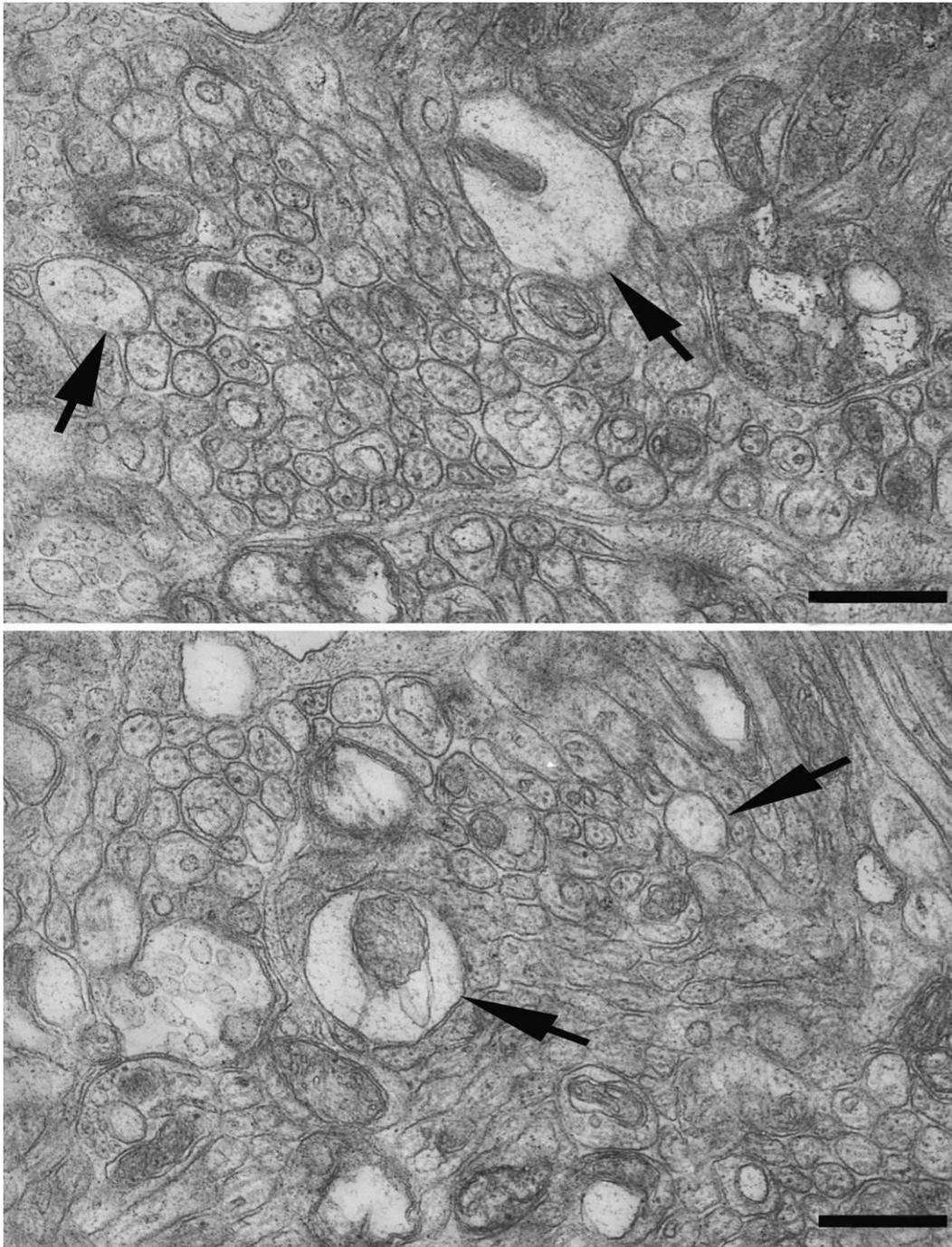


Рисунок 53. Поперечные срезы центральных отростков обонятельных клеток в базальных отделах эпителия у каменной широколобки (эксперимент). Видны набухшие аксоны (показаны стрелками) с просветленным матриксом цитоплазмы. Масштаб: 0,5 мкм.

предопределяется их индивидуальной хемочувствительностью: клетки, рецепторы которых не имеют сродства к действующим веществам, сохраняют свою исходную структуру. Клетки, которые содержат специфичные рецепторы к пахучим веществам, при их длительном воздействии претерпевают стрессорные необратимые изменения, завершающиеся апоптозом. Исходя из этого, можно заключить, что именно в этих клетках наблюдалось снижение количества функционально активных митохондрий, их деструктивные изменения, дегенеративные перестройки ядер и повышенное содержание АФК, что в совокупности и предопределило их терминальную дифференцировку.

Для количественной оценки процессов апоптоза, которые могли быть активизированы в ольфакторном эпителии экспериментальных рыб в процессе длительной одорантной стимуляции, мы использовали метод TUNEL [Gavrieli *et al.*, 1992]. Он позволяет цитохимически регистрировать микро-фрагментацию в ДНК у клеток в процессе их программированной клеточной гибели. На **рис. 54 и 55** представлены тотальные препараты отдельных складок обонятельного эпителия у контрольных рыб, в котором выявляются немногочисленные, окрашенные зеленым цветом ядра клеток с фрагментированной ДНК. В сравнении с этим, у экспериментальных рыб отмечается значительный рост числа клеток в состоянии апоптоза. Они распространены во всей толще эпителия и часто образуют более плотные группы (**рис. 56; 57, а–в**). Статистическая обработка объемов, занимаемых апоптотическими ядрами, объективно показывает, что в сравнении с контролем, в обонятельном эпителии опытных рыб доля погибших клеток увеличена в 4,5 раза ($p_u \leq 0,05$) (**рис. 57, г**). В связи с тем, что по данным электронной микроскопии у экспериментальных рыб дегенеративные изменения наблюдались как в рецепторных, так и в опорных клетках, можно предположить, что представленный график может отражать усиление процессов апоптоза в обоих типах клеток.

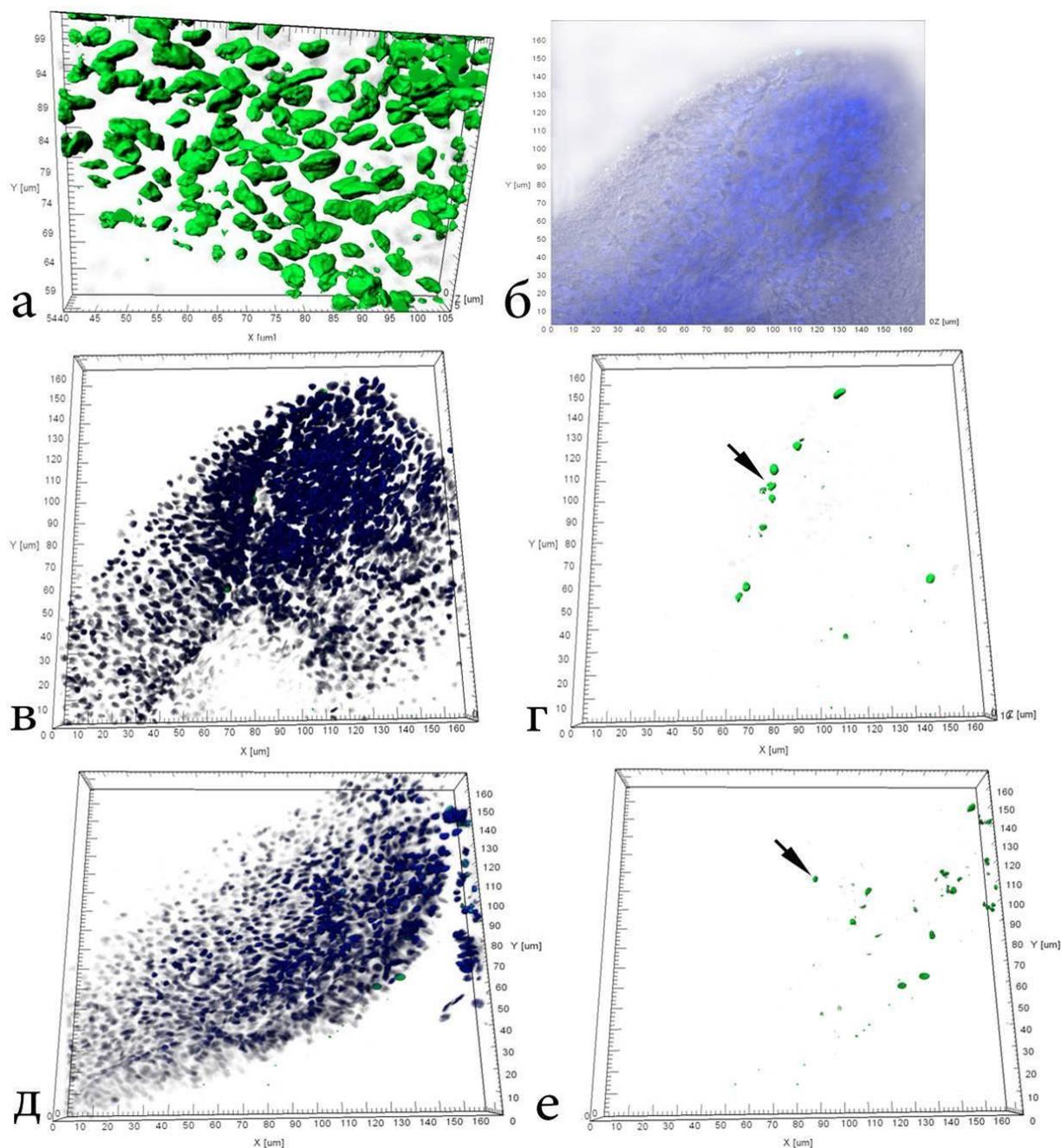


Рисунок 54. Цитохимическая идентификация процессов программированной клеточной гибели (апоптоза) в отдельных складках обонятельной розетки у гурами в контроле. Метод Click-iT® TUNEL, погибшие ядра клеток окрашены Alexa Fluor488 (зеленый); жизнеспособные – Hoechst33342 (синий); конфокальная микроскопия, 3D-реконструкции. А – позитивный контроль (синий и зеленый каналы); б – фрагмент обонятельной складки (синий и зеленый каналы); в, д – ядра клеток в участке эпителия (синий и зеленый канал); г, е – аналогичные участки в зеленом канале. Немногочисленные ядра погибших клеток отмечены стрелками.

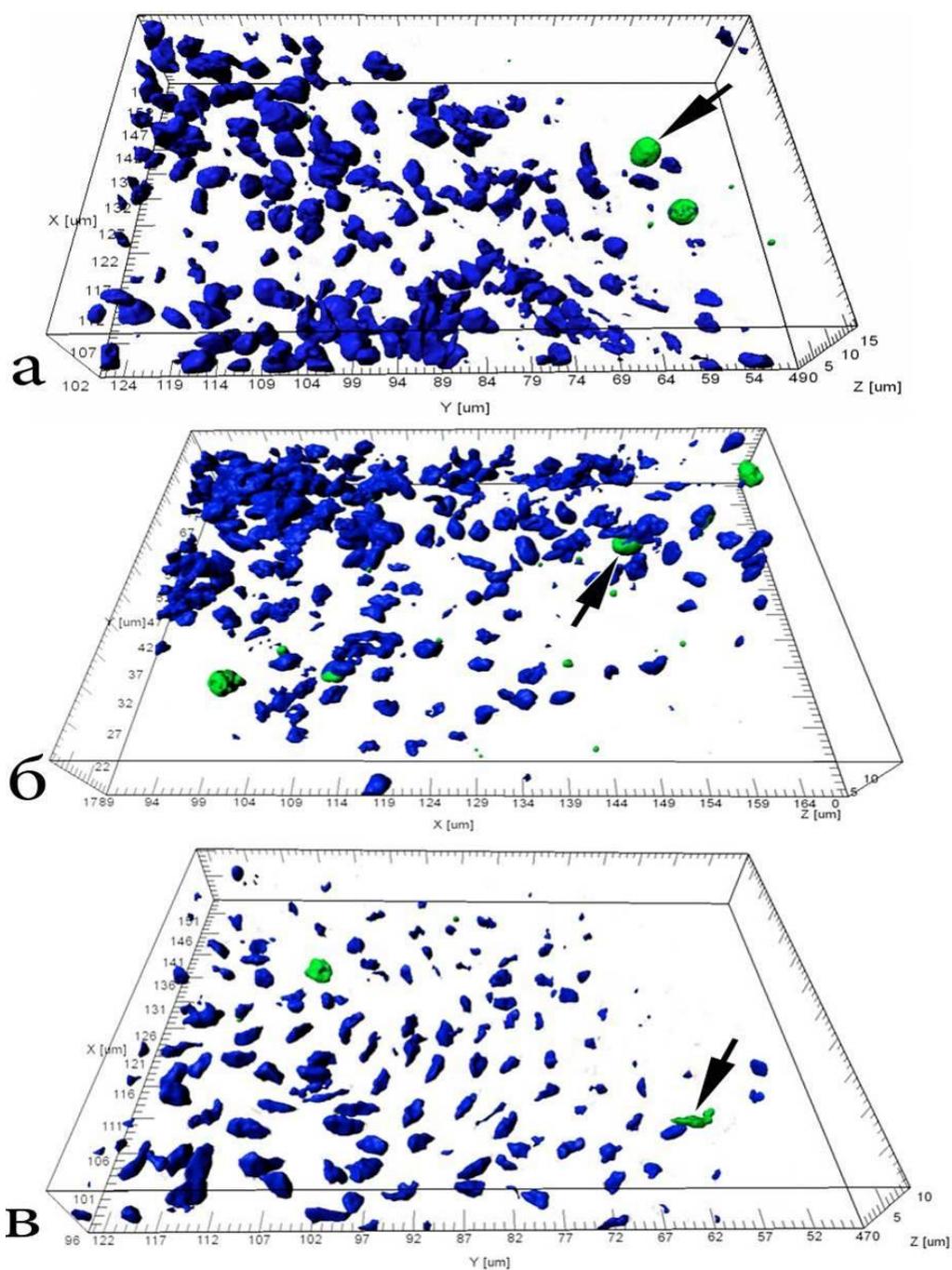


Рисунок 55. Цитохимическая идентификация процессов программированной клеточной гибели (апоптоза) в обонятельном эпителии у гурями в контроле. Метод Click-iT® TUNEL, ядра погибших клеток окрашены Alexa Fluor488 (зеленый); жизнеспособные – Hoechst33342 (синий); конфокальная микроскопия, 3D-реконструкции. А–в – отдельные участки эпителия. Немногочисленные ядра погибших клеток отмечены стрелками.

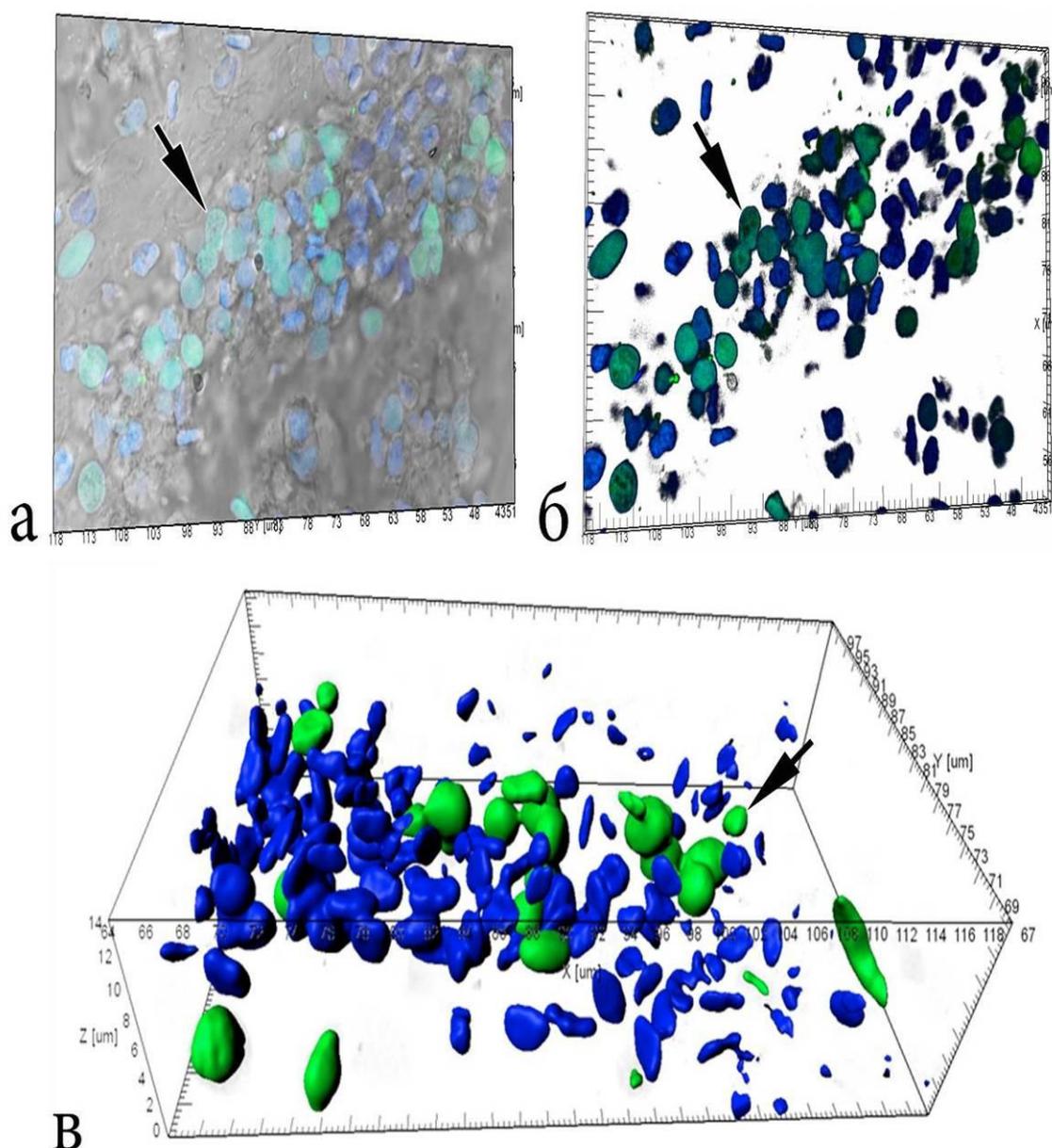


Рисунок 56. Усиление процессов программированной клеточной гибели (апоптоза) в обонятельном эпителии у гурями после продолжительной хемотимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов. Метод Click-iT@TUNEL, ядра погибших клеток окрашены Alexa Fluor488 (зеленый); жизнеспособные – Hoechst33342 (синий); конфокальная микроскопия. А, б – фрагмент обонятельной складки, просвечивающий режим; в – многочисленные ядра погибших клеток (показаны стрелками), расположенные среди ядер жизнеспособных клеток (3D-реконструкция).

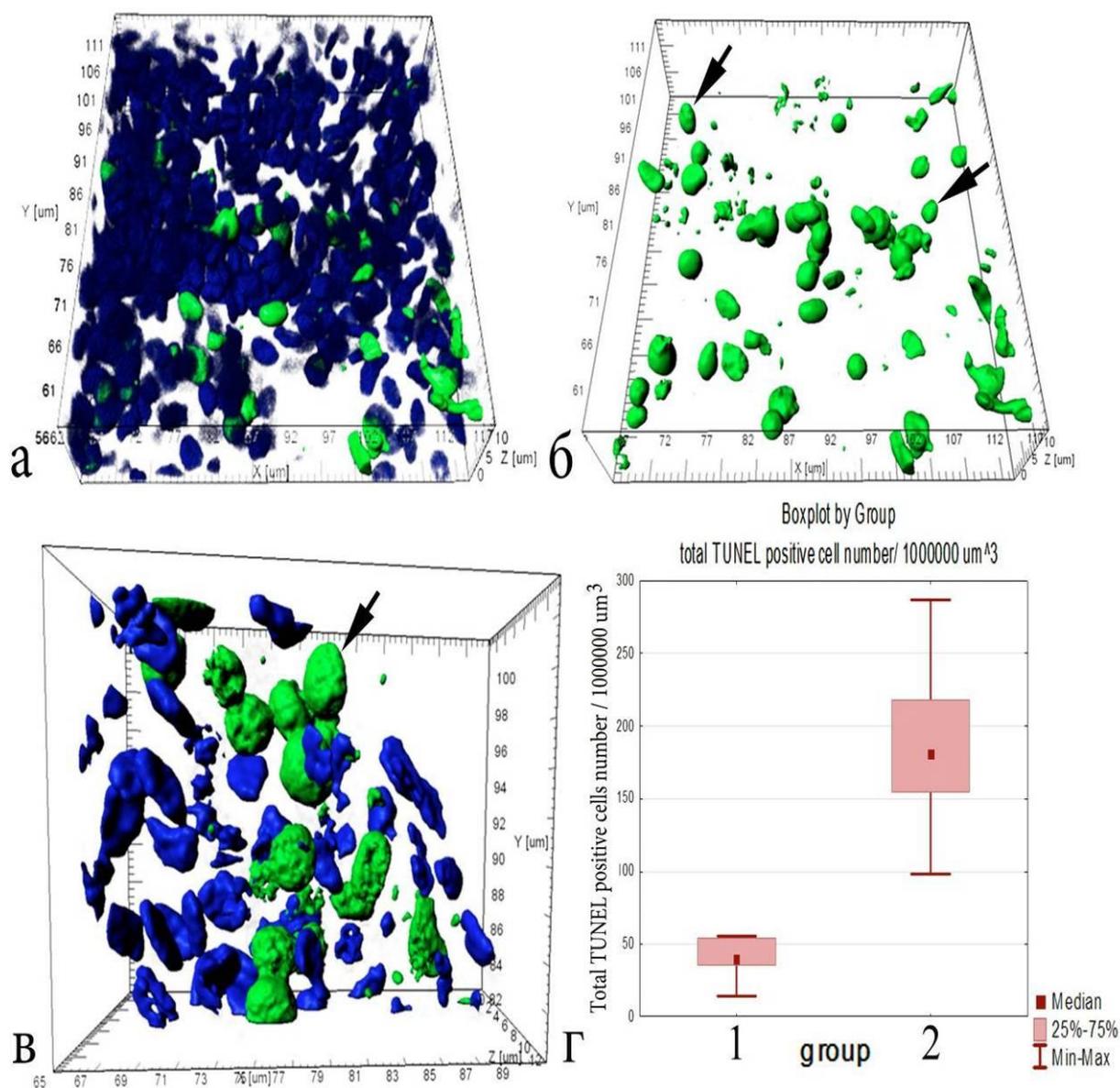


Рисунок 57. Фрагменты обонятельного эпителия у гурями с повышенным числом ядер с фрагментацией ДНК в эксперименте. Метод Click-iT® TUNEL; погибшие ядра клеток окрашены Alexa Fluor488 (зеленый); жизнеспособные – Hoechst33342 (синий); 3D-реконструкции, конфокальная микроскопия. А – фрагмент эпителия; б – этот же участок в зеленом канале; в – многочисленные ядра погибших клеток (показаны стрелками) среди ядер жизнеспособных клеток; г – график, отражающий усиление процессов апоптоза (1 – контроль; 2 – эксперимент); график построен по данным количественного анализа Z-стеков (конфокальная микроскопия); * $p_u \leq 0,05$ в сравнении с контролем.

Таким образом, пролонгированное воздействие гетерогенной смеси аминокислот и пептидов вызывает в периферическом отделе обонятельного анализатора ультраструктурные перестройки как рецепторных, так и глиальных клеток, часть из которых далее подвергается гибели. Эти данные согласуются с исследованиями, проведенными на первичной культуре обонятельных клеток крыс, в которых показано, что длительное (до 13 мин) воздействие пахучих веществ запускает в них Ca^{2+} -зависимые процессы программированной гибели клеток, сопряженные с фрагментацией ДНК, активацией каспазы-3 и экспозицией фосфатидилсерина на внешней мембране клеток [Brauchi *et al.*, 2006].

5.5 Нейрогенез в обонятельном эпителии у рыб в контроле и после продолжительной одорантной стимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов.

В связи с выявленными фактами значительных дегенеративных изменений клеток логичным было предположить, что в обонятельном эпителии экспериментальных рыб могут быть активизированы также и компенсаторные процессы нейрогенеза. Как отмечалось в литературном обзоре, образование новых клеток всегда имеет место в обонятельном аппарате животных и поддерживается за счёт митотической активности и дифференцировки расположенных здесь региональных стволовых клеток – предшественников всех элементов эпителия [Huard, Schwob, 1995; Cau *et al.*, 2002; Schwob, Jang, 2006]. С помощью различных методов световой и конфокальной микроскопии на разных видах рыб мы проанализировали некоторые цитологические показатели, которые позволяют объективно оценить митотическую активность и дальнейшую дифференцировку базальных клеток у контрольных рыб и после их экспозиции в условиях длительно действующих запахов [Клименков и др., 2011].

5.6 Активация ядрышек в базальных (стволовых) клетках эпителия

Для выявления интенсивности процессов нейрогенеза у контрольных и опытных рыб в качестве одного из цитологических маркеров мы использовали морфологические параметры ядрышек стволовых клеток, локализованных в базальных отделах эпителия. Именно в этих клетках 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 [Hadjilov, 1985]. В связи с этим, с помощью метода избирательной окраски ядрышек мы сравнили степень их морфологического развития в ядрах базальных клеток у двух видов рыб (обыкновенный голяк и жемчужный гурами) в контроле и после их длительной (15 сут.) одорантной стимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов.

Обонятельные розетки, подготовленные путем «стряхивания–отпечатывания» представляют собой препараты в той или иной степени диссоциированных ядер, окрашенных азотнокислым серебром по методу Ховелла и Блейка [Howell, Black, 1980]. Размеры и форма ядер взрослых рецепторных и опорных клеток существенно отличаются от таковых у более мелких малодифференцированных стволовых клеток. У взрослых нейронов и обкладочных клеток ядра более крупные, вытянуты в вертикальном (по отношению к базальной мембране) направлении и, как правило, содержат 1–2 ядрышка, локализованных либо в центре, либо по краям ядра. При данном методе подготовки препаратов у рецепторных клеток иногда наблюдаются частично сохранившиеся вытянутые периферические отростки и аксоны, что делает их легко узнаваемыми среди других клеточных элементов эпителия. В сравнении с этим, ядерный материал стволовых клеток всегда имеет округлую форму и у исследованных аквариумных рыб обычно содержит 2–3

оптически плотных более мелких ядрышка, расположенных ближе к центру, или по периферии ядра.

Проведённый цитологический анализ показывает, что как в контроле, так и в эксперименте ядра малодифференцированных базальных клеток демонстрируют разную степень развития ядрышек. После хронического воздействия гетерогенной смесью аминокислот и пептидов в базальном эпителии у голяна и гурами происходит увеличение числа клеток с повышенной активностью, о чём свидетельствуют полученные данные. Так, у голяна в контроле (**рис. 58**) среднее значение ядрышкового индекса (InI) в случайной выборке из 100 клеток составляет $3,9 \pm 0,5$ %, а в эксперименте оно достоверно ($p < 0,001$) возрастает до $5,5 \pm 0,9$ % (**рис. 59**). У гурами в контроле (**рис. 60, а**) этот показатель в случайной выборке из 100 клеток равен $5,5 \pm 0,9$ %, а в эксперименте (**рис. 60, б–г**) он достоверно ($p < 0,001$) увеличивается до $7,8 \pm 1,4$ %. Характерно, что как у контрольных, так и у экспериментальных особей в базальных отделах эпителия среди ядер, принадлежащих стволовым клеткам, иногда встречаются немногочисленные, более крупные ядра с фигурами митозов. Кроме того, обращает на себя внимание факт, что в опытных группах рыб ядра с увеличенными показателями ядрышкового индекса часто формируют отдельные, хорошо выраженные популяции из 5–7 клеток (**рис. 59, а; 60, б**).

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, что необходимо для обеспечения их роста и последующей дифференцировки в зрелые рецепторные и опорные клетки. Вероятно, такая активация процессов нейрогенеза носит адаптивный характер и направлена на восстановление после апоптоза исходного количества клеток, необходимых для поддержания соответствующего уровня обонятельной рецепции.

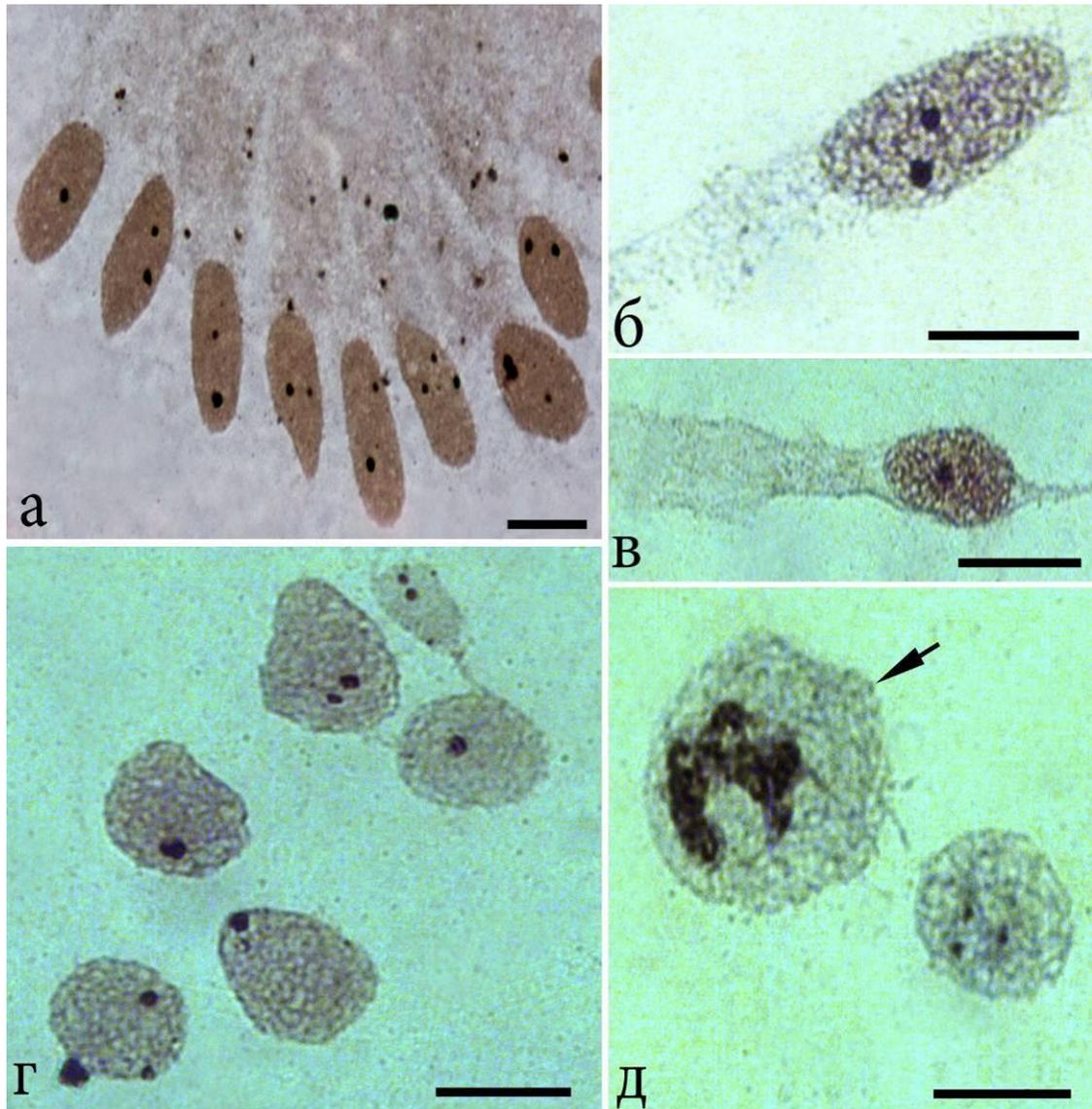


Рисунок 58. Низкие показатели ядрышкового индекса в ядрах клеток обонятельного эпителия обыкновенного гольяна в контроле. А – близко расположенные ядра опорных и рецепторных клеток в целостном участке эпителия; б, в – отдельные ядра рецепторных клеток с частично сохранившимися отростками; г – ядра стволовых клеток с низким ядрышковым индексом; д – стволовые клетки в покое и в процессе деления (показано стрелкой); Масштаб – 10 мкм.

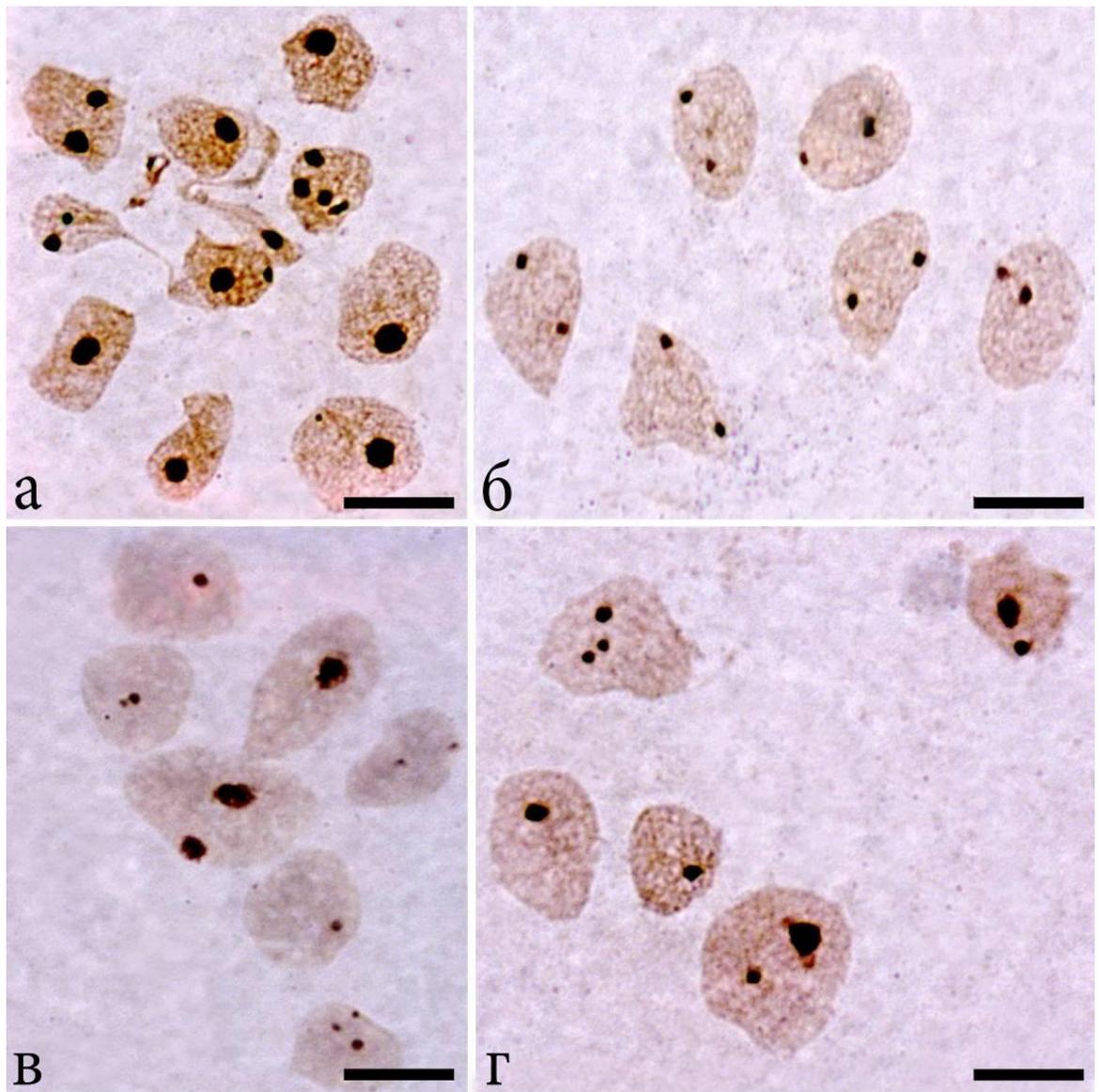


Рисунок 59. Группы ядер стволовых клеток с разными значениями ядрышкового индекса в обонятельном эпителии у обыкновенного гольяна в эксперименте. А – ядра с повышенными показателями ядрышкового индекса; б – ядра с низкими показателями ядрышкового индекса; в, г – ядра с различным уровнем активности ядрышек. Масштаб: 10 мкм.

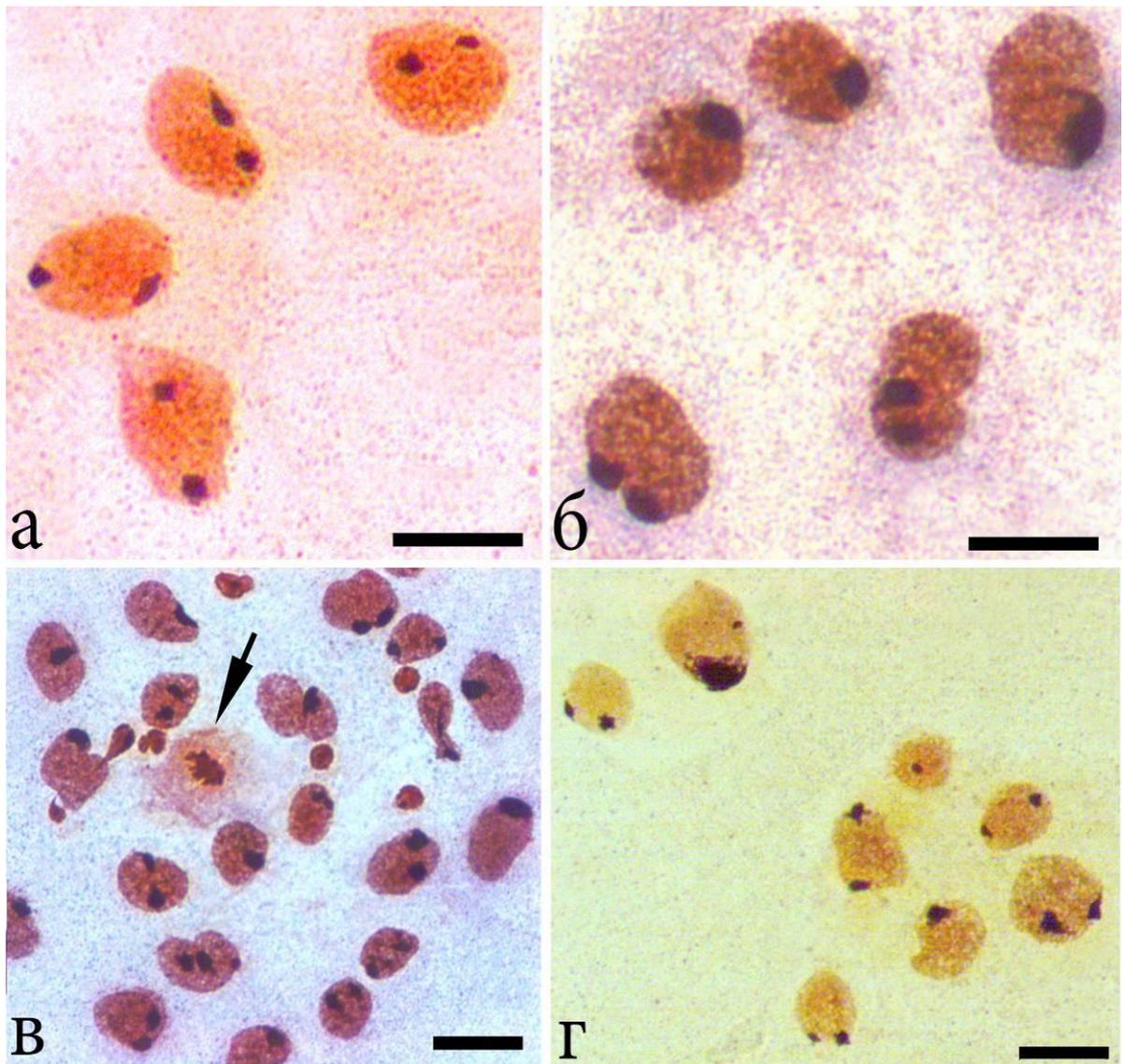


Рисунок 60. Ядра стволовых клеток в обонятельном эпителии у гурами в контроле (а) и в эксперименте (б–г). А – группа ядер с низкими значениями ядрышкового индекса; б – ядра с высокими показателями ядрышкового индекса; в, г – ядра с различным уровнем активности ядрышек. Стрелкой показано ядро делящейся клетки. Масштаб: 10 мкм.

5.7 Оценка пролиферативной активности клеток в обонятельном эпителии у контрольных рыб с помощью BrdU

Данные об активации процессов нейрогенеза в экспериментальных группах рыб подтверждаются также тестами на пролиферативную активность, определяемую нами с помощью бромдезоксимуридина (BrdU) – синтетического нуклеозида, который может заменять тимидин в процессе репликации ДНК [Gratzner, 1982]. Нужно сказать, что обычно локализацию BrdU-позитивных клеток в сенсорном аппарате исследуют на полутонких замороженных, либо депарафинизированных срезах [Giannetti et al., 2004; Kai et al., 2005; Tucker et al., 2010; Paschaki et al., 2013; Brann et al., 2015; Bayramli et al., 2017]. По-нашему мнению, это не дает возможности увидеть тотальную картину пространственного распределения новообразованных клеток в толще эпителия, что особенно важно на более поздних сроках их миграции и дифференцировки. В связи с этим, нейрогенез и пути дальнейшей транспортировки клеток мы изучали с помощью конфокальной микроскопии только на целостных обонятельных розетках. Эти исследования проведены на представителях двух видов рыб: каменной широколобке (*P. knerii*,) и жемчужном гурами (*T. leeri*). Причем, у широколобки митотическую активность оценивали через 12 часов, а у гурами – на двух сроках: через 12 часов и через 36 часов внутрибрюшинной инъекции BrdU. Для этого в образцах вся толща обонятельных складок в программе Imaris 7.2.3 была поделена на отдельные компартменты (объемом $1 \times 10^5 \mu\text{m}^3$), в каждом из которых на разных сроках инкубации BrdU подсчитывалось количество клеток, включивших метку. Таким образом, использование этого подхода позволило не только определить интенсивность пролиферативной активности клеток у контрольных и опытных рыб, но и выявить динамику их топографического распределения в эпителии во времени. Мы не ставили перед собой цель оценить соотношение гистотипов клеток (рецепторных и

опорных) или каких либо других маркеров их дифференцировки, которые возникают в клетках по ходу их развития, полагая, что эти задачи нужно решать в специальных исследованиях. На наших препаратах ядра клеток, включивших BrdU, вследствие связывания антител (меченых FITC), окрашены зеленым цветом, а ядра клеток, не включивших данную метку, флуоресцируют в красной области спектра после связывания 7-аминоактиномицина.

Каменная широколобка (*P. knerii*). У особей из контрольной группы байкальских широколобок через 12 часов после инъекции BrdU пролиферативно активные клетки обычно располагаются отдельно, либо в виде немногочисленных (до 9 клеток), или более крупных кластеров, состоящих из 10–20 клеток (**рис. 61**).

Как мелкие, так и крупные группы клеток более-менее равномерно рассредоточены в толще эпителия. Характерно, что мелкие кластеры занимают основную (95 %) долю от всего объема ткани. На долю крупных групп ядер с меткой BrdU приходится только незначительная часть эпителия – 5 %. Это говорит о том, в отсутствии обонятельных стимулов нейrogenез реализуется только за счет небольшой популяции пролиферативно активных клеток, занимающих по объему основную часть эпителия. Общее число клеток, включивших метку в контроле, составляет 5.06 ± 1.67 на каждые 10^5 мкм³ (**рис. 62, 1**).

Жемчужный гурами (*T. leeri*). У жемчужного гурами на данном сроке (12 ч.) инкубации BrdU в целом наблюдается аналогичная картина распределения меченых клеток: основной объем (95 %) эпителия содержит только небольшие (< 9) кластеры делящихся клеток. Более крупные скопления (10–20) клеток сосредоточены только в небольшом (5 %) объеме ткани (**рис. 63, 64**). Общая плотность распределения молодых клеток в эпителии близка с таковой у каменной широколобки (**рис. 62, 2**).

Через 36 часов после инъекции BrdU картина распределения меченых клеток в эпителии существенно изменяется. В базальных слоях и в средней

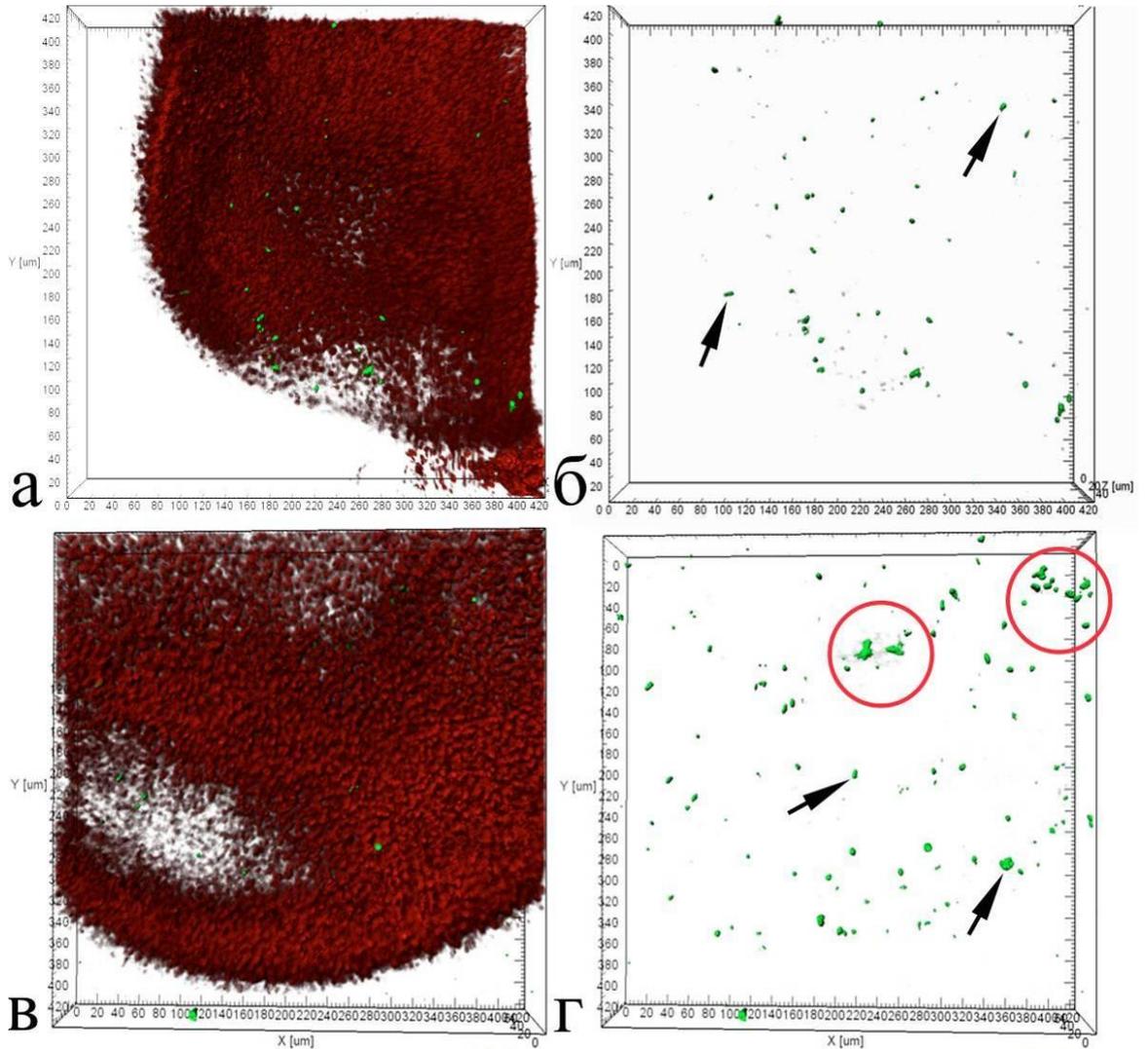


Рисунок 61. Отдельные складки обонятельного эпителия у каменной широколобки в контроле (12 ч. инкубации BrdU). Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU (отмечены стрелками) с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый). Неделющиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А, в – в красном и зеленом каналах; б, г – в зеленом канале; показаны кластеры с повышенным числом пролиферативно активных клеток.

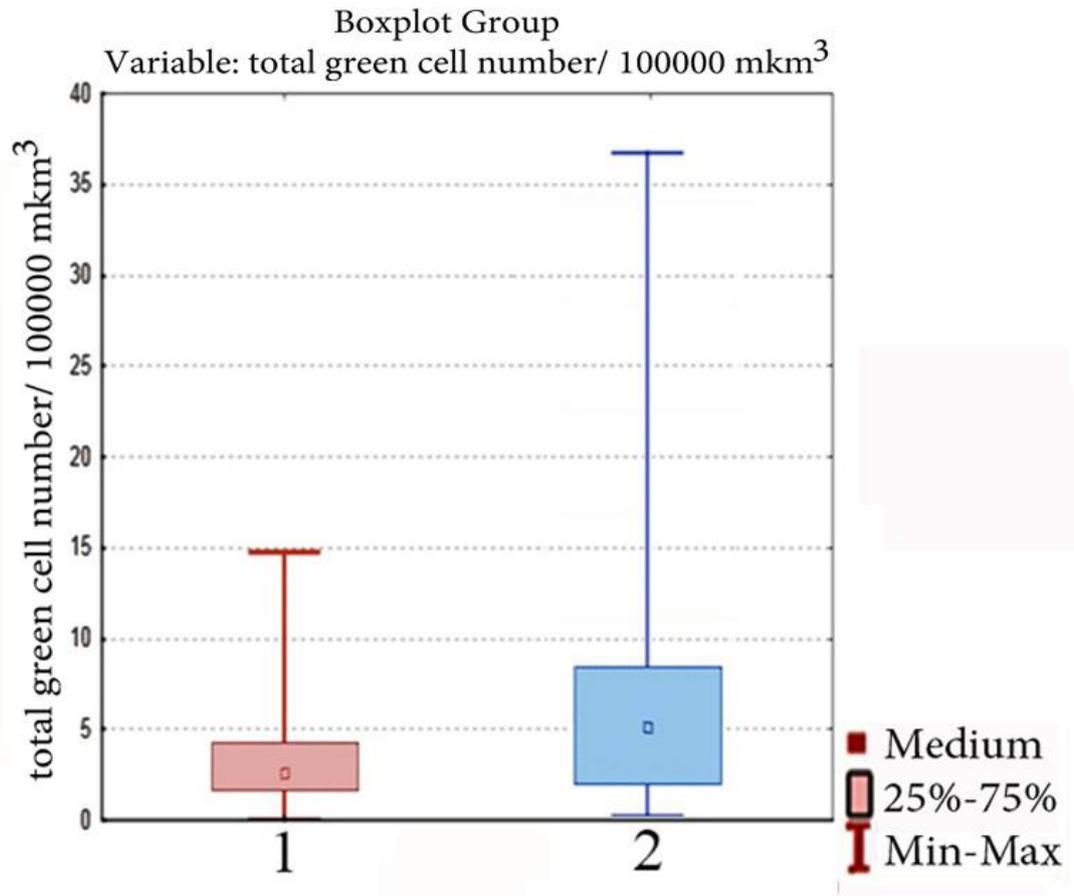


Рисунок 62. Среднее число клеток, включивших BrdU у каменной широколобки (1) и у жемчужного гурами (2) в контроле на 10^5 мкм³ обонятельного эпителия; $p < 0,001$; график построен по данным количественного анализа Z-стеков (конфокальная микроскопия).

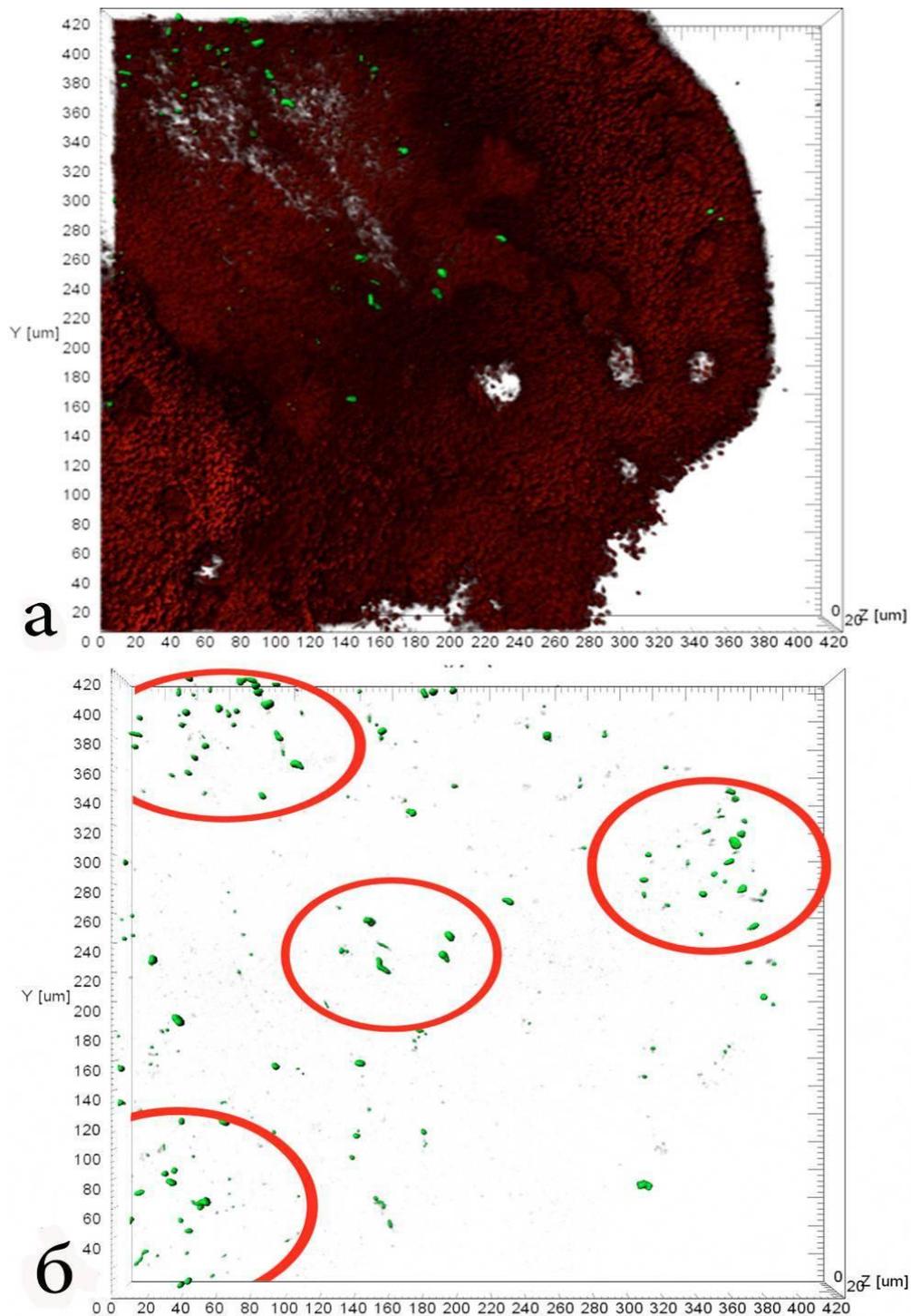


Рисунок 63. Отдельная складка обонятельного эпителия у гурями в контроле (12 ч. инкубации BrdU). Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый). Неделящиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А – в красном и зеленом каналах; б – в зеленом канале; видны немногочисленные ядра новообразованных клеток.

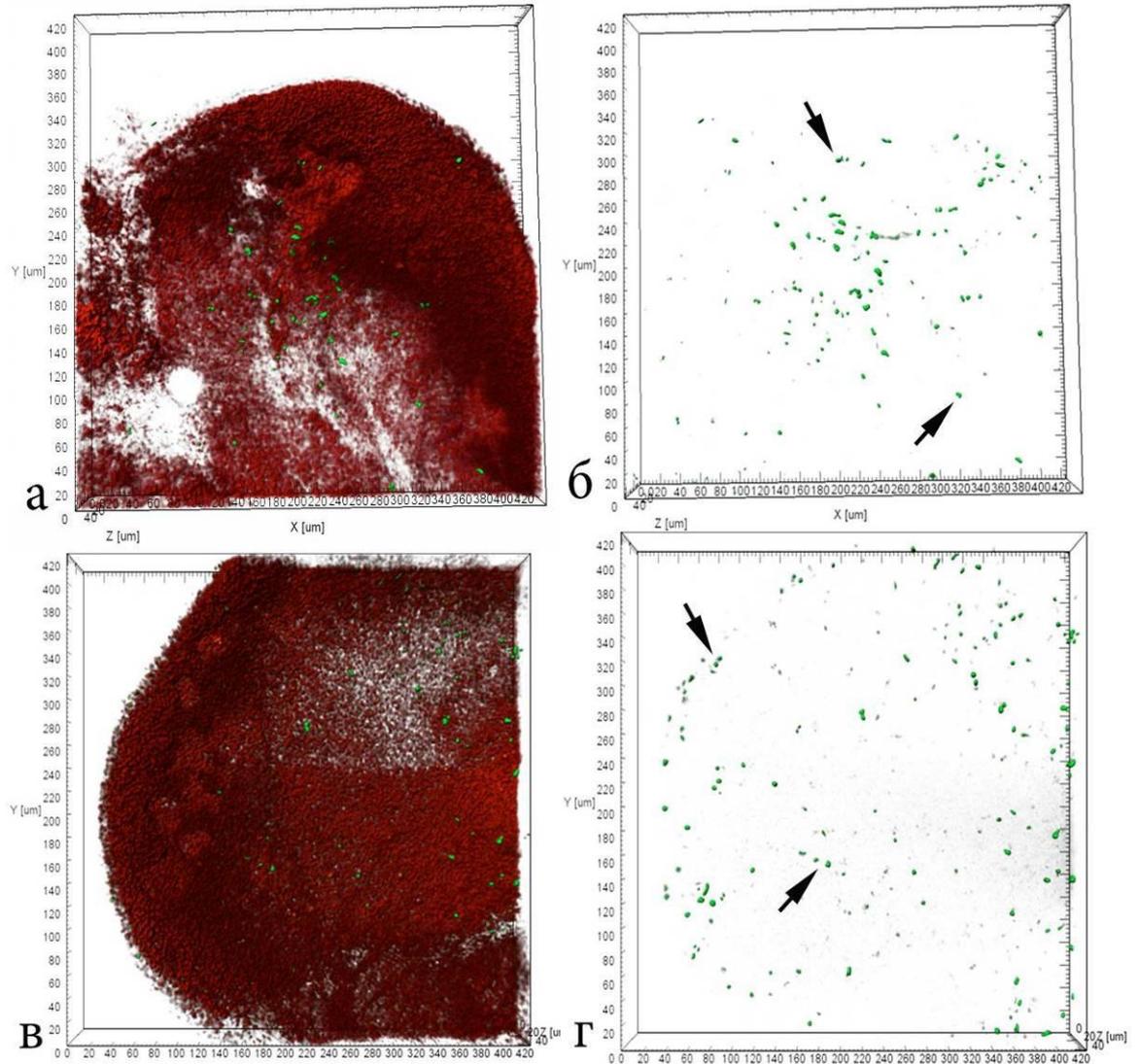


Рисунок 64. Отдельные складки обонятельного эпителия у гурами в контроле (12 ч. инкубации BrdU). Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый). Неделящиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А, в – в красном и зеленом каналах; б, г – в зеленом канале; во всей толще эпителия видны немногочисленные ядра молодых клеток, включившие метку (показаны стрелками).

части эпителия делящиеся клетки практически отсутствуют. На этом сроке инкубации с BrdU они выявляются только в поверхностном слое эпителия, где образуют очень крупные BrdU-позитивные скопления клеток. Они насчитывают до 100–150 или большее количество клеток, которые мы

условно назвали клеточными доменами (**рис. 65–67**). Таким образом, как и в работах по функциональному картированию эпителия [Buck, 1996; Mori *et al.*, 2006] этот термин мы использовали для обозначения клеточных популяций, которые характеризуются повышенным числом молодых (включивших метку) клеток и располагаются только в приповерхностных зонах эпителия, что говорит о завершенности процессов их позиционирования. Характерно, что такие домены, как правило, сформированы в виде уплощенных слоев, состоящих из одного ряда ядер молодых клеток. На представленных рисунках приведены 3D-стеки тотальных препаратов обонятельных складок, в которых отчетливо видны такие локальные скопления клеток, включивших метку. Хорошо видно, что группы ядер клеток с маркером всегда располагаются только в поверхностной зоне эпителия, взаимодействующей с внешней средой. В некоторых случаях над слоем молодых клеток обнаруживается только один слой зрелых ядер, не включивших BrdU. Площадь поверхности, занимаемая отдельной группой новообразованных клеток, находится в пределах от 200 до 800 мкм², что составляет 1–3 % от площади всей поверхности первичной обонятельной складки. На разных препаратах в отдельных лепестках обонятельной розетки обычно выявляется от двух до семи или немногим более таких образований. Обнаруженные домены из молодых клеток обычно располагаются друг от друга на равноудаленном расстоянии (20–40 мкм), формируя в наружном слое эпителия более-менее упорядоченный мозаичный рисунок (**рис. 65–67**). Каким образом синхронно по всему объему эпителия в его поверхностном слое могут возникать такие компактные группы из новообразованных клеток? Известно, что прогениторные клетки – предшественники всех клеточных элементов располагаются в самом нижнем слое эпителия – на базальной мембране [Iwai *et al.*, 2008]. Наши цитохимические данные показывают, что молодые клеточные элементы, возникшие после деления исходной материнской клетки, перемещаются

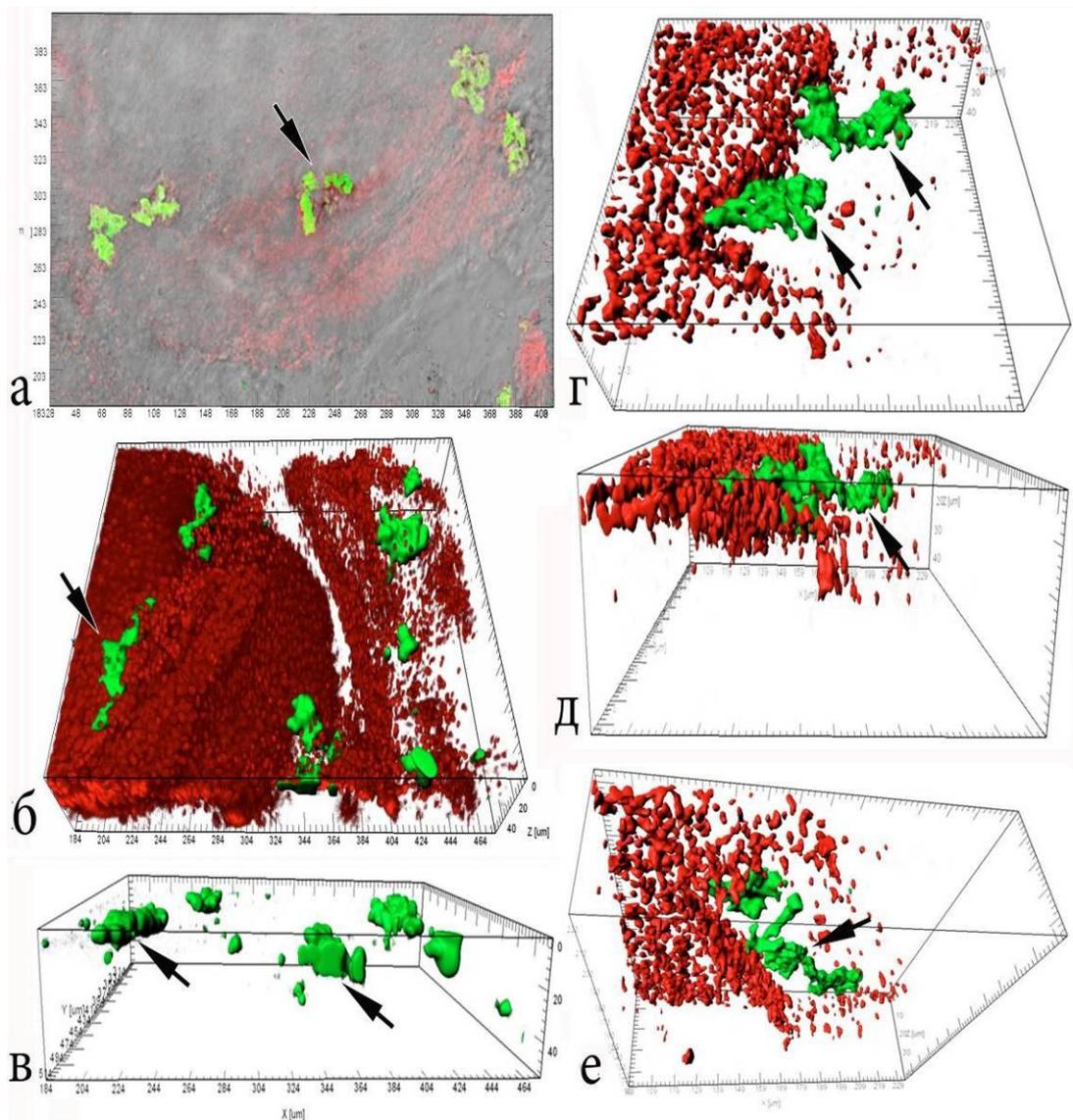


Рисунок 65. Новообразованные клетки, компактно расположенные в виде доменов (показаны стрелками) в поверхностном слое обонятельного эпителия у гурми через 36 часов после инъекции BrdU. Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый); неделящиеся ядра клеток окрашены аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А – тотальный препарат отдельной складки обонятельной розетки (просвечивающий режим); б – мозаично расположенные домены в составе двух рядом расположенных обонятельных складок; в – профиль фото "б" в зеленом канале; г, д, е – два отдельных домена, изображенные в разных ракурсах: г – вид сверху, д – вид в профиль; е – вид на группы незрелых клеток со стороны базальной мембраны.

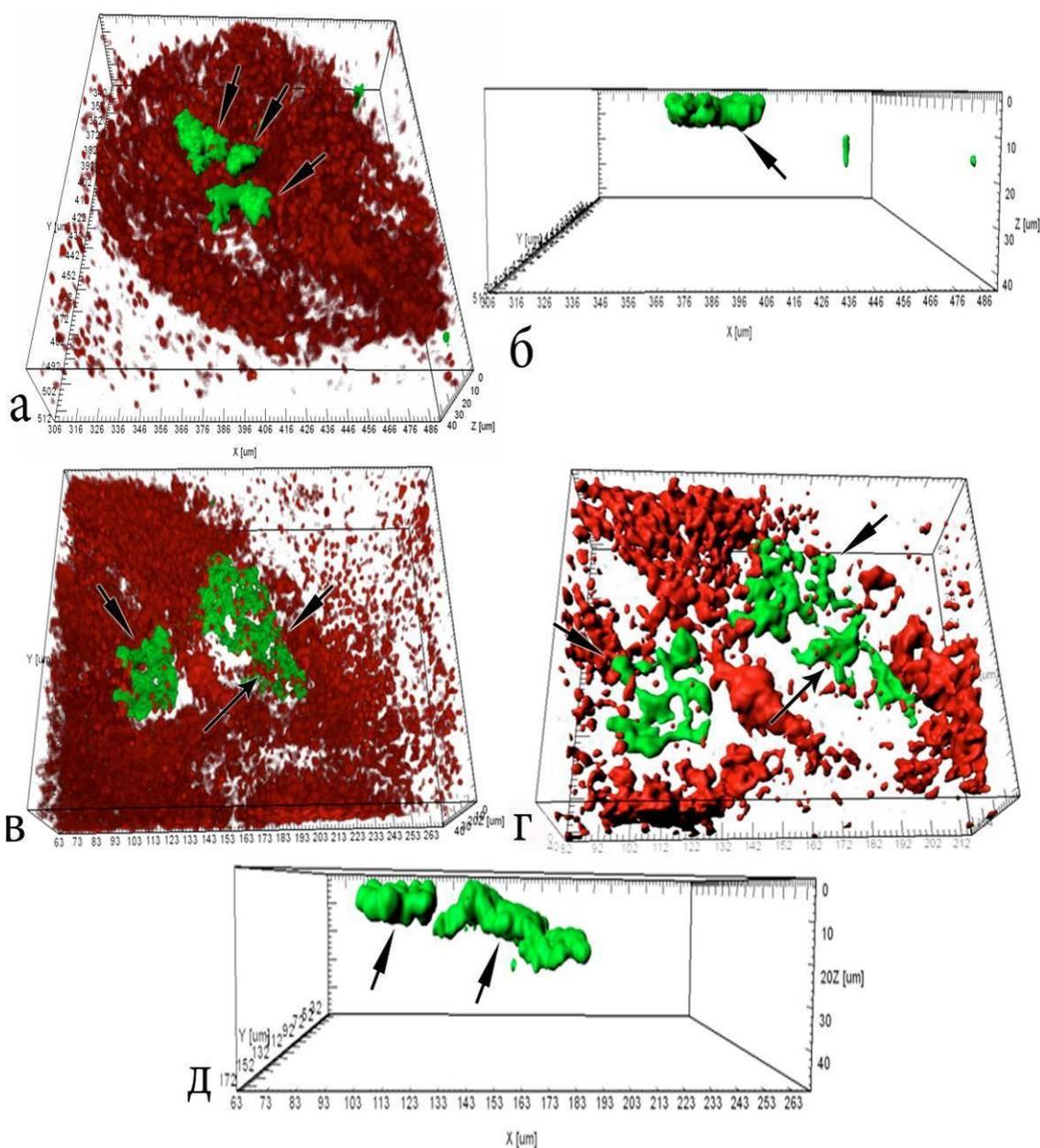


Рисунок 66. Отдельные домены (показаны стрелками), сформированные из молодых клеток в поверхностном слое эпителия у гурами через 36 часов после инъекции BrdU. Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый); неделящиеся ядра клеток окрашены 7 – аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А – отдельная складка обонятельной розетки; б – профиль доменов (фото "а" в зеленом канале); в – ядра клеток, не включивших метку (показаны тонкими стрелками), локализованные над скоплением пролиферативно активных клеток; г – увеличенное фото "в"; д – особенности расположения доменов в толще эпителия (профиль из фото "г" в зеленом канале).

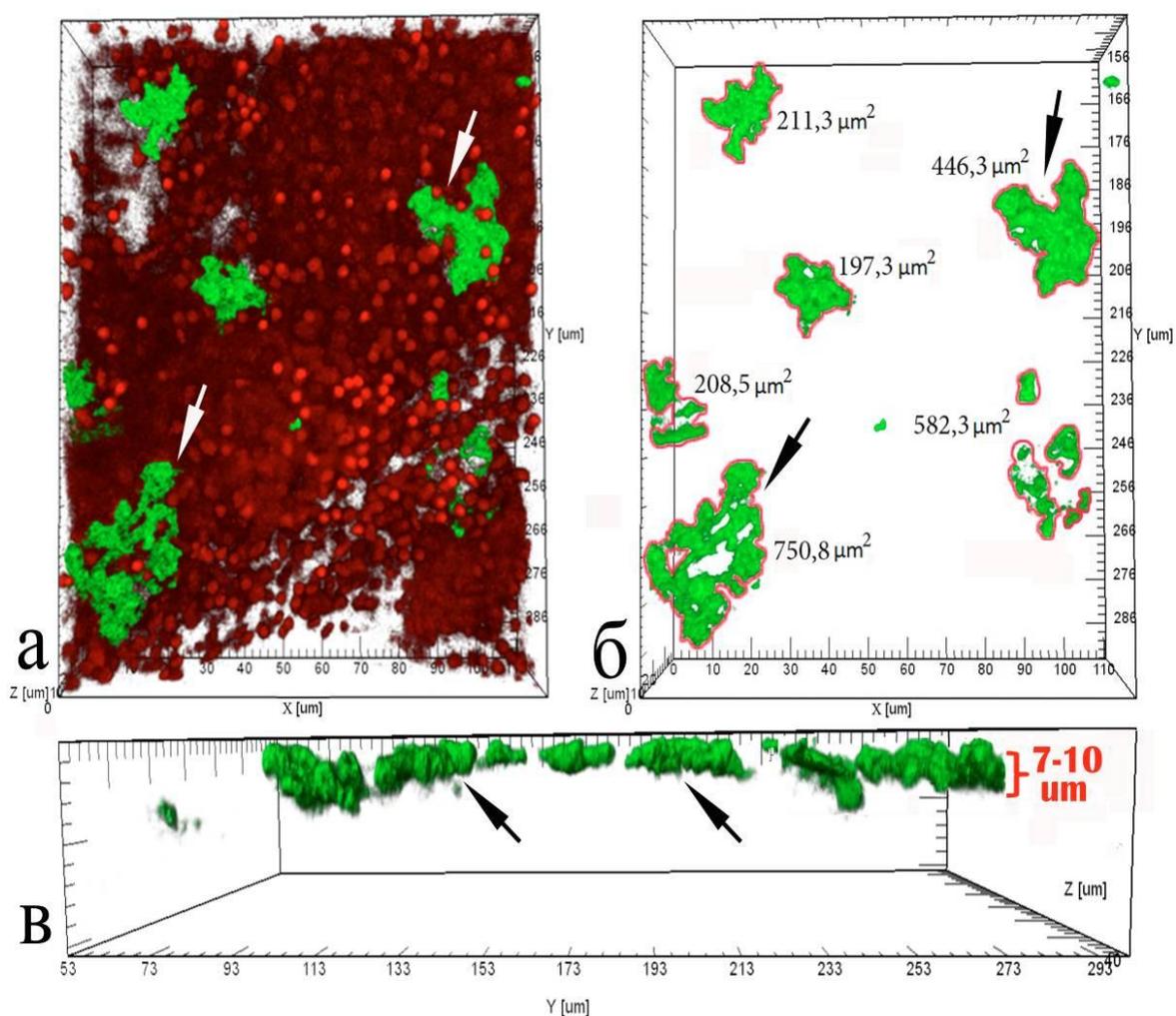


Рисунок 67. Мозаичное распределение доменов (показаны стрелками), образованных молодыми клетками в поверхностном слое эпителия у гурами через 36 часов после инъекции BrdU. Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый); неделящиеся ядра клеток окрашены 7 – аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А – участок отдельной складки обонятельной розетки; б – отдельные домены (фото "а" в зеленом канале) с обозначением их площади в мкм²; в – профиль доменов в апикальных отделах эпителия.

в верхние отделы эпителия, где они объединяются, формируя отдельные локусы. Возможно, что при этом они замещают аналогичный по объему кластер клеток, закончивших свой жизненный цикл. Судя по высокой концентрации маркированных клеток в таких пространственно ограниченных локусах эпителия, можно предположить, что каждый из них является

результатом пролиферации одной, или нескольких клеток-предшественниц. После встраивания молодых клеток в апикальный отдел эпителия они устанавливают друг с другом и с расположенными там клетками прочные плотные контакты и уже не мигрируют в другие участки эпителия. Обнаруженный нами способ регенерации клеток путем замещения сразу целых групп близко расположенных клеток по всей площади эпителия свидетельствует о высокой степени упорядоченности процессов нейрогенеза. В связи с этим, возникает два вопроса: какова специфичность рецепторных клеток, входящих в состав этих доменов? Может ли такая мозаичная организация эпителия каким-то образом обеспечивать структурирование первичных процессов восприятия сложных запахов?

Известно, что в ходе дифференцировки рецепторных клеток в каждой из них из всего мультигенного семейства происходит отбор только одного гена, кодирующего одорант-связывающие рецепторы. В связи с тем, что локализованные в таких кластерах рецепторные клетки являются потомками одной (или нескольких) клеток-предшественниц, можно предположить, что они могут экспрессировать белки-рецепторы с одной (или несколькими) вариантами специфичности. С другой стороны, в соответствии с обсуждаемым в последнее время стохастическим принципом экспрессии одорант-связывающих рецепторов [Serizawa *et al.*, 2003; Mombaerts, 2004; Shykind, 2005; Clowney *et al.*, 2011; Magklara *et al.*, 2011; Magklara, Lomvardas, 2013] нельзя исключать того, что обонятельные клетки, входящие в составе таких локальных доменов, могут приобретать разную специфичность к запахам. Независимо от этих двух вариантов развития, наши данные показывают, что такие четко структурированные образования, состоящие из новообразованных опорных и рецепторных клеток, возникают в одном интервале времени, синхронизированы относительно начала их жизненного цикла и вероятно могут стабильно функционировать в качестве отдельных функциональных единиц.

Полученные результаты могут быть важны в связи с обсуждаемым в последнее время вопросом о возможности существования пространственного кода восприятия запахов, который может существовать на уровне сенсорного отдела обонятельной системы. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что у млекопитающих обонятельный эпителий демонстрирует топографическую зональность в экспрессии молекулярных рецепторов к одорантам: клетки с одинаковой чувствительностью формируют отдельные, пространственно разграниченные зоны [Buck, 1996; Mori *et al.*, 2006; Arzi, Sobel, 2011]. Наличие фиксированной топографической карты в экспрессии обонятельных рецепторов выявлено также в хемочувствительных антеннах у насекомых [Vosshall *et al.*, 1999]. Электрофизиологические [Thommesen, 1982] и молекулярно-генетические исследования [Weth *et al.*, 1996; Bayramli *et al.*, 2017] указывают на существование подобных паттернов хемочувствительности и в обонятельных складках у рыб. Кроме того, известно, что аксоны рецепторных клеток со сходной чувствительностью поступают в одну специализированную структуру – гломерулу ОЛ, где осуществляется первичный анализ химических сигналов [Buck, 1996; Mori, Yoshihara, 1995; Vassar *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 2006]. Все эти данные говорят о том, что как в ОЛ, так и на уровне периферического отдела сенсорного аппарата, прослеживается определенная структурированность в пространственном кодировании запахов. В рамках обсуждаемого вопроса наши данные указывают на то, что в ходе нейрогенеза в ольфакторном эпителии исследованных рыб также формируются пространственно разграниченные домены, которые возникают в ходе конститутивного нейрогенеза и состоят только из новообразованных клеток. Сейчас мы не можем охарактеризовать спектр специфичности нейронов, входящих в состав таких компактных групп молодых клеток. Для решения этой задачи было бы целесообразно *совместно* использовать методы регистрации пролиферативной активности с методами *in situ* гибридизации, выявляющей экспрессию обонятельных рецепторов. Это позволило бы соотнести карту

экспрессии рецепторов с местами локализации локусов эпителия с молодыми рецепторными клетками. Не располагая такими данными, тем не менее, на наших препаратах мы видим, что домены, состоящие только из новообразованных рецепторных и опорных клеток, формируют в эпителии характерный мозаичный рисунок. Не исключено, что такой принцип их чередования с группами более зрелых клеток каким-то образом формирует топографическую карту восприятия одорантов и может быть вовлечен в обеспечение комбинаторного принципа [Buck, Axel, 1991] их идентификации.

5.8 Оценка пролиферативной активности клеток в обонятельном эпителии рыб после их длительной одорантной стимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов

Каменная широколобка. Цитохимические исследования показывают, что в результате продолжительной одорантной стимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов в обонятельном аппарате рыб на фоне нейродегенеративных изменений обнаруживается значительное (в 3,4 раза; $p_u \leq 0,05$) усиление процессов нейрогенеза (**рис. 68**). Наиболее ранним показателем активации деления клеток является появление в базальных отделах эпителия многочисленных кластеров, состоящих из 2–3 меченых BrdU клеток (**рис. 69, а, б**). Такие мелкие группы клеток распространены над базальной мембраной практически по всей площади обонятельной складки. Усиление пролиферативной активности в этом слое эпителия обусловлено тем, что здесь локализуются стволовые клетки. Кроме того, в сравнении с контролем, в толще эпителия наблюдается значительное (в 7,8 раза; $p_u \leq 0,05$)

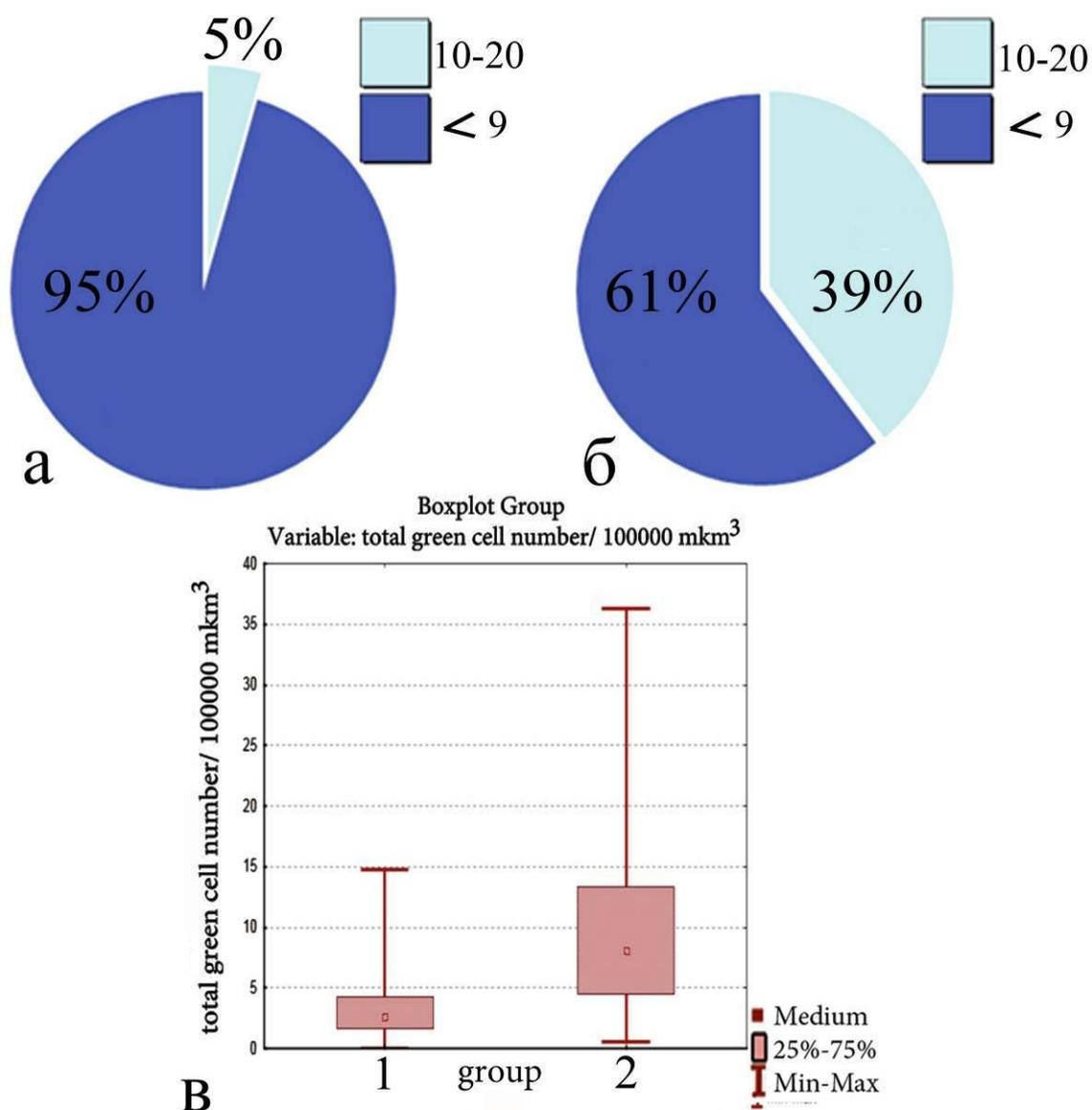


Рисунок 68. Сравнительная оценка процессов нейрогенеза в обонятельной розетке у каменной широколобки в контроле (а) и после длительной хемотимуляции нетосичной смесью аминокислот и пептидов (б). В контроле на мелкие (<10 клеток) кластеры клеток приходится 95 % объема эпителия. В эксперименте происходит возрастание объема зон эпителия, в котором локализуются крупные (10–20 клеток) кластеры клеток, включивших метку; в – график, отражающий усиление процессов нейрогенеза: 1 – контроль; 2 – эксперимент ($p < 0,001$); график построен по данным количественного анализа Z-стеков (конфокальная микроскопия). $*p_u \leq 0,05$ в сравнении с контролем.

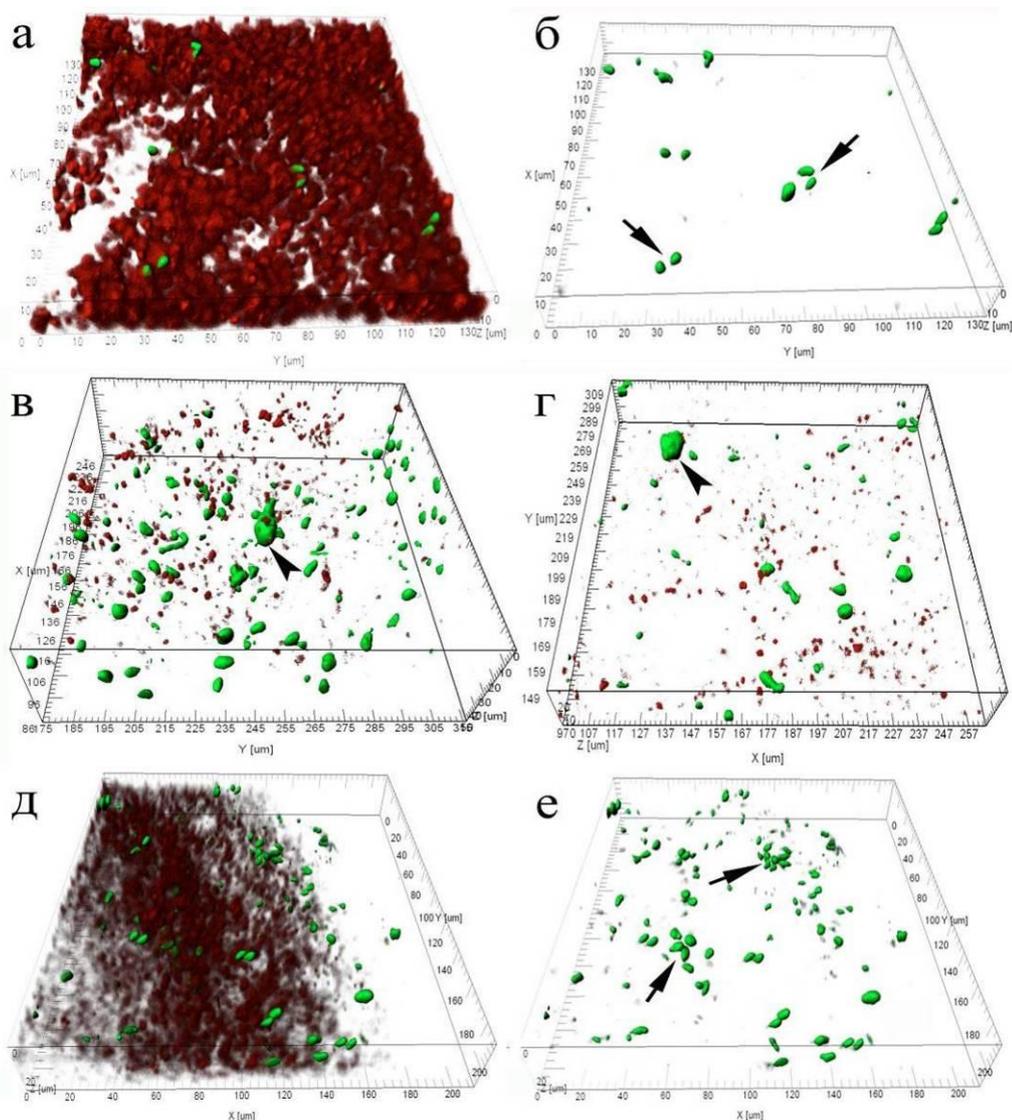


Рисунок 69. Активация процессов нейрогенеза в ольфакторном эпителии у каменной широколобки после продолжительной одорантной стимуляции (12 ч. инкубации BrdU). Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый). Неделящиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А, б – мелкие кластеры из клеток, включивших метку в базальных отделах эпителия; в–е – большое число делящихся клеток с более крупными агрегатами клеток (показаны стрелками) в толще ткани. Фигурными стрелками отмечены образования, состоящие из нескольких, недавно разделившихся клеток. А, в, г, д – в красном и зеленом каналах; б, е – в зеленом канале.

возрастание количества сегментов, состоящих из более крупных кластеров, состоящих из 10–20, включивших BrdU клеток (**рис. 69, в–е**). При этом происходит существенное (в 1,5 раза; $p_u \leq 0,05$) уменьшение объема, занимаемого новообразованными клетками, сгруппированными в мелкие (до 10 клеток) группы.

Места крупных сосредоточений молодых клеток, как правило, могут располагаться в различных участках эпителия (**рис. 70, а, б**), но чаще всего – по периферии обонятельной складки (**рис. 70, в, г; 71, 72**). Так, на **рис. 70 (в, г)** видно, как в краевой зоне обонятельного лепестка находится крупное скопление меченых клеток, объем которого составляет 5×10^5 мкм³. По подсчетам, здесь сосредоточено около 150–200 клеток, что на порядок больше, чем в более мелких кластерах, расположенных ближе к центральной части складки.

Могут ли вновь образованные клетки длительное время находиться в составе этих клеточных массивов, или далее каждая из них может мигрировать в другие отделы эпителия? Можно предположить, что клетки, локализованные в таких крупных кластерах, на протяжении последующих 24 часов будут претерпевать дальнейшую дифференцировку и далее войдут в состав отдельных функциональных единиц – доменов, о которых шла речь в разделе 5.7. Такие компактные образования из крупных скоплений молодых клеток мы выявляли у гурами через 36 часов инкубации с BrdU. У экспериментальных широколобок мы не проводили детальных исследований количества доменов, или каких-либо других их структурных перестроек через 36 часа инкубации с меткой. По нашему мнению, для получения этих данных целесообразно использовать других животных, обонятельный эпителий которых имеет большую площадь и стимул-зависимые изменения доменов в большем масштабе ткани могут быть более выраженными и удобными для проведения адекватного статистического анализа.

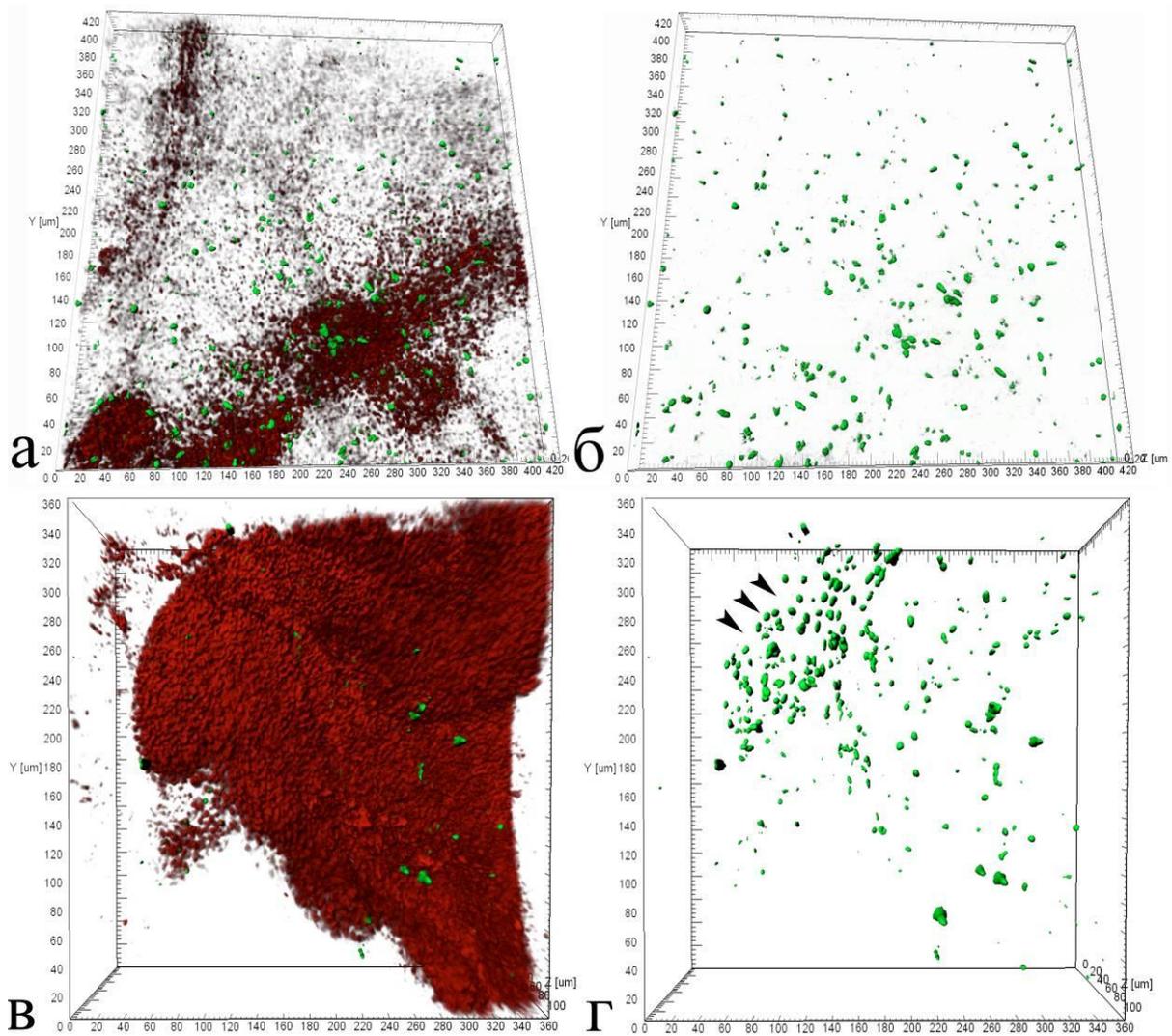


Рисунок 70. Увеличение числа новообразованных клеток в ольфакторном эпителии у каменной широколобки после длительной одорантной стимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов (12 ч. инкубации BrdU). Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый). Неделющиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. Стрелками отмечен участок краевой зоны обонятельной складки с повышенным числом молодых клеток. А, в – в красном и зеленом каналах; б, г – в зеленом канале; значительное увеличение числа молодых клеток.

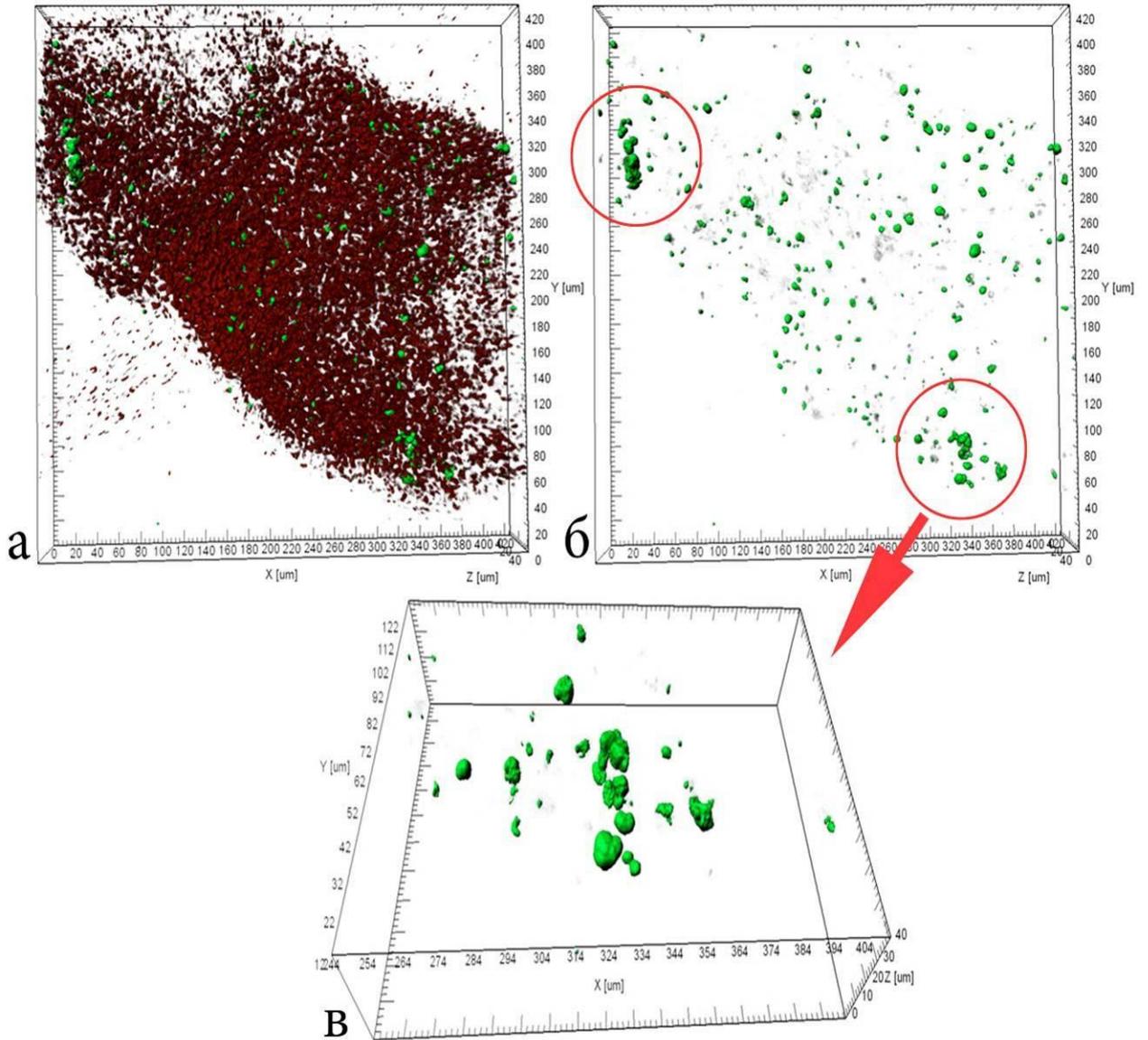


Рисунок 71. Краевые участки отдельного лепестка обонятельного эпителия каменной широколобки с повышенным уровнем нейрогенеза после интенсивной хемотимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов (12 ч. инкубации BrdU). Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый). Неделящиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А – в красном и зеленом каналах; б, в – в зеленом канале; значительное увеличение числа ядер новообразованных клеток. Выделены крупные кластеры клеток, включивших метку.

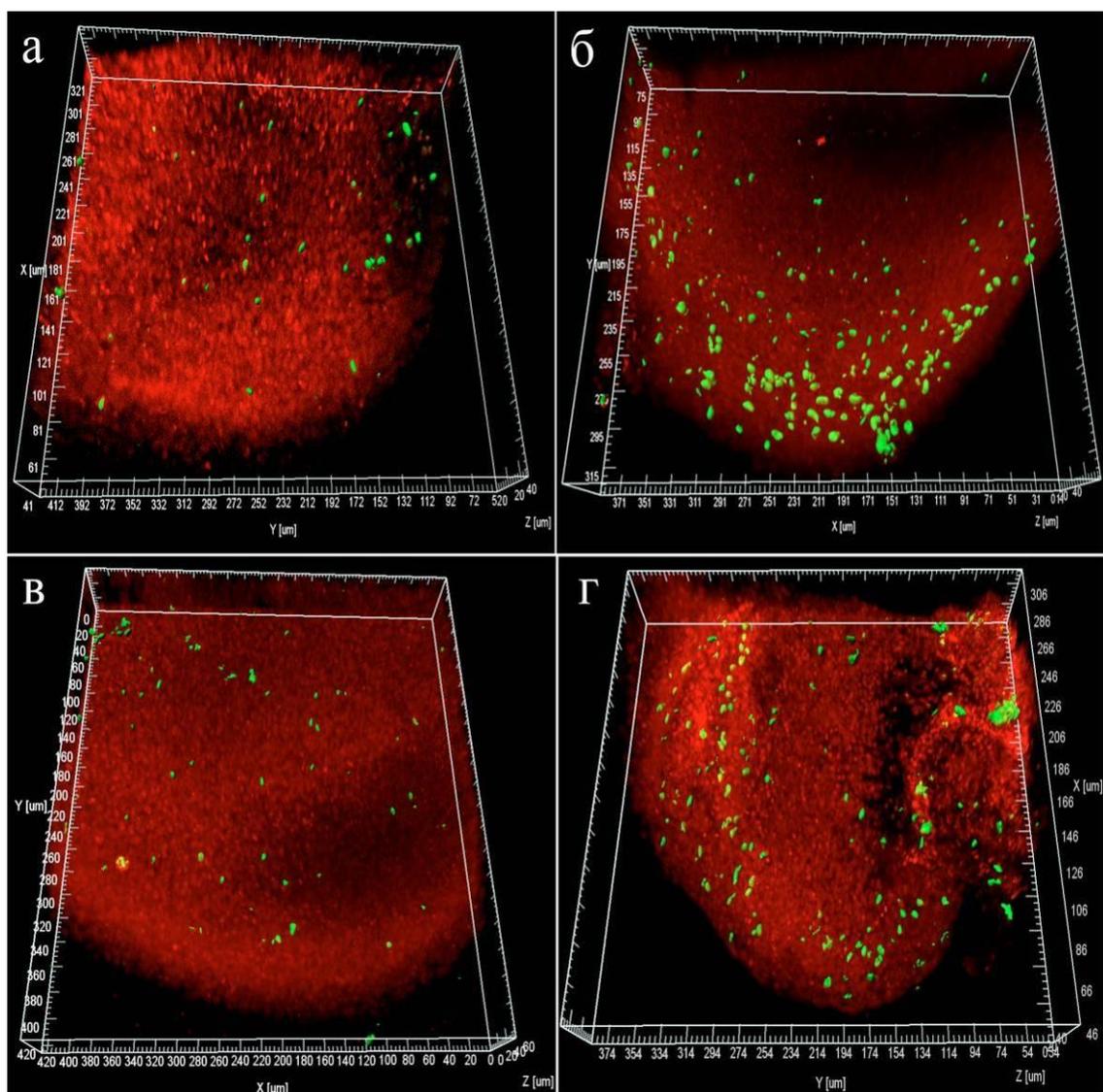


Рисунок 72. Эффект усиления процессов нейрогенеза в обонятельных складках у каменной широколобки после интенсивной хемотимуляции гетерогенной смесью аминокислот и пептидов (12 ч. инкубации BrdU). Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый). Неделющиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А, в – контроль; б, г – эксперимент; значительное увеличение числа ядер новообразованных клеток.

Жемчужный гурами.

После продолжительного одорантного воздействия в обонятельном эпителии у гурами также наблюдаются процессы активизации нейрогенеза. Причем, характер этих изменений аналогичен таковому у каменной широколобки. В толще ткани появляются крупные кластеры, состоящие из

повышенного числа (10–20) новообразованных клеток. Как и у каменной широколобки, по краям складок выявлялись отдельные, более многочисленные компактные скопления из молодых клеток (**рис. 73**). Причем, в 1,8 раза ($p_u \leq 0,05$) сокращался объем ткани с мелкими кластерами и в 3,1 ($p_u \leq 0,05$) раза возрастал объем, занимаемый крупными группами клеток (**рис. 74**). Как было показано выше, такая же тенденция в изменении соотношения активных и малоактивных зон пролиферации наблюдалась в эксперименте и у каменной широколобки.

Сравнительная оценка количества BrdU-позитивных клеток на единицу объема нейроэпителлия показывает, что у стимулированных пептидной смесью рыб интенсивность деления клеток существенно увеличивается и превышает таковую в контроле у каменной широколобки в 2,6 ($p_u \leq 0,005$), а у жемчужного гурами – в 3,2 раза ($p_u \leq 0,005$). Эти данные свидетельствуют о том, что в ходе усиленной запаховой стимуляции и последующих дегенеративных изменений в процессы нейрогенеза вовлекаются новые прогениторные клетки, расположенные в ранее пролиферативно неактивных сегментах эпителия.

Суммируя морфологические данные, полученные на разных видах рыб, можно заключить, что процессы нейрогенеза в ольфакторном эпителии гидробионтов могут быть активированы не только после аксотомии обонятельного нерва [Schwob, 2002], бульбэктомии [Makino *et al.*, 2009], или острых токсических воздействий [Schwob *et al.*, 1995; Frontera *et al.*, 2016] но и после пролонгированного воздействия нетоксичными пахучими веществами. Продолжительная одорантная стимуляция рецепторных клеток вызывает их апоптоз и последующую активацию регенеративных процессов. Таким образом, экспериментальные результаты, полученные методами световой, электронной и конфокальной микроскопии позволяют сделать вывод о том, что длительная хемотимуляция рыб нетоксичными водорастворимыми веществами вызывает не только избирательную

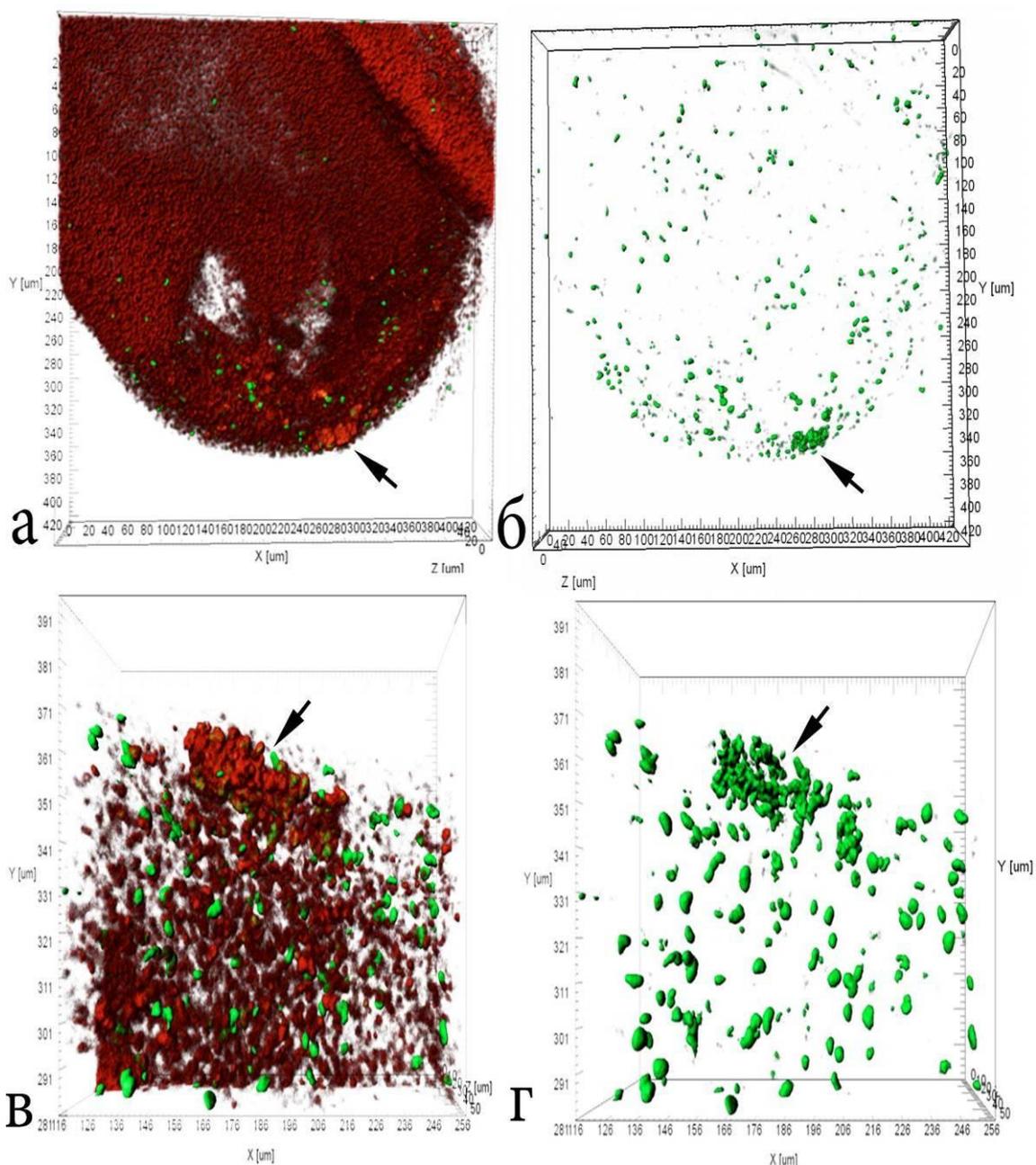


Рисунок 73. Отдельная складка обонятельного эпителия у жемчужного гурами с повышенным уровнем нейрогенеза после продолжительной одорантной стимуляции смесью аминокислот и пептидов (12 ч. инкубации BrdU). В краевой зоне локализуется крупный кластер новообразованных клеток (отмечен стрелкой). В толще ткани выявляется повышенное число молодых клеток. Избирательная окраска ядер клеток, включивших BrdU, с помощью антител, меченых FITC к BrdU (зеленый). Неделющиеся ядра клеток окрашены 7-аминоактиномицином (красный); конфокальная микроскопия; 3D-реконструкции. А, в – в красном и зеленом каналах; б, г – в зеленом канале; значительное увеличение числа молодых клеток.

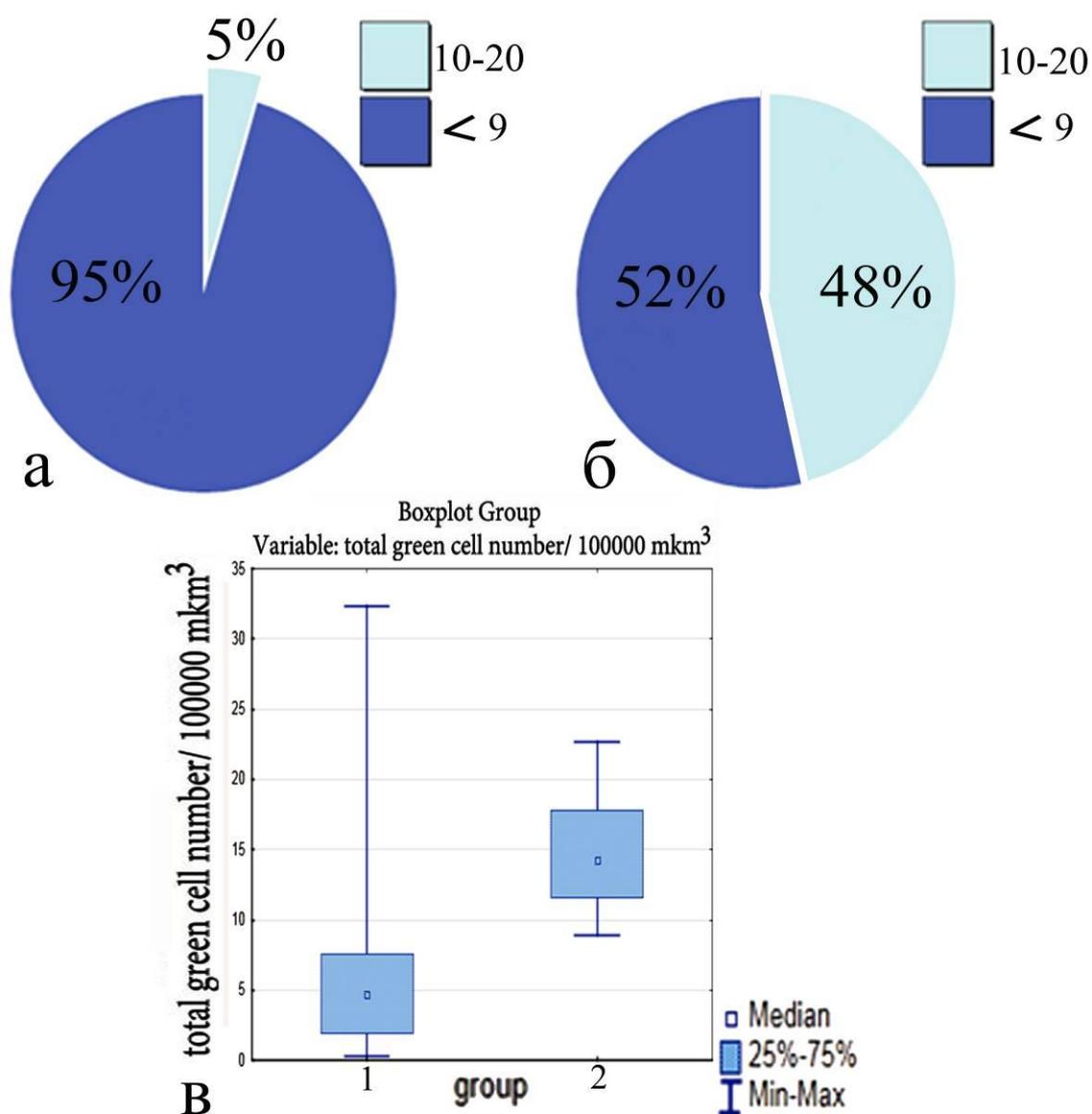


Рисунок 74. Сравнительная оценка процессов нейрогенеза в обонятельной розетке у жемчужного гурами в контроле (а) и после длительной хемотимуляции нетоксичной смесью аминокислот и пептидов (б). В контроле на мелкие (<10 клеток) кластеры клеток приходится 95 % объема эпителия. В эксперименте происходит возрастание объема зон эпителия, в которых локализуются крупные (10–20 клеток) кластеры клеток, включивших метку; в – график, отражающий усиление процессов нейрогенеза: 1 – контроль; 2 – эксперимент ($p < 0,001$); график построен по данным количественного анализа Z-стеков (конфокальная микроскопия). * $p_{u} \leq 0,05$ в сравнении с контролем.

дифференцировку и гибель отдельных клеток периферического отдела обонятельного анализатора, но и активизирует компенсаторные процессы их нейрогенеза. Это говорит о том, что при избыточном характере воздействия даже нетоксичные одоранты способны вызывать в сенсорном отделе анализатора, как дегенеративные изменения, так и компенсаторные процессы восстановления исходного уровня его работы. Кроме того, важность полученных результатов состоит в том, что выявленный нами способ неинвазивного усиления процессов нейрогенеза в обонятельном эпителии с помощью химически нейтральных запахов может найти применение в медицине для его терапевтического использования при травматических повреждениях и дегенеративных заболеваниях центральной и периферической нервной системы человека.

5.9 Прикладные аспекты использования методов активизации процессов нейрогенеза в обонятельном эпителии

Нейротрансплантация является одним из перспективных подходов для лечения различных органических поражений головного и спинного мозга [Im, Moon, 2015]. При этом, одной из основных проблем является поиск оптимальных источников стволовых и других малодифференцированных нейральных клеток, необходимых для их использования в трансплантации при восстановительной терапии. Для решения этих задач в настоящее время предпринимаются попытки использовать плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки, обладающие большим пролиферативным потенциалом [Shamblott, 1998; Thomson, 1998], индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, получаемые из клеток различных тканей [Leung *et al.*, 2007], а также другие источники и технологии их получения. Однако создание тканевого трансплантата с заданными свойствами сталкивается со многими трудностями, включая проблемы этического характера. Особенно это касается использования эмбрионального материала. Другая, не менее

важная проблема – отдалённые последствия переживания и интеграции трансплантированных клеток в новом, как правило, генетически чужеродном микроокружении. Острота этого вопроса во многом определяется проблемой иммунологической совместимости и потенциальным риском формирования различных новообразований из трансплантата [Shihabuddin, Cheng, 2011]. Исследования последнего десятилетия показывают, что некоторые из этих проблем могут быть преодолены при использовании обонятельного эпителия, который является доступным источником аутологических нейтральных стволовых, и других малодифференцированных клеток [Pendleton, 2011; Maskay-Sim, 2013]. Искусственное получение клеточных культур на основе ольфакторной выстилки с необходимой пролиферативной активностью и потенциалом к образованию различных типов клеток становится важной задачей нейробиологии и восстановительной медицины. В связи с этим, в настоящее время активно ведутся работы по выявлению ключевых факторов роста, которые могут в культуре диссоциированных обонятельных клеток активизировать процессы их пролиферации и дифференцировки [Gong, *et al.*, 2012]. Что касается поиска способов повышения пула стволовых и других бластных нейтральных клеток в самом хеморецепторном эпителии, то, как говорилось выше, к настоящему времени утвердилось мнение о том, что активировать процессы нейрогенеза *in vivo* можно только в результате экстремальных воздействий на обонятельную систему – после аксотомии обонятельного нерва, бульбэктомии или острых токсических воздействий. Это делает неприемлемым использование данных подходов для усиления пролиферативных свойств клеток в обонятельном биоптате у человека. Вопреки сложившимся представлениям, наши исследования свидетельствуют о том, что длительная хемостимуляция эпителия слабоконцентрированной нетоксичной водорастворимой смесью аминокислот и пептидов вызывает очаговое стрессирование хемочувствительных клеток, их апоптоз и компенсаторное усиление процессов нейрогенеза [Клименков и др., 2011; Клименков и др., 2014].

Таким образом, используемый подход позволяет уже *in vivo* (в аутологическом донорском материале) формировать более обогащенный пул малодифференцированных нейральных клеток, который может иметь повышенный потенциал для дальнейшего культивирования и использования в медицине.

Эти данные определяют необходимость дальнейших исследований адаптивной стимул-зависимой дифференцировки и нейрогенеза клеточных элементов ольфакторного эпителия у животных на разных сроках их стимуляции запахами нетоксичной природы. Полученные результаты создают предпосылки для разработки неинвазивных способов повышения пролиферативного потенциала аутологического биопсийного материала с увеличенным содержанием малодифференцированных нейральных клеток для их культивирования и последующего использования в восстановительной терапии болезней нервной системы.

Есть и другой аспект целесообразности создания технологий, с помощью которых можно было бы активизировать процессы нейрогенеза в обонятельном эпителии человека. Известно, что деменция (нарушение высших функций мозга), как правило, с возрастом, в результате травмы, или действия других факторов сопровождается снижением количества рецепторных клеток, обонятельной дисфункцией и ведет к дезадаптации человека [Doty, 2012; Godoy *et al.*, 2015]. Предлагаемый нами метод усиления процессов нейрогенеза может приводить к существенному обновлению популяций рецепторных клеток и возрастанию хемочувствительности на уровне периферического отдела ольфакторной системы. Возможно, что возросший из внешней среды сенсорный приток запахов каким-то образом может положительно воздействовать на центральные структуры мозга, с которыми обонятельные клетки связаны с помощью аксонов. Таким образом, данный метод может быть апробирован для лечения нейродегенеративных заболеваний, которые сопровождаются снижением обонятельного восприятия.

5.10 Цитохимические особенности дифференцировки рецепторных клеток и их миграции в обонятельном эпителии

В последнее время появляется много сведений о важной роли элементов цитоскелета в обеспечении адаптивных перестроек клеток различного типа. При этом, наряду с филаментами тубулиновой природы, наиболее динамичным компонентом цитоскелета является также система актиновых микрофиламентов. Показана их важная роль в миграции клеток, в удлинении их отростков, транспорте органелл, макромолекул, а также в латеральном перемещении и перегруппировке молекул адгезии и рецепторов плазматической мембраны [Blanchoin *et al.*, 2014; de la Roche *et al.*, 2016; Mattila *et al.*, 2016; Sudakov *et al.*, 2017]. Известно, что актин вместе с другими компонентами цитоскелета принимает непосредственное участие и в процессах клеточной дифференцировки нейронов центральной нервной системы [Kessels *et al.*, 2010; Pacary *et al.*, 2013], в частности, в адаптивных перестройках дендритических шипиков и их рецепторов [Shirao, Gonzalez-Billault, 2013; Hlushchenko *et al.*, 2016].

Кроме того, данные о структурных перестройках актиновых микрофиламентов могут быть важны для сопоставления цитохимических перестроек развивающихся обонятельных нейронов с созреванием их рецепторной функции. Для определения стадий развития ольфакторных клеток используются различные внутриклеточные маркеры. Так, ранее показано [Wei *et al.*, 2013], что в эмбриогенезе у мышей кальций-связывающий белок калретинин временно экспрессируется в промежуточных клетках непосредственно перед тем, как нейроны становятся зрелыми и таким образом может использоваться в качестве индикатора незрелых клеток. В другом исследовании установлено, что у мышей одиночные ранние незрелые клетки выражают множественные полиспецифичные рецепторы, тогда как зрелые клетки показывают высокий уровень экспрессии преимущественно единичных рецепторов. При этом, экспрессия

ассоциированного с ростом клеток фосфопротеина GAP-43 в большей степени была выражена только у ранних незрелых клеток [Nanchate *et al.*, 2015]. Кроме вышеописанных индикаторов незрелых нейронов недавно показано, что у млекопитающих ионотрофный рецептор серотонина 5-HT_{3a} может быть использован как новый молекулярный маркер пролиферативной, либо более поздней фазы развития клеток [Finger *et al.*, 2017]. В отличие от мышей, у рыб до настоящего времени в качестве гистохимического антигена нейронов выявлен только GAP-43 [Bettini *et al.*, 2006]. Оказалось, что кальретинин, свойственный для незрелых клеток мышей, в обонятельном эпителии рыб окрашивает только зрелые нейроны и может в разной степени выявляться в ресничных, микровиллярных и крипт клетках [Germanà *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2008; Koide *et al.*, 2009; Gayoso *et al.*, 2011; Paskin *et al.*, 2011; Doldán *et al.*, 2011; Hentig *et al.*, 2016].

Таким образом, в литературе отсутствуют данные о потенциальной возможности использовать актин в качестве дополнительного маркера дифференцировки обонятельных нейронов при их миграции и дальнейшем созревании. Эти сведения могут быть необходимы для выявления механизмов, обеспечивающих созревание рецепторных клеток в процессе формирования адаптивной чувствительности животных к одорантам внешней среды.

В связи с обсуждаемой проблемой на эндемичном представителе ихтиофауны озера Байкал – длиннокрылой широколобке (*Cottoidei*) – мы исследовали участие актиновых микрофиламентов в миграции молодых обонятельных клеток и в их дальнейшей дифференцировке после встраивания терминалей дендритов в поверхность эпителия [Klimenkov *et al.*, 2018].

5.11 Структурные особенности незрелых обонятельных нейронов, дендриты которых еще не взаимодействуют с внешней средой

Анализ препаратов, окрашенных на ядерный материал и F-актин, показывает, что отдельные дочерние клетки, возникшие после деления базальных клеток-прогениторов, по мере их роста и передвижения по направлению к поверхности эпителия приобретают морфологические признаки развивающихся нейронов. Так, в молодых клетках, которые еще не взаимодействуют с поверхностью эпителия, актиновые микрофиламенты очень хорошо выявляются в примембранных участках дендритов на всем их протяжении. Ширина примембранного плотного слоя F-актина в таких дендритных отростках составляет 0,3–0,4 мкм. Благодаря этому они приобретают контуры дендритов жгутиковых и микровиллярных клеток, которые мы наблюдали в эпителии у длиннокрылой широколобки с помощью трансмиссионной микроскопии (рис. 75, а, б). На рис. 75, «в» приведены многочисленные дендриты, терминалы которых еще находятся в толще эпителия и не связаны с внешней средой. О том, что дендриты не контактируют с поверхностью эпителия, можно судить по отсутствию в Z-стеках характерной ячеистой структуры, свойственной для апикальных отделов эпителия (рис. 21–24). Нужно отметить, что в эту фазу развития форма дендрита несколько отличается от его обычных параметров, свойственных для взрослых нейронов [Morrison, Costanzo, 1992]. Как и у других видов животных, у зрелых клеток он обычно имеет более широкий профиль в месте отхождения от приядерной области клетки и далее, сужаясь, вытягивается через толщу эпителия до его поверхности, где формирует обонятельную булаву. В отличие от этого, у молодых растущих клеток он больше напоминает трубку с более–менее одинаковым диаметром (3–3,5 мкм) его внутреннего пространства на всем его протяжении. Длина дендрита у таких клеток в среднем составляет от 4 до 9 мкм.

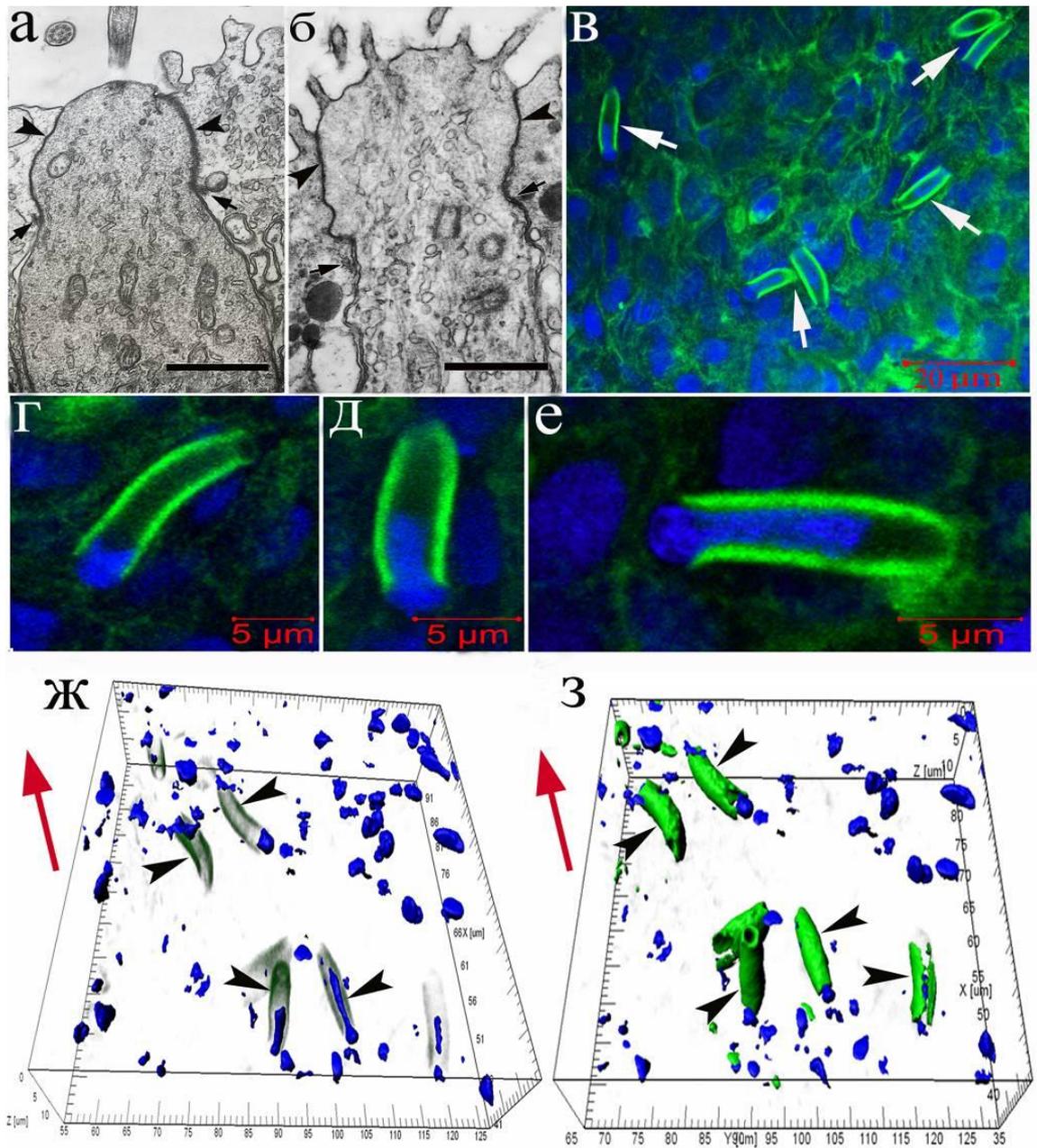


Рисунок 75. Структурные особенности морфологически зрелых и развивающихся обонятельных рецепторных клеток у *C. inermis*; окраска на актин (фаллоидин-ФИТС, зеленый) и ядра (DAPI, синий); конфокальная микроскопия. А – вершина клетки жгутикового типа; б – вершина микровиллярной клетки (тэм); большие стрелки указывают на плотные контакты; маленькие – на адгезивные контакты; в – несколько дендритов развивающихся нейронов с высоким содержанием примембранного F-актина (отмечены белыми стрелками) и ядерным материалом, в разной степени погруженном во внутреннее пространство дендрита (г–е) 2D-срезы; ж, з – несколько молодых клеток с ядерным материалом, находящимся внутри дендрита с разной степенью фильтрации зеленого флуоресцентного сигнала (3D – реконструкции). Красные стрелки направлены к поверхности эпителия. Масштаб – 1 мкм (а, б).

Формирование примембранного цитоскелета не является единственным приспособлением растущих нейронов для их миграции от базальной мембраны в верхние слои эпителия. Процесс проникновения молодых нейронов между находящимися на их пути клетками сопровождается реорганизацией ядерного материала. Пространственная реконструкция оптических срезов незрелых обонятельных клеток показывает, что в процессе транспортировки их ядра (самая крупная по объему органелла нейрона) приобретают удлинненную форму и основная их часть перемещается внутрь актинового "футляра" дендритов. На препаратах хорошо видно, что внутри эпителия выявляются различным образом ориентированные профили дендритов, внутри которых располагается значительная доля ядерного вещества клеток (**рис. 75, в**). Причем, сама морфология отростков, их длина, диаметр внутреннего просвета и ширина актинового слоя у разных нейронов не показывают значительных колебаний. Более изменчива форма ядра, которое непосредственно взаимодействует с проксимальным участком дендрита. У некоторых молодых клеток ядро только вступает в контакт с нижним участком дендрита и еще сохраняет свойственную ему округлую форму (**рис. 75, г**). В других случаях, контактирующий с дендритом полюс ядра постепенно вытягивается, глубоко проникая в его внутреннее пространство (**рис. 75, д, е**). При этом 70–80 % ядерного вещества клетки оказывается локализованным внутри актинового цилиндра дендрита. Благодаря такому перераспределению ядерного материала тело обонятельной клетки напоминает известную форму бутерброда "сосиска в тесте" (**рис. 75, ж, з**). За его пределами обычно всегда остается только небольшой фрагмент ядра, диаметр которого соизмерим с внешним диаметром актинового слоя дендрита (**рис. 76, а**). 2 D изображение (**рис. 76, б**) и его ортогональные проекции (**рис. 76, б1, б2**) подтверждают положение о том, что основная масса ядерного материала локализуется внутри дендрита. Вероятно, это придает клетке более удобную форму для ее

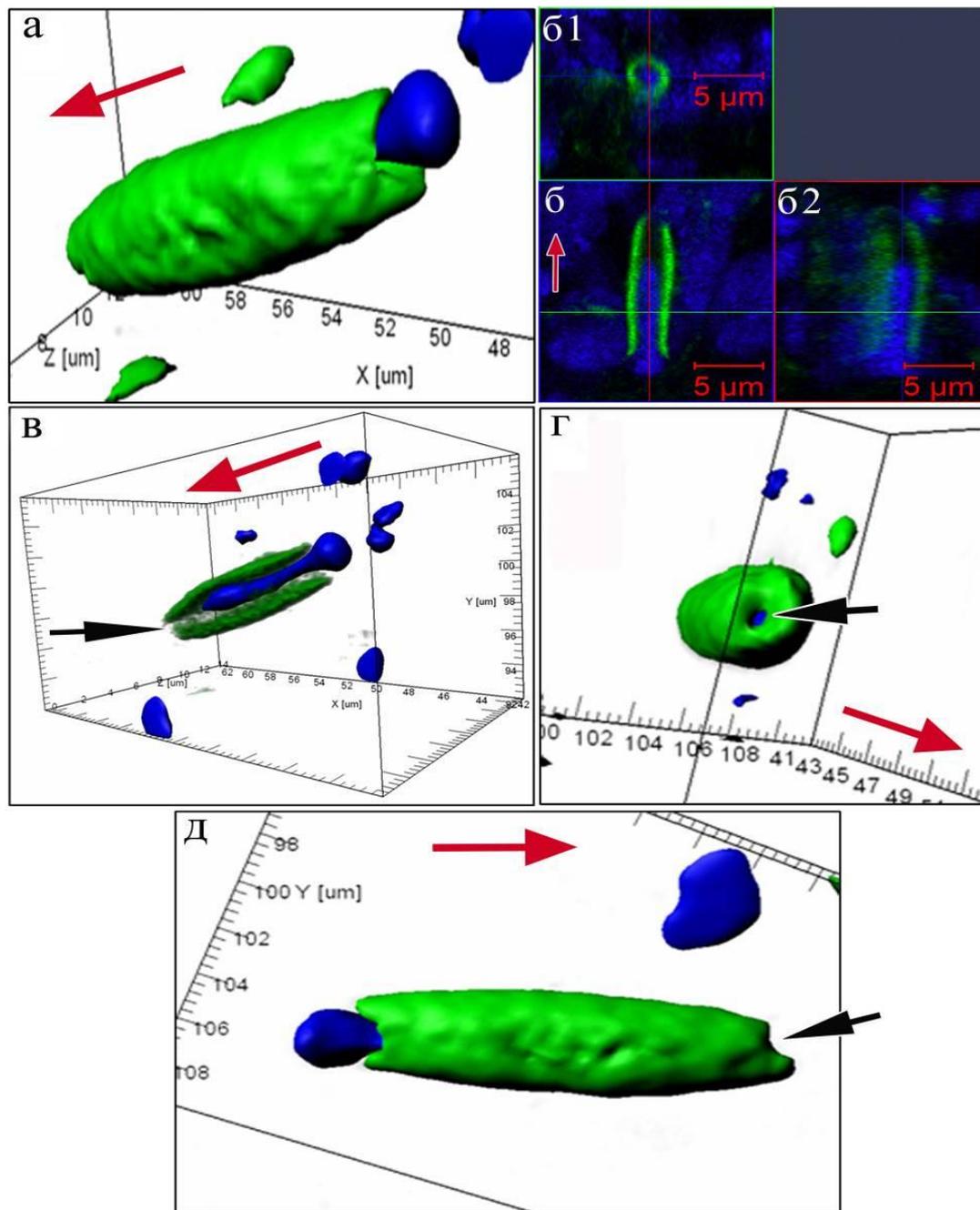


Рисунок 76. Специфическая организация тела незрелого нейрона в процессе его дифференцировки и миграции в обонятельном эпителии у *C. inermis*. Окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядра (DAPI, синий); конфокальная микроскопия. А – вытянутая форма дендрита с ядерным веществом внутри (3D-реконструкция); б – 2D-срез клетки и ее ортогональные проекции (б1, б2); в – продольный срез через дендрит; хорошо видно вытянутое ядро, локализованное в "чехле" из актиновых микрофиламентов (3-D- реконструкция); г – передняя часть дендрита без актина, где располагается конус роста (3-D- реконструкция); д – неровные контуры переднего участка дендрита, где находится конус роста (3D – реконструкция). Черной стрелкой отмечена локализация конуса роста; красная направлена к поверхности эпителия.

успешной транспортировки в толще эпителия. Характерно, что на этом этапе развития клеток конус роста дендрита не содержит актиновых микрофиламентов, так как к этому участку с помощью везикул доставляется и встраивается новый мембранный материал (рис. 76, в–д). На основании полученных данных можно предположить, что такая плотно упакованная сеть актиновых микрофиламентов, по-видимому, выполняет несколько функций. Во-первых, она ограничивает встраивание секреторных везикул только в зоне конуса роста дендрита и обеспечивает его удлинение; во-вторых, она придает жесткость дендриту, необходимую для перемещения клетки между телами других клеток эпителия. Кроме того, цитоскелет вероятно обеспечивает актин-зависимый перенос ядра во внутреннее пространство дендрита для защищенного транспорта нейрона между клетками по направлению к поверхности эпителия. Таким образом, в результате структурной трансформации морфо-функциональных отделов клетки ее передний отросток (дендрит) временно становится вместилищем для ядра клетки. Вероятно, приобретение клеткой специфической формы с проникновением ядерного материала внутрь актинового "чехла" дендрита придает ей более обтекаемую форму для успешной миграции в толще эпителия. В качестве функциональных аналогов выявленной нами организации «актинового чехла» можно привести актин, ассоциированный с TAN (transmembrane actin-associated nuclear lines) и perinuclear actin cap, которые принимают непосредственное участие в транспорте и позиционировании ядра в различных типах клеток *in vitro* [Luxton *et al.*, 2010; Maninová *et al.*, 2014]. Возможно, что в ходе такого переноса ядра могут быть вовлечены специализированные адаптерные белковые комплексы (LINC), связывающие ядерную оболочку с актиновыми микрофиламентами [Luxton *et al.*, 2010; Maninová *et al.*, 2014]. В этом процессе могут принимать участие также АТФ-зависимые моторные белки миозины, обеспечивающие транспорт данной органеллы в цитоплазме соматических клеток у многих организмов [Starr, 2007; Tamura *et al.*, 2013].

С помощью методов электронной цитохимии ранее не удавалось обнаруживать такие дендриты с хорошо представленным актиновым кортексом и ядерным веществом внутри. Тем не менее, на основании наших данных мы полагаем, что внутри дендрита, рядом с ядерным материалом в оставшемся свободным компактном пространстве локализуются также и другие ключевые компоненты клетки: эндоплазматический ретикулум, рибосомы, а также аппарат Гольджи, обеспечивающий формирование секреторных пузырьков, направляемых с помощью микротрубочек к конусу роста. Подтверждением важности данного компартмента дендрита является то, что с помощью конфокальной микроскопии над ядром внутри его осевого цилиндра нам удалось выявить функционально активные митохондрии (**рис. 77, а–в**). Это говорит о том, что у незрелого нейрона внутреннее содержимое дендрита поддерживает высокий уровень энергетического обмена, необходимого для роста и жизнедеятельности клетки в целом. Значительная часть митохондрий располагается также в области нижнего полюса ядра, находящегося за пределами дендрита, откуда берет свое начало растущий аксон (**рис. 77, г, д**).

Характерно, что аналогичные картины морфологической дифференцировки молодых нейронов с перемещением ядерного материала клетки внутрь уплотненного актином дендрита мы обнаружили также и у другого представителя рогатковидных рыб – у желтокрылки (**рис. 78**). На рисунке хорошо видно, что и у данного представителя *Cottoidei* в развивающихся обонятельных клетках основная масса ядра также располагается внутри дендрита. Не исключено, что такие структурные преобразования малодифференцированных нейральных клеток могут быть универсальными, и обеспечивают транспорт и позиционирование клеток не только в обонятельном эпителии. Возможно, что у высших животных в центральных структурах мозга – в гиппокампе и в стенках желудочков, где также осуществляются процессы нейрогенеза [Zhao *et al.*, 2008; Gonçalves *et*

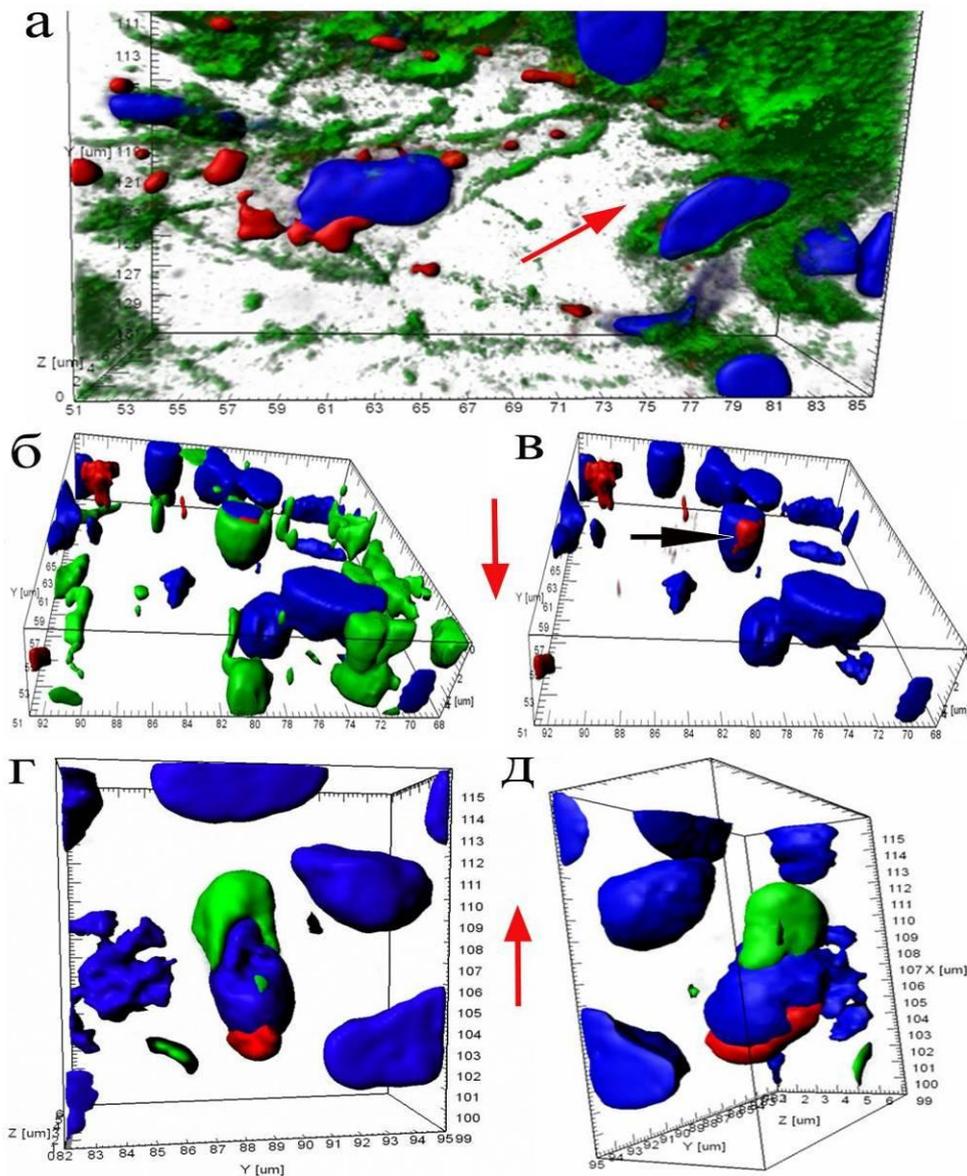


Рисунок 77. Приядерная зона молодых нейронов с растущими дендритами, обогащенными большим количеством актиновых микрофиламентов в обонятельном эпителии у *C. Inermis*; окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый), ядра (DAPI, синий) и митохондрии (MitoTracker®Red, красный); конфокальная микроскопия; 3D – реконструкции. А – продольный срез отдельного нейрона с функционально активными митохондриями, локализованными внутри "чехла" из актиновых микрофиламентов; б – митохондрии, примыкающие к ядру во внутреннем пространстве дендрита; в – фото "б" в синем и красном каналах; черной стрелкой показана митохондрия, примыкающая к ядру; г, д – разные ракурсы тела клетки с растущим дендритом; верхний участок ядра погружен внутрь дендрита; в нижнем полюсе ядра расположены митохондрии. Красная стрелка направлена к поверхности эпителия.

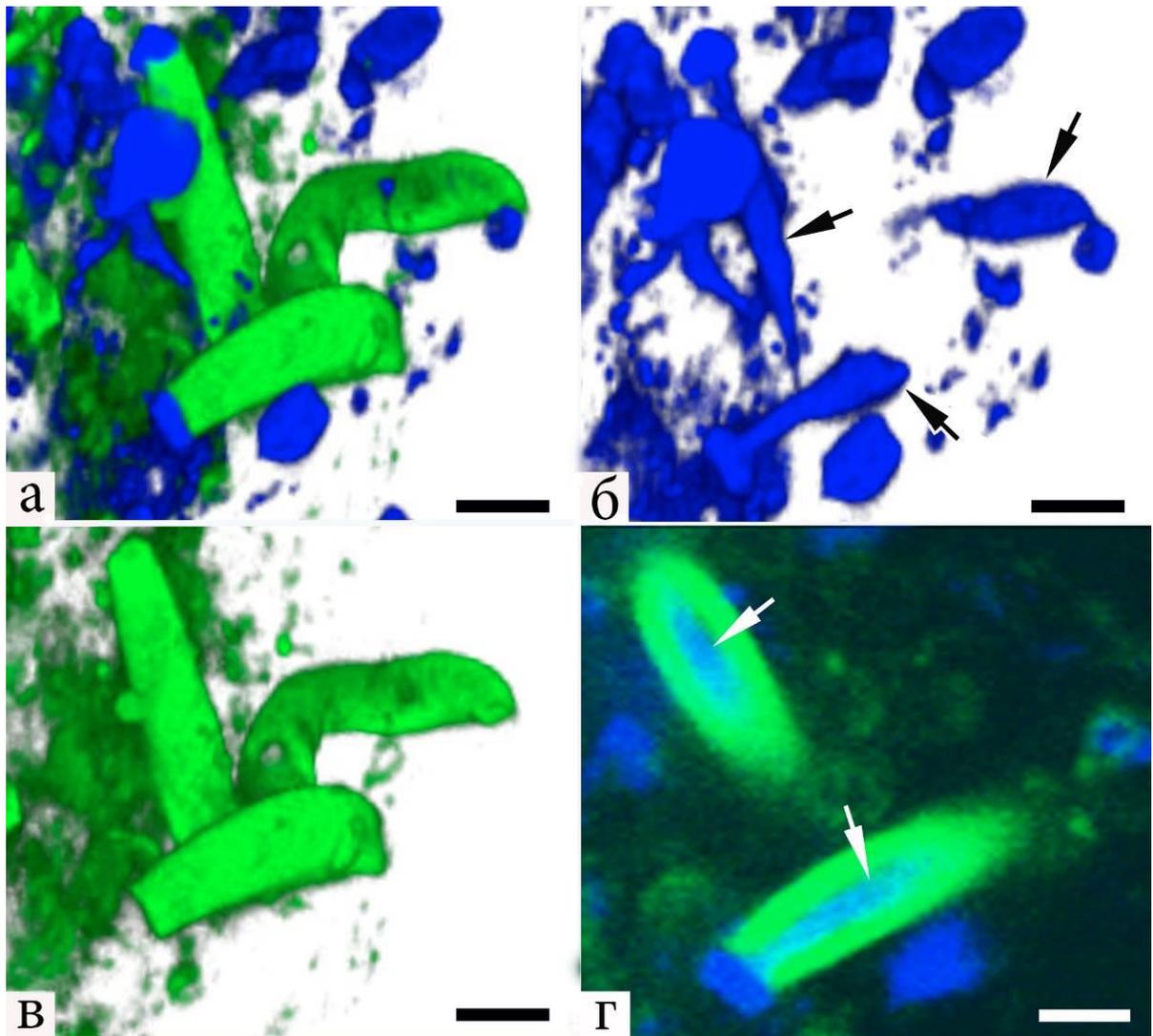


Рисунок 78. Растущие дендриты молодых рецепторных нейронов в обонятельном эпителии у желтокрылки. Окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядерный материал (DAPI, синий); конфокальная микроскопия. А–в – три рядом расположенных дендрита (3D–реконструкция); б – ядерный материал (отмечен стрелками), находящийся внутри дендритов, содержащих плотный примембранный слой актиновых микрофиламентов; (3D–реконструкция, синий канал); в – актиновые кортексы трех дендритов (3D–реконструкция, зеленый канал); г – вытянутые контуры ядерного материала (показаны стрелками), расположенного внутри дендритов (2D–срез). Масштаб: 5 мкм.

al., 2016], новообразованные клетки перед их дальнейшей миграцией могут претерпевать аналогичные морфологические перестройки.

Таким образом, на основании результатов, полученных с помощью конфокальной микроскопии, можно заключить, что у молодой обонятельной клетки кроме структурного обеспечения роста дендрита F-актиновый кортекс осуществляет (по-видимому, актин-зависимый) перенос ядра в его внутреннее пространство. Благодаря этому становится возможным защищенный транспорт клетки через межклеточное пространство эпителия. На **рис. 79** представлена обобщенная схема структурных перестроек нейронов, сопровождающих их направленную локомоцию в толще эпителия.

5.12 Структурные особенности молодых нейронов после установления контакта дендритов с поверхностью обонятельного эпителия

После того, как растущий дендрит молодых обонятельных клеток достигает поверхности эпителия, он формирует плотные и адгезивные контакты с дистальными участками соседних клеток (опорных или рецепторных) и таким образом окончательно интегрируется в упорядоченную сеть клеточных элементов эпителия (**рис. 75, а, б**). В разделе 3.3 нами уже были приведены данные о том, что окрашивание препаратов фаллоидином–FITC позволяет выявлять в поверхностном слое эпителия высокоупорядоченную ячеистую сеть из адгезивных поясков клеток, сформированных актиновыми микрофиламентами. Причем, такая мозаичная структура эпителия предопределяется тем, что тонкие вершины нейронов обычно перемежаются с более широкими профилями поддерживающих клеток. Эту закономерность можно наблюдать с помощью трансмиссионной (**рис. 80, а**), лазерной микроскопии на 3D реконструкциях (**рис. 80, б**) и в просвечивающем режиме (**рис. 80, в**). На **рис. 80 г, д** представлен большой фрагмент эпителия длиннокрылой широколобки, где хорошо видно, что в процессе роста терминали трех дендритов встраиваются в мелкие ячейки, по

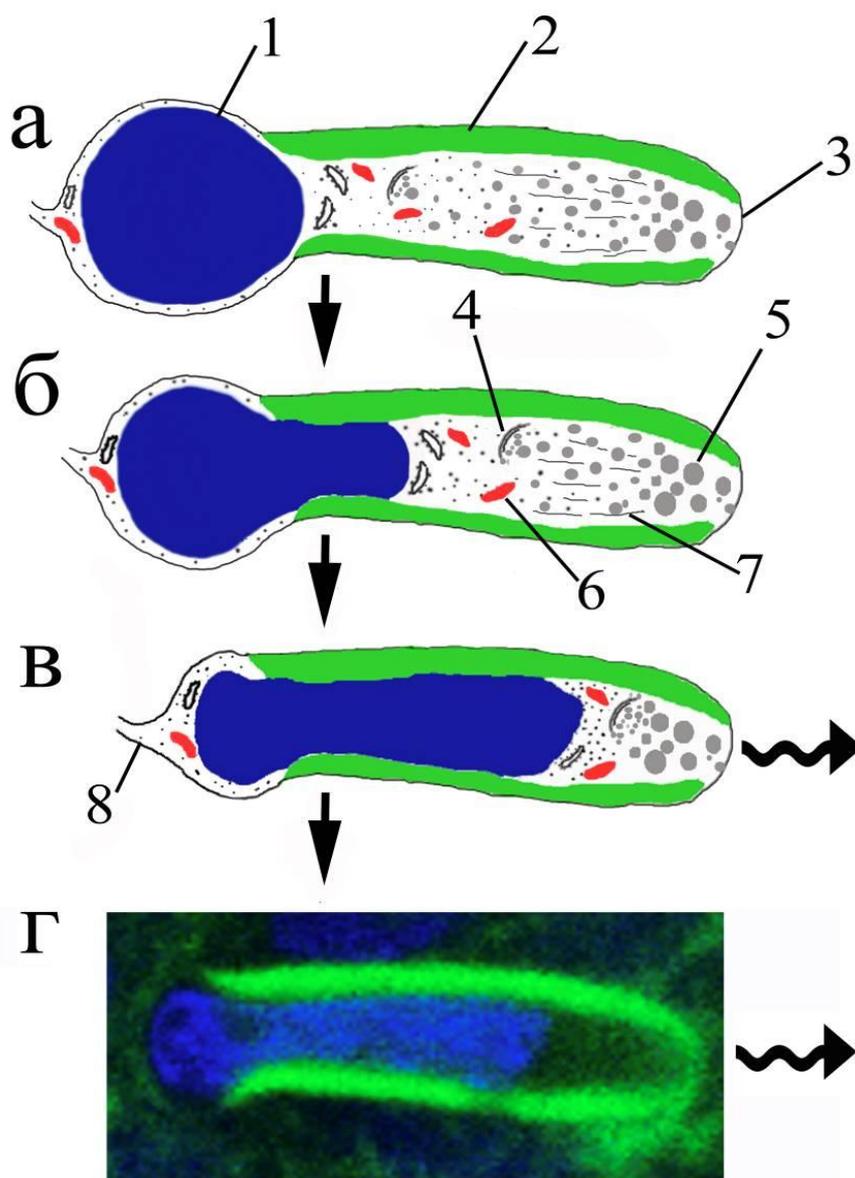


Рисунок 79. Обобщенная схема структурных перестроек молодых обонятельных нейронов в процессе их транспорта в толще обонятельного эпителия. А – ядро вплотную примыкает к обогащенному F-актином дендриту. Заключенные внутри дендрита органеллы (эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, микротрубочки) обеспечивают формирование секреторных пузырьков и функционирование конуса роста дендрита; б – ядерный материал перемещается во внутреннее пространство дендрита; в – значительная часть ядерного вещества нейрона находится внутри дендрита, что придает ему более "обтекаемую" форму для движения; г – 2D-срез растущей обонятельной клетки у длиннокрылой широколобки. Обозначения: 1 – ядро; 2 – слой актиновых микрофиламентов; 3 – конус роста; 4 – аппарат Гольджи; 5 – секреторные пузырьки; 6 – митохондрии; 7 – микротрубочки; 8 – центральный отросток.

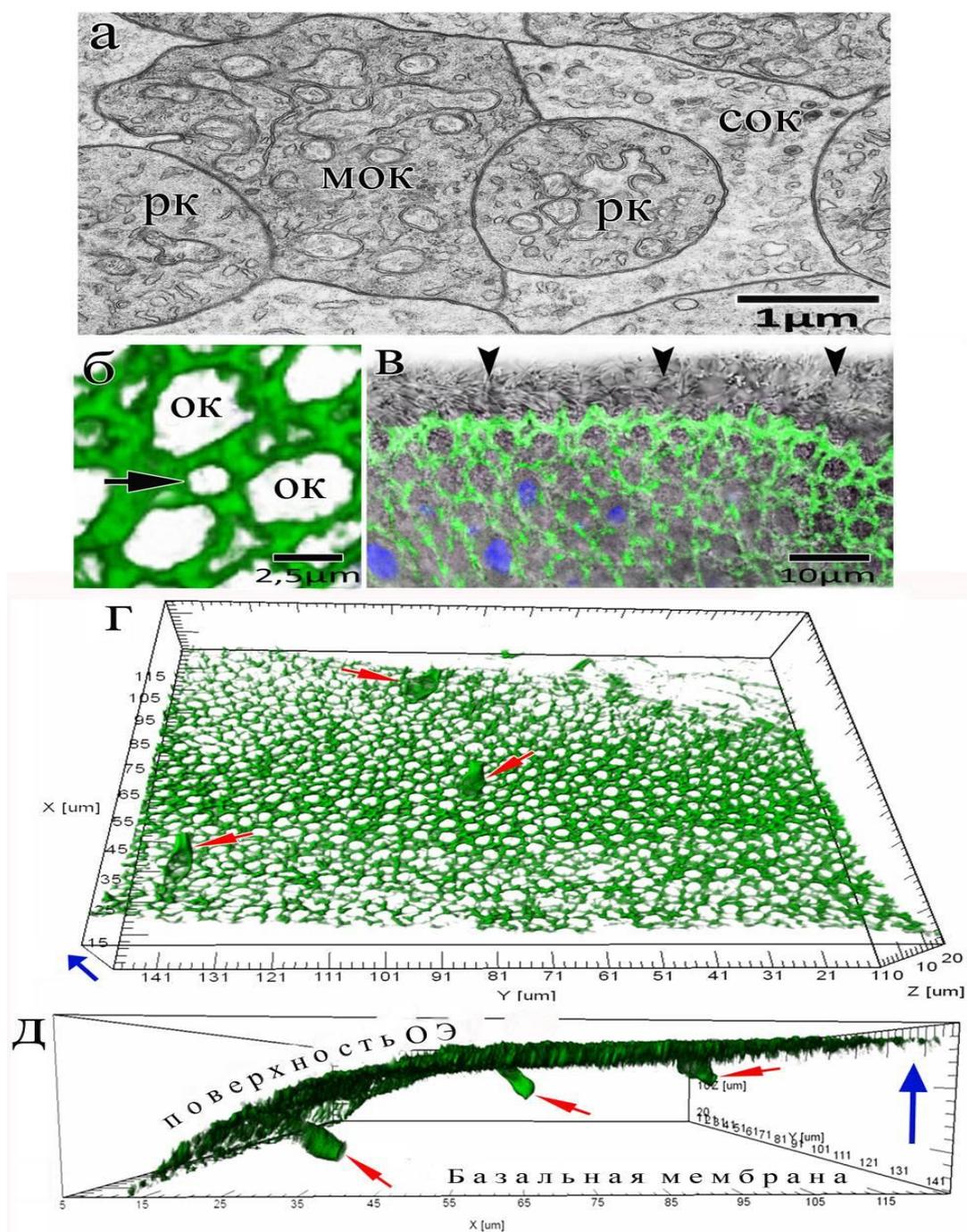


Рисунок 80. Участие актиновых микрофиламентов в поддержании структурной целостности обонятельного эпителия и в развитии рецепторных клеток у *C. inermis*. А – поперечный срез через эпителий (тэм); б–д – конфокальная микроскопия (окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядра (DAPI, синий); б – мозаичная организация актиновых микрофиламентов в апикальных участках опорных и рецепторных клеток (3D-реконструкция); черной стрелкой отмечен профиль вершины терминали дендрита; в – вид эпителия в режиме проходящего света (слой ресничек клеток обозначен стрелками); г – дендриты трех молодых нейронов, встроенных в упорядоченную мелкоячеистую сеть цитоскелета в поверхностном слое эпителия (вид со стороны базальной мембраны); д – рис «г» в профиль. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; мок – мерцательная опорная клетка; сок – секреторная опорная клетка; ок – опорная клетка. Синяя стрелка направлена к поверхности эпителия.

соседству с вершинами опорных клеток. Они находятся на больших расстояниях (20–50 мкм) друг от друга и их терминали уже закреплены в эпителии. В ряде случаев также удавалось наблюдать и более плотные группы из таких клеток, причем, судя по особенностям окраски на F-актин, их вершины, как правило, находились на одинаковых этапах структурной дифференцировки. Возможно, это говорит о том, что подобные кластеры рецепторных клеток развиваются в составе компактных доменов, формирование которых в процессе нейrogenеза мы обсуждали в разделе 5.7.

Начиная с момента установления контакта с внешней средой, апикальный участок рецепторного нейрона претерпевает ряд важных ультраструктурных перестроек. Можно предположить, что в это время везикулярный транспорт по направлению к конусу роста дендрита прекращается, однако на данном этапе развития вершина клетки еще не приобретает вид полностью сформировавшейся обонятельной булавы. Установлено, что терминаль дендрита, установившего связь с внешней средой, еще не содержит чувствительных ресничек (или микровилл). Кроме того, в эту фазу дифференцировки, как и вдоль дендрита, в примембранном слое обонятельной булавы также формируется хорошо выраженный слой актиновых микрофиламентов. Он сплошным широким (0,4 мкм) слоем закрывает все пространство под поверхностной мембраной апикального участка дендрита за исключением небольшого участка, который оформлен в виде округлого, не содержащего актин пятна диаметром 0,3 мкм (**рис. 81**). Расчеты показывают, что от площади поверхности булавки площадь этого, незаполненного F-актином участка составляет всего 2–3 %. Естественно, возникает вопрос: каким образом в вершине клетки, в плотном слое актиновых микрофиламентов может формироваться такая «пора»? Нам не удалось выявить последовательных этапов встраивания дендрита в поверхность эпителия. По данным конфокальной микроскопии диаметр дистального участка растущего дендрита, (где, как мы считаем, располагается конус роста) в среднем составляет 0,9 мкм, а диаметр поры

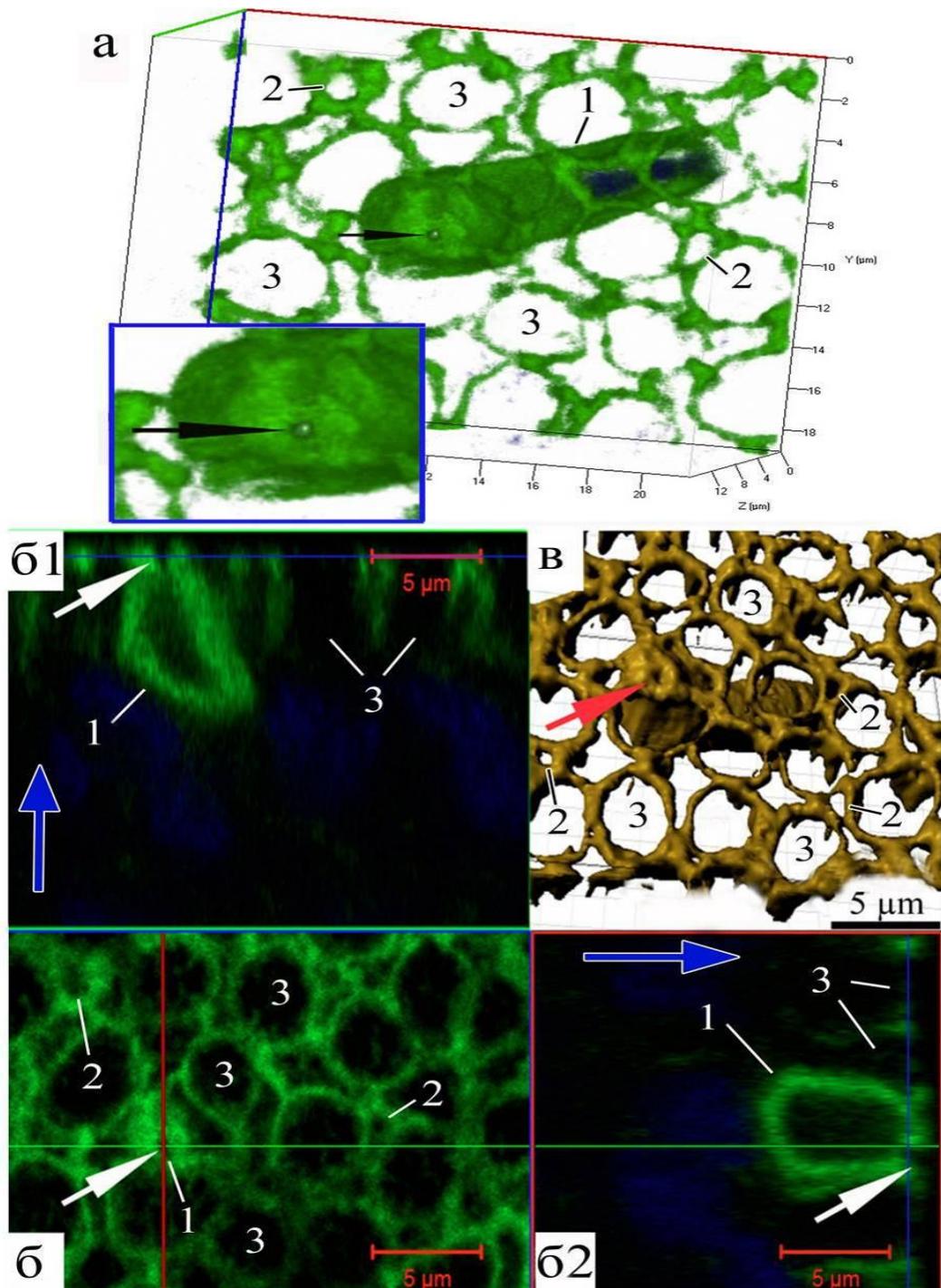


Рисунок 81. Молодой рецепторный нейрон с порой (показана стрелкой) в терминали дендрита, прикрепленного к поверхности эпителия у *C. Inermis*; окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядерный материал (DAPI, синий), конфокальная микроскопия. А – нейрон прикреплен к ячейкам плотных контактов эпителия; вставка – увеличенный фрагмент апикального участка дендрита, имеющего пору (отмечена стрелкой) в плотном слое F-актина; (3D-реконструкция); б – профиль поверхности и ортогональных проекций (б1, б2) поры (2D-срезы); в – 3D-реконструкция (режим "surface") клетки с порой (отмечена красной стрелкой) в вершине дендрита. Условные обозначения: 1 – молодой нейрон с порой; 2 – профили вершин зрелых нейронов; 3 – профили вершин опорных клеток. Синяя стрелка направлена к поверхности эпителия.

оказывается существенно меньше – 0,3 мкм. На основании этого можно предположить, что после контакта дендрита с поверхностью эпителия в его апикальном участке кратковременно активируются процессы полимеризации актина и происходит увеличение площади, занимаемой цитоскелетом. Вероятно, за счет этого под поверхностной мембраной обонятельной булавки происходит частичное сужение просвета, не содержащего микрофиламенты актина, вследствие чего данный участок принимает вид поры. Мы подробно исследовали ортогональные проекции этой специфической зоны. На фоне окружающих актиновых микрофиламентов этот участок терминали дендрита не дает флуоресцентного сигнала. У некоторых клеток в продольном оптическом срезе прозрачный канал такой "поры" равномерно прослеживается через всю толщу примембранного слоя F-актина и далее открывается в цитоплазму. При этом можно полагать, что верхняя, более широкая часть поры взаимодействует с соответствующим небольшим участком поверхностной мембраны. В других случаях, продольный профиль такого канала имел вид конуса, самая узкая часть которого также сообщается с цитоплазмой клетки.

Эти морфологические картины показывают, что после установления контакта дендрита с поверхностью эпителия клетка приобретает способность взаимодействовать с одорантами внешней среды только небольшим участком дендрита, ограниченным сквозным каналом в плотном слое примембранного F-актина. Таким образом, можно сказать, что актиновые микрофиламенты обеспечивают не только миграцию клеток и их позиционирование в эпителии, но и формирование пороподобной структуры в плотном слое актина под поверхностной мембраной терминали дендрита. Ранее с помощью метода Patch clamp установлено, что еще до установления контакта дендрита с поверхностью эпителия незрелые нейроны могут реагировать на гидрофобные молекулы [Lowe, Gold, 1991]. Учитывая этот факт, можно предположить, что с помощью поры клетка впервые приобретает способность взаимодействовать с водорастворимыми одорантами. *Это*

говорит о том, что после установления контакта с внешней средой обонятельная клетка не сразу включается в сложные процессы хеморецепции водорастворимых веществ. До этого случая, ни в каких других типах нейронов не было обнаружено таких примембранных структур. В связи с этим, сейчас сложно детально охарактеризовать особенности тонкого устройства такой поры и определить – насколько вариабельна ее структура. Возможно, что в поддержании морфологической целостности поры кроме актина могут принимать участие и другие элементы цитоскелета и функционально важные компоненты. Тем не менее, на основании имеющихся данных можно допустить, что через такую пору и соответствующий ей фрагмент поверхностной мембраны клетка может взаимодействовать с одорантами внешней среды.

Исследуя молодые рецепторные клетки, взаимодействующие с внешней средой, можно видеть, что в процессе их дальнейшего развития плотный примембранный слой актиновых филаментов дендрита и его дистального участка постепенно утрачивается. Нам удалось проследить отдельные фазы таких перестроек. На **рис. 82** представлена клетка, которая по наиболее важному морфологическому признаку – примембранному слою F-актина в вершине и теле клетки – находится в процессе дифференцировки и еще не может быть отнесена к категории морфологически "зрелых". У этой клетки в сравнении с предшествующей фазой развития вследствие разборки цитоскелета просвет пороподобной структуры существенно увеличен до 2 мкм, причем, деструктивные изменения актина наблюдаются также и в отдельных участках тела клетки. На более поздних стадиях созревания, разборка актина в терминали дендрита постепенно нарастает. Причем, на основании сравнительной оценки морфологических картин, которые возникают по ходу развития клеток, можно сказать, что исчезновение актиновых микрофиламентов происходит по направлению от верхушки булав к ее основанию. Так, на **рис. 83** показаны три клетки, у которых под мембраной булав цитоскелет в основном уже отсутствует, однако он еще

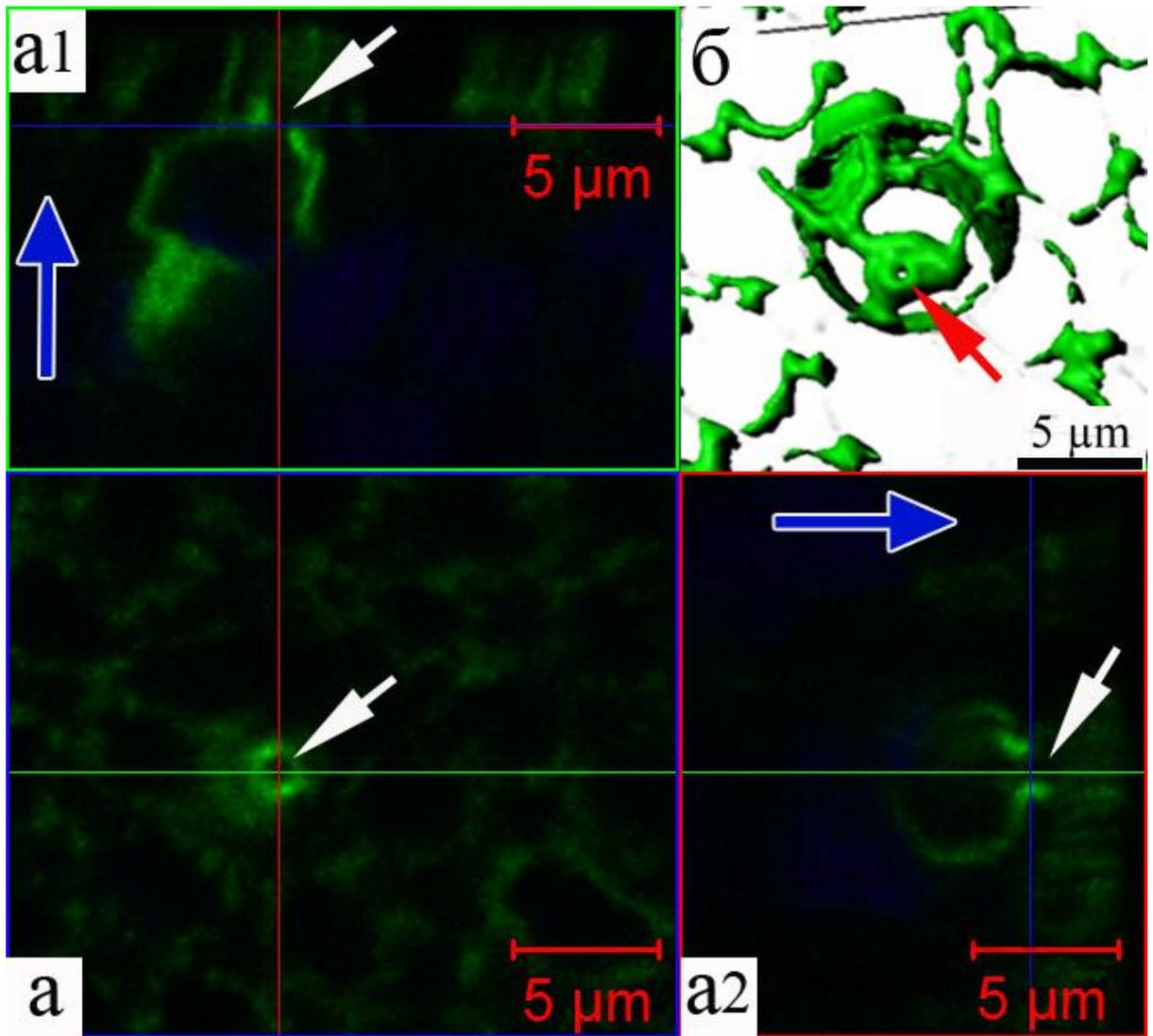


Рисунок 82. Увеличенные размеры поры (показана белой стрелкой) в вершине дендрита у молодого нейрона у *C. Inermis*; окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядерный материал (DAPI, синий), конфокальная микроскопия. А – дендрит прикреплен к ячейкам плотных контактов эпителия; б – профиль поверхности и ортогональных проекций (б1, б2) поры (2D-срезы); в – 3D-реконструкция (режим "surface") клетки с порой (показана красной стрелкой); актиновые микрофиламенты дендрита местами частично расформированы. Синяя стрелка направлена к поверхности эпителия.

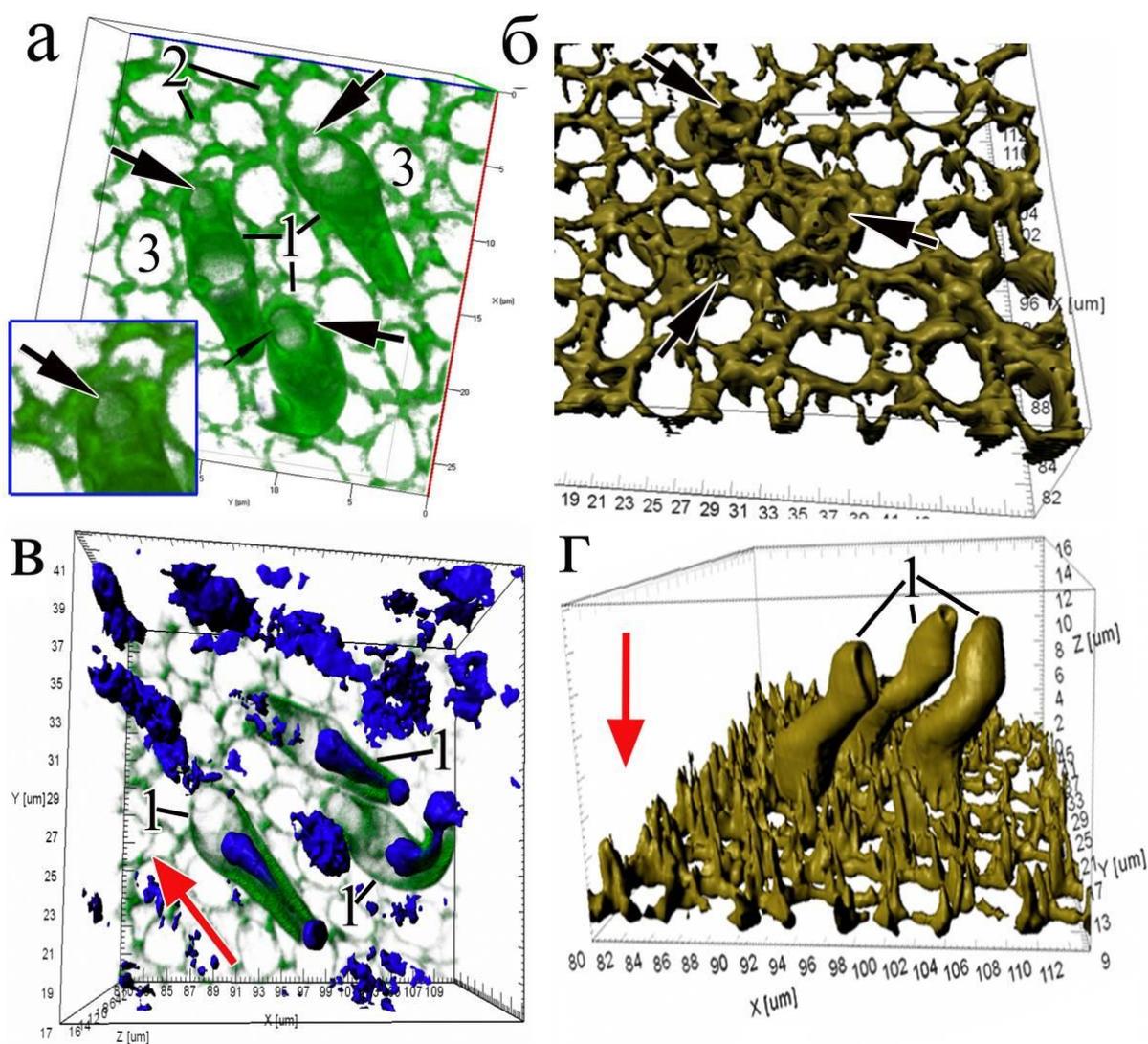


Рисунок 83. Деструктивные изменения актиновых микрофиламентов в терминалях (отмечены стрелками) дендритов трех рецепторных клеток на завершающих этапах их развития. F-актин в осевых цилиндрах дендритов частично сохранен. Хорошо виден вытянутый ядерный материал, основная часть которого расположена внутри дендритов. Окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядерный материал (DAPI, синий). А, б – вид клеток через поверхность эпителия; в, г – вид клеток со стороны базальной мембраны; б, г – обработка изображений в режиме "surface". Условные обозначения: 1 – незрелые рецепторные клетки; 2 – профили зрелых нейронов; 3 – профили опорных клеток. Красная стрелка направлена к поверхности эпителия.

частично сохранен в ее краевых участках. По мере усиления деструкции микрофиламентов весь широкий слой F-актина под поверхностной мембраной вершины клетки постепенно исчезает. Эб этом же свидетельствуют картины ортогональных проекций рецепторных клеток, на которых видно, что в примембранном слое тела клетки актин еще присутствует, однако терминаль дендрита от него уже полностью освобождена (**рис. 84**). Вероятно, это обеспечивает встраивание рецепторных белков по всей площади чувствительного участка нейрона и завершение его функциональной специализации. Обобщенная схема цитохимических перестроек обонятельных клеток после закрепления их вершин в поверхности эпителия и их дифференцировке во взрослые клетки представлена на **рис. 85**.

Таким образом, после закрепления вершины клетки в поверхности эпителия вначале мы наблюдаем уплотнение актиновых микрофиламентов в примембранном слое по всей площади обонятельной булавки с формированием в нем небольшой поры. Затем просвет этой поры постепенно увеличивается и далее исчезает совсем. Характерно, что феномен подобных локальных динамических перестроек цитоскелета наблюдается также в других типах клеток. В частности, при установлении иммунного синапса (Т-клетка/клетка мишень) в зоне контакта клеток вначале возникает уплотнение примембранного слоя актина, а затем в центральном участке актиновые микрофиламенты диссоциируют с образованием кольцевой структуры, обогащенной F-актином на периферии синапса [de la Roche *et al.*, 2016].

К сожалению, в связи с особенностями подготовки препаратов (фиксация и пермеабилзация) для конфокальной микроскопии не представляется возможным более детально *in vivo* наблюдать за динамикой изменений актиновых микрофиламентов в рецептивном участке клеток. По этой причине мы не можем судить о временном интервале, в течение которого пора может стабильно существовать в слое актиновых

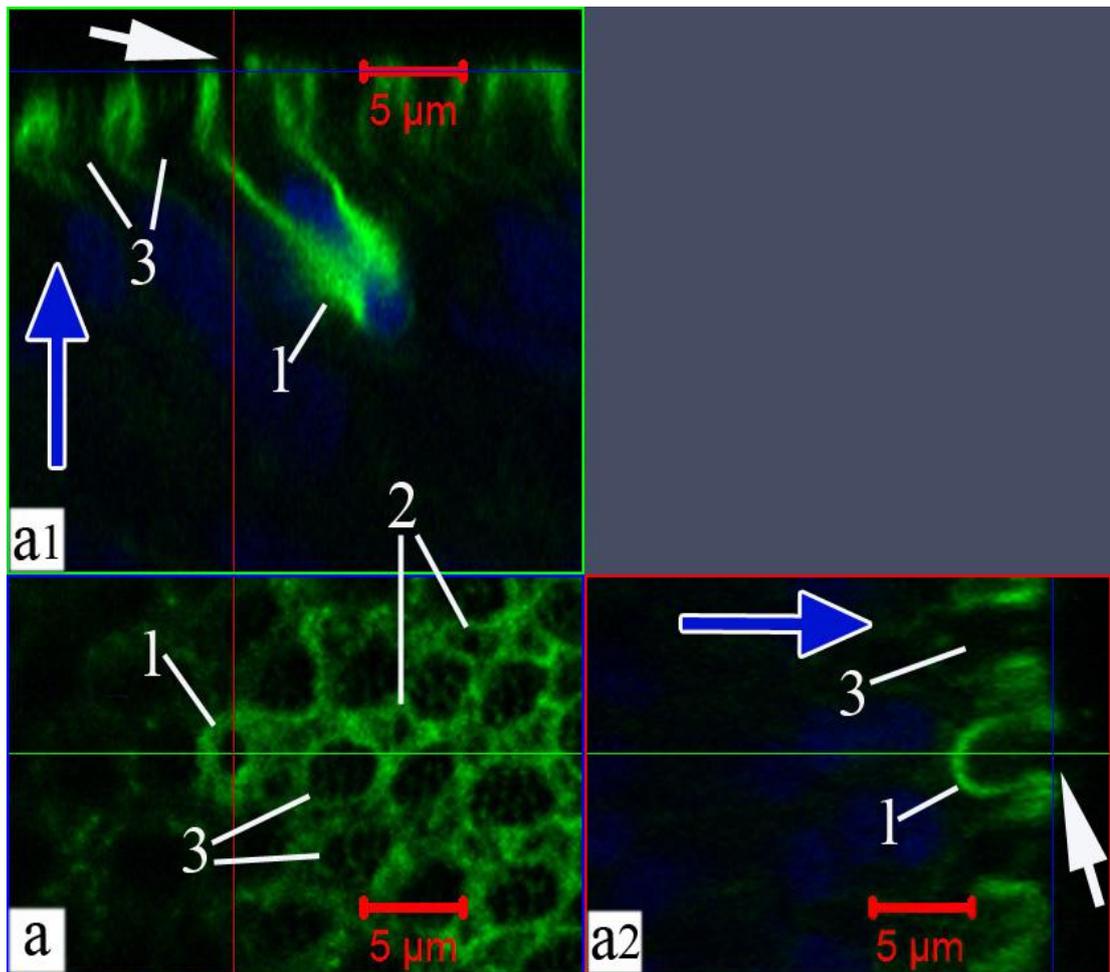


Рисунок 84. Вершина незрелой рецепторной клетки не содержит актиновых микрофиламентов (показана стрелкой), хотя в осевом цилиндре тела клетки он частично сохранен. Основная часть ядерного материала расположена внутри дендрита. Окраска на F-актин (фаллоидин-FITC, зеленый) и ядерный материал (DAPI, синий). А – вид на поверхность эпителия; а1, а2 – ортогональные проекции клетки (2D-срезы). Условные обозначения: 1 – незрелая клетка; 2 – профили зрелых нейронов; 3 – вершины опорных клеток.

микрофиламентов.

В связи с тем, что пора формируется сразу после установления связи дендрита с поверхностью эпителия, возникает вопрос о ее функциональном назначении. Может ли данная пора каким-то образом участвовать в формировании рецепторного репертуара чувствительных клеток? В настоящее время неизвестно – могут ли запаховые сигналы внешней среды

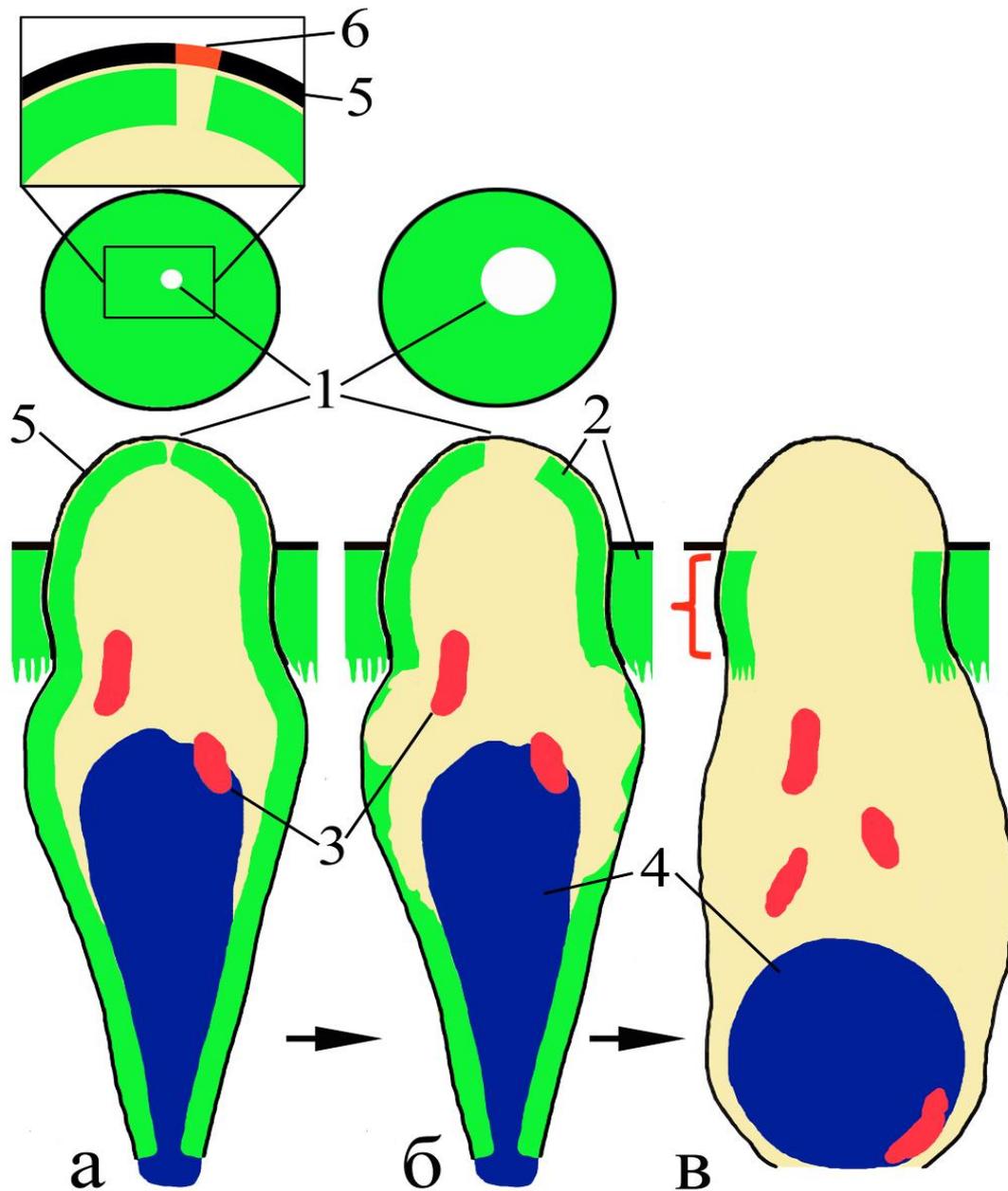


Рисунок 85. Ранние (а, б) и "зрелая" (в) стадии морфологической дифференцировки обонятельных рецепторных клеток (по данным конфокальной микроскопии). А – внутри молодой клетки располагается вытянутое ядро, митохондрии и широкий слой примембранного F-актина. В толще актиновых микрофиламентов терминаль дендрита содержит пору, которая открывается в цитоплазму. Выделен и увеличен фрагмент вершины с порой (красным отмечен участок мембраны над порой); б – просвет поры существенно расширен вследствие разборки актиновых микрофиламентов. Частичная деструкция F-актина в примембранном слое тела клетки; в – "зрелая" клетка: F-актин содержится только в поверхностном слое эпителия; его толщина соответствует профилю плотных контактов (показано фигурной скобкой) между дистальными участками клеток. Обозначения: 1 – пора; 2 – F-актин; 3 – митохондрии; 4 – ядро; 5 – поверхностная мембрана; 6 – участок поверхностной мембраны над порой.

участвовать в формировании селективной чувствительности обонятельных клеток на ранних (или более поздних) этапах их развития. Если такая возможность предусмотрена, то вероятно она могла бы иметь определенный биологический смысл: в процессе нейрогенеза в обонятельном эпителии животного периодически могли бы формироваться рецепторные клетки, которые за счет пор приобретают специфическую чувствительность к пахучим веществам, наиболее характерным на данном этапе его жизни в связи с конкретной средой обитания. У разных видов рыб представлено от 50 до 150 генов ольфакторных рецепторов, которые могут связывать водорастворимые химические сигналы [Niimura, Nei, 2005; Alioto, Ngai, 2006; Saraiva, Korsching, 2007]. Ранее установлено, что в ходе дифференцировки в каждом нейроне из всего мультигенного семейства, кодирующего обонятельные рецепторы, выбирается только один ген, экспрессия которого будет обеспечивать его специфичность к запахам [Buck, Axel, 1991; Serizawa *et al.*, 2004; Mombaerts, 2004]. Секвенирование транскриптомов 178 единичных клеток из ольфакторного эпителия новорожденных и взрослых мышей также подтверждает положение о том, что в ходе эпигенетического регулирования в результате инактивации отдельных генов закрепляется экспрессия только одного из них [Tan *et al.*, 2015]. На примере млекопитающих обсуждаются различные модели регуляции стохастического принципа моногенного и моноаллельного отбора рецепторов, которые представлены в отдельных клетках и обеспечивают их моноспецифичность [Serizawa *et al.*, 2003; Mombaerts 2004; Shykind, 2005; Clowney *et al.*, 2011; Magklara *et al.*, 2011; Magklara, Lomvardas, 2013]. В частности, согласно одному из представлений [Shykind, 2005], механизм моноаллельного отбора предполагает попеременную стохастическую активацию генов, каждый из которых кодирует только один тип рецепторов (**рис. 86**). Если возникает экспрессия нефункционального рецептора (неспособного к специфическому связыванию одоранта), то это ведет к переключению генов. Если далее активируется ген, который обеспечивает сборку функционального рецептора,

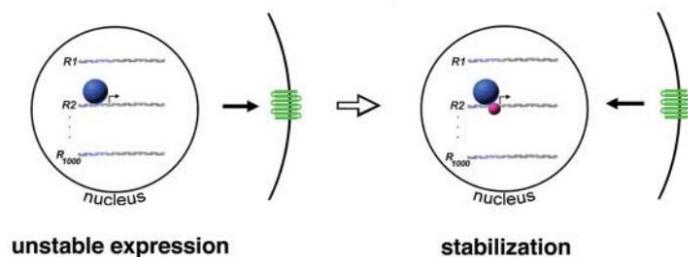
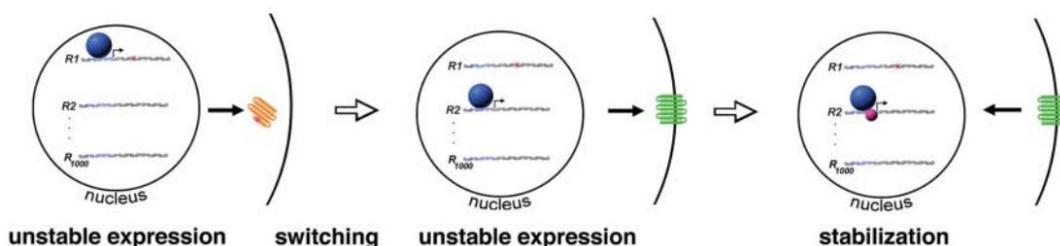
A Choice of functional receptor leads to feedback stabilization:**B Choice of non-functional receptor leads to switching:**

Рисунок 86. Модель выбора функционального рецептора в незрелых рецепторных клетках [Shykind, 2005]. А – отбор функционального рецептора (зеленый) ведет к его стабилизации через механизм обратной связи. Отбор гена, кодирующего обязательный рецепторный белок производится с помощью стохастического механизма (синяя сфера). Функционирующий рецепторный белок (зеленый) через внутриклеточный сигнал (механизм обратной связи) стабилизирует ген (небольшая красная сфера), кодирующий данный рецептор. В – отбор нефункционального рецептора ведет к переключению генов. Нефункциональный ген выбирается с помощью стохастического механизма (синяя сфера), при котором не обеспечивается стабилизация неработающего рецепторного белка (желтый); он отключается и процесс отбора продолжается пока функциональный рецептор не будет выбран.

способного к специфическому взаимодействию с молекулами одоранта, запускается внутриклеточный сигнал, который «закрепляет» его экспрессию. Сингулярность экспрессии рецепторов имеет важное значение для обработки обязательных сигналов, поскольку они локализованы как в дендритах, так и в аксонах [Vassar *et al.*, 1994; Tsai, Barnea, 2014], что обеспечивает не только идентификацию одорантов, но и точное нацеливание аксонов в ОЛ [Wang *et*

al., 1998]. Выявлены различные эпигенетические механизмы, которые выводят ген ольфакторных рецепторов из репрессии [Magklara *et al.*, 2011; Lyons *et al.*, 2013; Kilinc *et al.*, 2016]. Установлено, что на начальном этапе развития нейрона экспрессия рецепторов нестабильна, пока один из них не будет функционально экспрессирован и через механизм отрицательной обратной связи посредством «реакции на несвернутые белки» (unfolded protein response – UPR) и G белки произойдет стабилизация выбранного гена и подавление работы других его аллелей [Serizawa *et al.*, 2003; Dalton *et al.*, 2013; Lewcock, Reed, 2004; Abdus-Saboor *et al.*, 2016; Shykind *et al.*, 2004; Shykind *et al.*, 2005].

В других исследованиях с использованием фармакологических и генетических подходов показана прямая роль рецептор-опосредованной активации генов, кодирующих рецепторные белки. Установлено, что вопреки правилу о моноаллельности обонятельных клеток, ингибирование Gβγ сигнализации, исходящей от рецепторов, приводит к увеличению количества сенсорных нейронов, экспрессирующих несколько разнотипных рецепторов на клетку [Ferreira *et al.*, 2014]. В этой же работе показано, что экспрессия ферментов, участвующих в регуляции метилирования репрессивных гистонов, влияют на активность Gβγ, обеспечивая возможную связь между активностью одорант-связывающих рецепторов в плазматической мембране и структурой хроматина в ядре. Кроме того, полученные недавно экспериментальные данные показывают, что представление рецепторных белков в поверхностной мембране клетки выполняет ключевую роль в регуляции транскрипции генов, кодирующих эти рецепторы (Sharma *et al.*, 2017).

Анализ литературы говорит о том, что представление функциональных рецепторов в хемочувствительном отделе нейрона является важным звеном в стабилизации работы выбранного гена. В свете полученных нами данных можно предположить, что первичная сигнализация, исходящая от функционального рецептора, может быть реализована через поры, которые

возникают в дендритах клеток после установления их контакта с внешней средой. Сейчас нет возможности определить длительность отрезка времени, которого было бы достаточно для формирования первого внутриклеточного сигнала от одорантов, которые в данное время могут присутствовать во внешней среде. Каким образом это может происходить при участии поры в настоящее время можно рассуждать только гипотетически. Могут ли над порой, в соответствующем месте мембраны быть сосредоточены рецепторные белки, ионные каналы и ферменты, обеспечивающие связывание молекул одорантов и дальнейшую трансдукцию внеклеточных сигналов? Если в этом участке булавой восприятие пахучих веществ возможно, то в остальных зонах мембраны из-за подлежащего под ней плотного слоя актиновых филаментов трансдукция химических сигналов вероятно исключена.

Таким образом, на нашем материале видно, что через пору созревающая клетка способна взаимодействовать с минимальной порцией пахучих веществ внешней среды, и обеспечивать проведение сигнала внутрь клетки. Кроме того, для поддержания механизмов сигнальной трансдукции данная микропора может служить специальным сквозным каналом для транспорта к вершине клетки везикул, содержащих, комплекс рецептора и его транспортных белков (RTP1 и RTP2), G-белок, аденилатциклазу, нуклеотид-связанные каналы, фосфодиэстеразу и другие необходимые компоненты. В соответствии с этой моделью после стабилизации экспрессии выбранного гена и разборки актиновых микрофиламентов к терминали дендрита могут доставляться другие структурные элементы (в частности, тубулин), необходимые для образования и функционирования сенсорных цилий. Без проведения дополнительных исследований невозможно определить – могут ли обнаруженные микропоры быть вовлечены в процессы стабилизации ольфакторных генов, или они могут участвовать в других процессах. Будущие, более детальные исследования могут внести ясность в решение этих вопросов. Тем не менее, уже сейчас можно сказать, что кроме

биохимических и генетических перестроек, свойственных для рецепторных клеток в процессе их дифференцировки, важную роль в их развитии принимают также актиновые микрофиламенты. Причем, на ранних стадиях морфогенеза клеток актиновый цитоскелет обеспечивает формирование особой компоновки их ядерного вещества внутри дендрита, что обеспечивает успешную миграцию клеток в толще эпителия. После установления контакта дендрита с поверхностью эпителия в его терминали временно образуется плотный слой актиновых микрофиламентов с пороподобной структурой, через которую молодой нейрон может проводить первый внутриклеточный сигнал от одорантов внешней среды. Полученные данные могут быть важными для понимания механизмов миграции и созревания обонятельных клеток. В частности, проведенные исследования актуальны в связи с острой дискуссией о соотношении роли генетических и средовых факторов в формировании рецепторного репертуара в обонятельных клетках в процессе их развития [Shykind, 2005; Ferreira *et al.*, 2014; Abdus-Saboor *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017].

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛА НА ОЛЬФАКТОРНЫЙ ЭПИТЕЛИЙ РОГАТКОВИДНЫХ РЫБ СЕМЕЙСТВА СОТТИДАЕ

В настоящее время проводятся активные исследования по изучению влияния водорастворимых токсикантов различной химической природы на обонятельный аппарат и поведение животных, включая рыб [Пащенко, Касумян, 1984; Клименков, 1999; Касумян, 2001; Бянкин, 2003; Tierney *et al.*, 2010]. Это связано с тем, что в процессе разработки концепции безопасного развития экосистем одна из ключевых проблем состоит в поиске адекватных критериев степени токсичности тех или иных химических агентов антропогенного происхождения. Многие из используемых сейчас критериев токсичности (например, LD50), не имеют высокой чувствительности и вследствие этого отражают более поздние по срокам, а отсюда и более глубокие уровни нарушения физиологического состояния исследуемых животных [Lessigiarska *et al.*, 2006]. В связи с такой постановкой проблемы оценка опасности ксенобиотиков путем изучения морфо-функциональных повреждений хемосенсорного аппарата животных представляется одним из объективных подходов. Это обусловлено с тем, что он первым вступает в контакт с химическими агентами окружающей среды и обладает к ним естественной высокодифференцированной чувствительностью. Важность использования степени сохранности сенсорного аппарата в качестве критерия патогенности тестируемых веществ обусловлена также тем, что теряя обоняние, животные лишаются возможности различать загрязняющие вещества в низких концентрациях. Это может приводить к их интенсивному накоплению в организме и переносу в другие трофические уровни. Таким образом, использование биоиндикации загрязнения окружающей среды с помощью оценки состояния обонятельных рецепторов позволит выявить эффекты влияния более низких концентраций ксенобиотиков. Многие из данных веществ обладают накопительным эффектом действия, вызывая

нарушения постепенно, по мере их накопления в организме до критических концентраций.

В рамках наших исследований, посвященных изучению адаптивных перестроек ольфакторного эпителия рыб при воздействии на них различных физико-химических факторов внешней среды, влияние ксенобиотиков с хорошо выраженным нейротоксичным эффектом действия также представляет определенный интерес. По нашему мнению, морфологические повреждения, происходящие в клетках сенсорного эпителия при действии токсических веществ, дают возможность увидеть максимально выраженный спектр внутриклеточных перестроек, которые могут иметь место при нейродегенеративных изменениях рецепторных клеток, вызванных и другими причинами. Таким образом, эти данные могут быть использованы для интерпретации ультраструктурных перестроек, возникающих в обонятельных клетках при действии самых разнообразных, в том числе и экстремальных факторов внешней среды.

В качестве химического агента с нейротоксичными свойствами мы использовали фенол, являющийся одним из производных бензола, широко распространенным загрязнителем и особо опасным для животных органическим поллютантом [Monfared *et al.*, 2012]. Его воздействие на животных приводит к разнообразным структурно-функциональным нарушениям – снижению нервно-мышечной возбудимости, угнетению работы внутренних органов, патологическим изменениям кожи и различным неврологическим расстройствам [Hsieh *et al.*, 1992]. Ранее проведенные исследования о влиянии промстоков целлюлозно-бумажного производства на обоняние байкальского хариуса показали, что содержащиеся в них вещества (основным компонентом которых является фенол) обладают детергентными свойствами и приводят к деструктивным изменениям поверхностных отделов обонятельного аппарата [Клименков, Ковалева, 1984; Клименков, 1984; Москалева, Клименков, 1984; Клименков, 1999] и инактивации его ферментных систем, участвующих в хеморецепции [Пяткина, Дмитриева,

1990]. Несмотря на важность этой проблемы, цитологические аспекты перестроек эпителия при воздействии фенола до настоящего времени изучены слабо и ограничиваются только информацией о макроанатомических изменениях, выявленных с помощью светооптических методов [Khan, 2006].

Мы провели детальные электронно-микроскопические исследования эпителия у желтокрылок после их кратковременного (4 суток) содержания в воде, содержащей фенол в концентрации 3 мг/л, что соответствует показателям ПДК [Yakhnenko *et al.*, 2010]. В сравнении с контролем (раздел 3.1), в клетках эпителия обнаруживались существенные нейродегенеративные изменения. В частности, в приадерной зоне рецепторных клеток наблюдалась фрагментация и увеличение просвета каналов эндоплазматического ретикулума. Его изолированные цистерны местами были лишены рибосом и в результате сильного набухания имели вид крупных вакуолей с просветленным внутренним содержимым (**рис. 87, а**). По всему объему рецепторных и опорных клеток отмечалось набухание митохондрий с частичной или полной деструкцией крист (**рис. 87, б**). Характерно, что процессы вакуолизации внутриклеточных органелл распространялись и на лизосомы. У таких лизосом в отдельных краевых участках или сразу по всему периметру происходило диффузное просветление матрикса с появлением рыхлой мелковолокнуистой субстанции. В некоторых случаях выявлялись локальные деструктивные изменения их мембраны и выход содержимого лизосом в цитоплазму (**рис. 87, в**). В аппаратах Гольджи также происходила частичная вакуолизация дисков, которые теряли свойственную для контроля упорядоченную организацию. Причем, набухание развивалось как в центральной зоне аппарата Гольджи, так и в краевых участках его дисков (**рис. 87, г; 88**).

После воздействия фенола в цитоплазме рецепторных клеток обнаруживались крупные (1–1,3 мкм) вакуолеподобные образования со светлым содержимым, которые располагались как в перикарионе клетки, так

и в периферическом отростке, включая его апикальный отдел (**рис. 88, а, б**). Можно предположить, что локализованные в дистальных отделах дендрита многочисленные вакуоли возникли из переместившихся сюда фрагментов набухших цистерн эндоплазматического ретикулама и/или набухших митохондрий. Аналогичные образования встречались и в разных участках опорных клеток (**рис. 88, в**). В некоторых зонах эпителия на фоне повышенной секреторной активности бокаловидных клеток поверхностные отделы опорных и чувствительных клеток были лишены морфологической целостности, что сопровождалось выходом из клеток их структурных компонентов (**рис. 88, г**). Сами реснички мерцательных и рецепторных клеток также были в разной степени повреждены. Вследствие их набухания в ряде случаев отмечалось необратимое нарушение упорядоченной организации аксоном (**рис. 89, д–ж**).

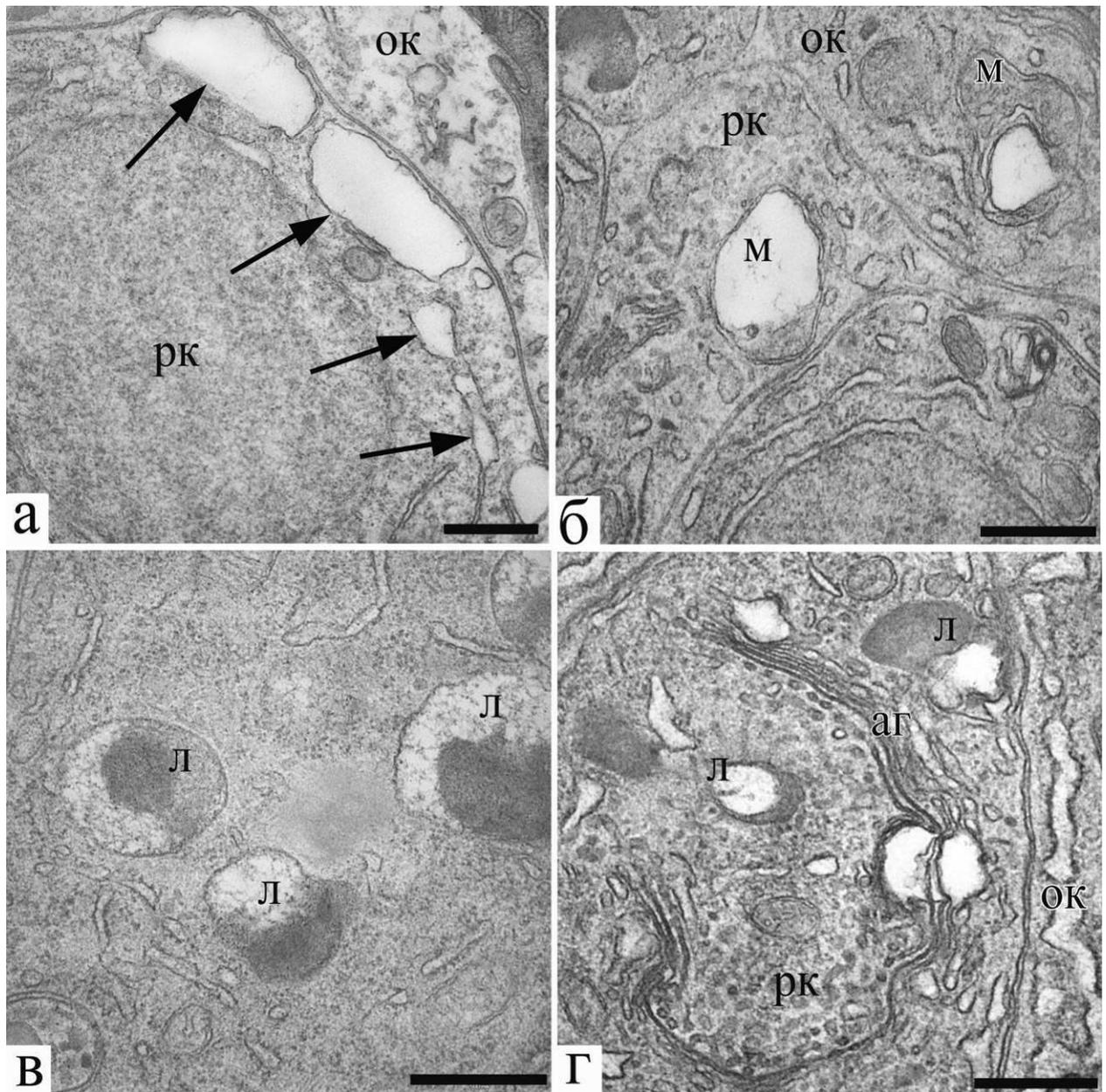


Рисунок 87. Внутриклеточные дегенеративные изменения в клетках обонятельного эпителия у желтокрылки после воздействия фенола. А – фрагментация и набухание каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума (показано стрелками); б – набухание митохондрий в рецепторной и опорной клетках; в – локальное просветление матрикса лизосом; г – вакуолизация лизосом и цистерн аппарата Гольджи. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка; м – митохондрии; л – лизосомы; аг – аппарат Гольджи. Масштаб: 0,5 мкм.

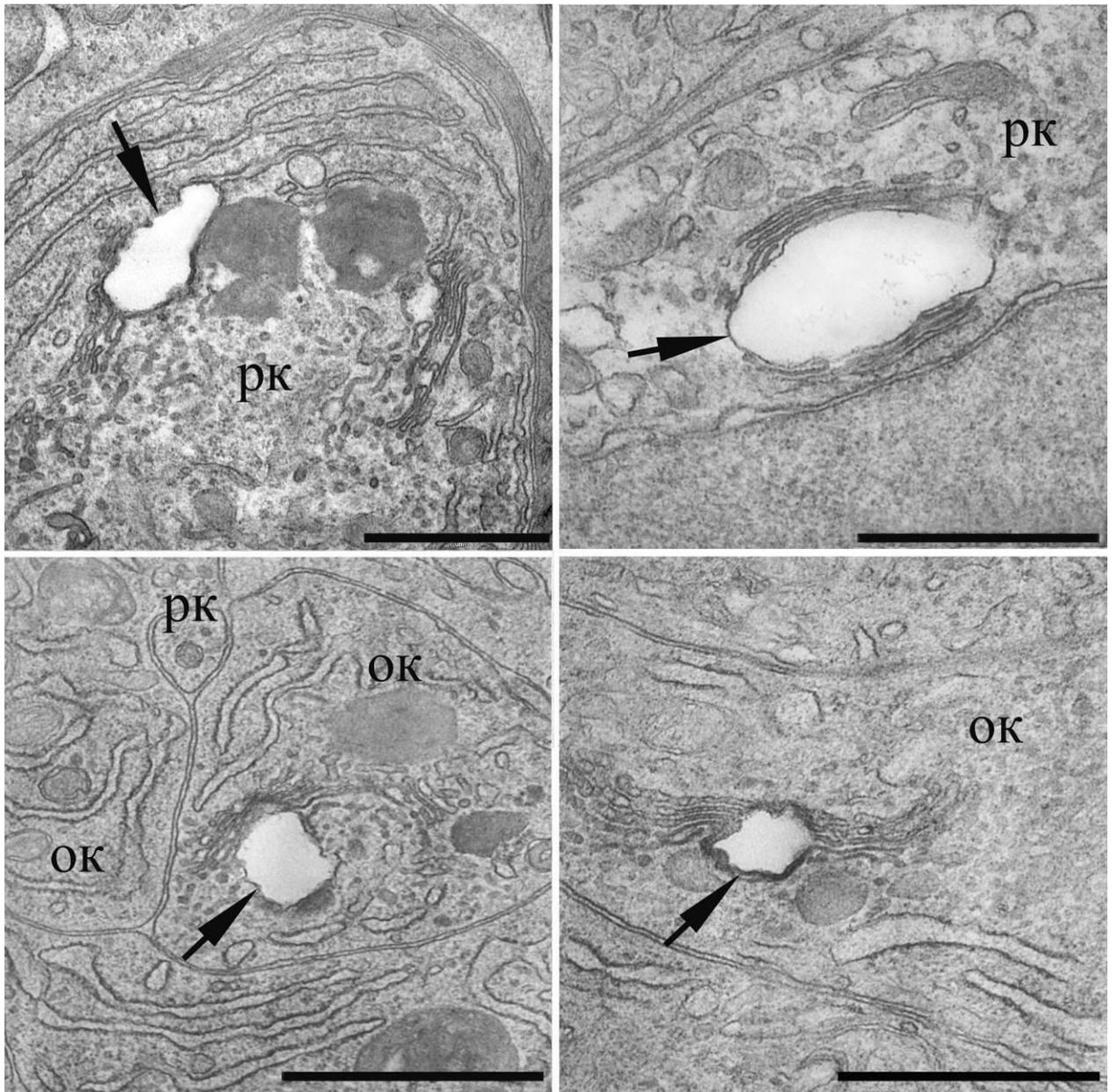


Рисунок 88. Внутриклеточные дегенеративные изменения в клетках обонятельного эпителия у желтокрылки после воздействия фенола. Локальное набухание цистерн аппарата Гольджи (показано стрелкой). Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка. Масштаб: 1 мкм.

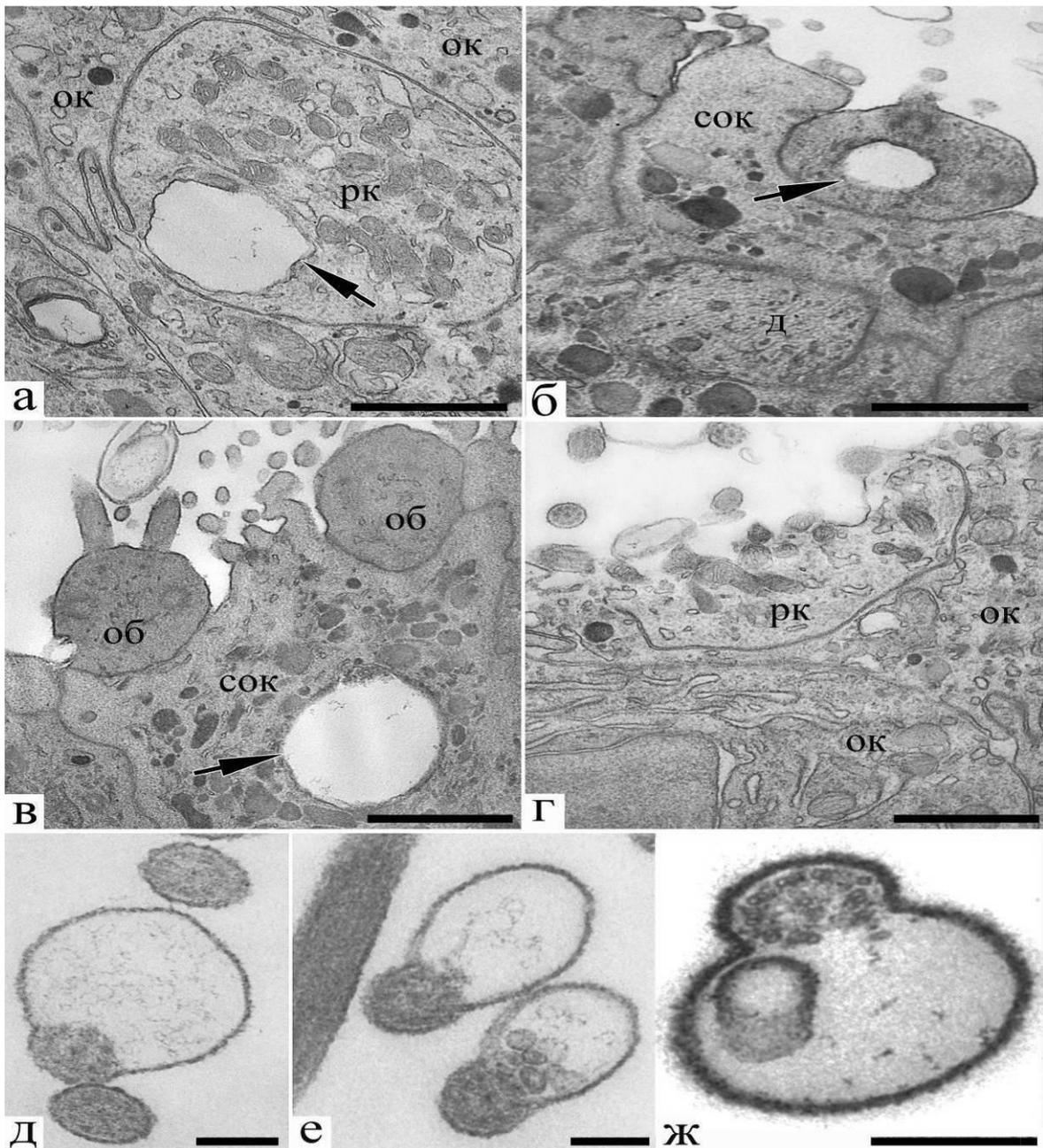


Рисунок 89. Дегенеративные изменения в клетках обонятельного эпителия у желтокрылки после воздействия фенола. А – крупные вакуоли (отмечены стрелками) со светлым содержимым в дендрите рецепторной клетки (а), в обонятельной булавке (б) и в апикальном участке секреторной опорной клетки (в); г – деструктивные изменения поверхностного участка рецепторной клетки; д–ж – набухание ресничек рецепторных и мерцательных клеток. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка; сок – секреторная опорная клетка; об – обонятельная булавка; д – дендрит; Масштаб: а – г – 1 мкм; д – ж – 0,25 мкм.

Проведенные исследования показывают, что продолжительное выдерживание рыб в воде, содержащей фенол, сопровождается значительными нейродегенеративными перестройками эпителия, которые затрагивают ключевые органеллы клеток, включая их апикальные отделы с ресничками и жгутиками, в норме выполняющими рецепторную функцию.

Ранее на различных типах клеток и тканей установлено, что фенол вызывает усиление окислительных стрессов, нарушение барьерных свойств мембран [Shvedova *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2007] и вызывает программированную гибель клеток – апоптоз [Xu *et al.*, 2016]. Можно полагать, что деструктивные изменения клеточных элементов эпителия также могли быть вызваны активацией свободнорадикальных процессов, которые приводят к повреждению мембран, набуханию внутриклеточных органелл и поверхностного рецепторного аппарата.

Данные перестройки могли возникнуть у рыб не только в результате прямого воздействия фенола, растворенного в воде, но и вследствие существенных морфо-функциональных изменений компонентов внутренней среды организма, в частности, кроветворных органов и форменных элементов периферической крови. По нашим данным, система эритрона у рыб весьма чувствительна как к фенолу, так и к особенностям гидрохимических условий их обитания в естественных и искусственных условиях [Яхненко, Клименков, 2009; Yakhnenko *et al.*, 2010; 2012; 2013; 2014; Яхненко и др., 2016]. Кроме того, ранее обнаружено, что монооксигеназные системы печени байкальских рыб также подвергаются влиянию фенольных соединений на генерацию АФК, протекание реакций перекисного окисления липидов и гидрокселирование ксенобиотиков [Kozlov *et al.*, 1983]. Все это говорит о том, что находясь в пятне загрязнения, рыбы лишаются обоняния, т.е., теряют способность с помощью запахов воспринимать как естественные пищевые и хемокоммуникативные сигналы (феромоны), так и поллютанты. Вследствие этого, токсичные вещества могут длительное время накапливаться в организме, нарушая физиологию рыб и

далее распространяться по пищевым цепям, что может усугублять их распространение в водоемах. Таким образом, как и ранее проведенные работы [Пашенко, Касумян, 1984; Касумян, 2001; Бянкин, 2003; Tierney et al., 2009], так и полученные нами морфологические данные [Yakhnenko *et al.*, 2010] свидетельствуют о том, что рассматриваемый подход может быть использован не только для оценки влияния ксенобиотиков на отдельные виды гидробионтов, но и для прогнозирования влияния загрязнителей антропогенного происхождения на природные экосистемы в целом.

Мы не ставили перед собой цель исследовать отдаленные последствия дегенеративных нарушений обонятельной системы и ее компенсаторного восстановления после воздействия фенола, так как отдельные аспекты этих вопросов уже решались при моделировании подобных процессов с помощью других поверхностно-активных веществ [Schwob *et al.*, 1995; Frontera *et al.*, 2016]. По нашему мнению, структурные перестройки, возникающие в обонятельных розетках при контакте с фенолом, представляют собой хорошую модель получения нейродегенеративных изменений, которые можно использовать для сравнительно-морфологических исследований адаптивных перестроек обонятельного аппарата у рыб в условиях влияния других экстремальных факторов внешней среды. В частности, к таким факторам может быть отнесена продолжительная одорантная стимуляция обоняния водорастворимыми нетоксичными веществами (глава 5). Кроме того, к повреждающим типам воздействия относятся также перепады гидростатических давлений, которые преодолевают отдельные виды байкальских рыб в ходе их естественного поведения, что будет рассматриваться в следующей главе.

ГЛАВА 7. АДАПТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБОНЯТЕЛЬНОГО АППАРАТА У ГЛУБОКОВОДНЫХ РЫБ ОЗЕРА БАЙКАЛ

В настоящее время актуальными являются вопросы, связанные не только с расшифровкой механизмов функционирования хеморецепторных нейронов животных при разном химизме окружающей среды, но и в условиях действия на них широкого спектра гидростатических давлений. Особенно это касается процессов формирования адаптивного поведения гидробионтов, которые в ходе эволюции освоили различные водные горизонты. К настоящему времени опубликовано много работ, посвященных структурно-функциональной организации обонятельной системы у рыб, относящихся к разным систематическим группам и имеющих различные особенности поведения [Hara, 1994; Касумян, 2002; Hansen, Reutter, 2004; Hansen, Zielinski, 2005; Kapoor, Reuter, 2005; Hara, Zielinski, 2006; Hamdani, Døving, 2007; Fishelson *et. al.*, 2010]. Большинство публикаций, касающихся данной проблемы, не охватывает глубоководных рыб в связи с ограниченностью их доступа для сбора материала. По этой причине, имеющиеся к настоящему времени сведения об уровне развития морфо-функциональных систем у этих представителей ихтиофауны малочисленны [Popper, 1980; Marshall, 1996; Raymond, 2007], а по обонятельной системе, как правило, ограничиваются только общими анатомическими сведениями [Wagner, 2002; Herring, 2002].

Данный раздел работы посвящен исследованию ультраструктурных особенностей периферического отдела обонятельного аппарата у эндемичных генетически близких рыб озера Байкал (Cottoidei), которые обитают на разных глубинах и имеют специфичные стратегии поведения [Клименков и др., 2013; 2016]. С этой целью в качестве объектов исследования были взяты три вида глубоководных рыб: большая голомянка, длиннокрылая широколобка и жирная широколобка. Пищевое поведение первых двух видов сопряжено с сезонными и суточными вертикальными

миграциями в толще воды и изменениями режимов гидростатических давлений, тогда как для жирной широколобки характерным является придонный образ жизни [Коряков, 1972; Зубин, 1992; Sideleva, 2003]. Кроме того, с помощью цитохимических методов в клеточных элементах сенсорного эпителия мы анализировали уровень функциональной сохранности митохондрий [Klimenkov *et al.*, 2016]. Изучение обонятельной системы рыб с экстремальными по глубине условиями существования будет способствовать выявлению цитологических и молекулярных механизмов, позволяющих им приобретать устойчивость к гипоксии, что, в частности, обеспечивает гидробионтам сохранность хемосенсорного поведения при переменных режимах гидростатических давлений.

Решение поставленной задачи осложнено большими техническими сложностями, не позволяющими производить отбор биологического материала непосредственно на больших глубинах, где обитают рыбы. По этой причине мы имели возможность исследовать образцы тканей обонятельного анализатора рыб только после их подъема на поверхность. Естественно, что в процессе быстрого переноса гидробионтов в условия низких гидростатических давлений, клетки ольфакторного эпителия могут быть повреждены вследствие развивающейся гипобарической гипоксии [Casillas, 1976]. Мы полагаем, что наиболее устойчивые ультраструктурные характеристики клеток, свойственные для глубоководных рыб в естественной среде их обитания, в той, или иной степени остаются сохранными и поэтому могут представлять научный интерес. Таким образом, в процессе морфологических исследований нужно было отделить цитологические особенности, характерные для обонятельных клеток исследуемых рыб в норме, от перестроек, развивающихся у них в результате подъема на поверхность воды. При решении поставленных задач мы руководствовались не только данными литературы, но и теми критериями оценки структурно-функционального состояния рецепторных клеток, которые ранее нам удалось выявить у других представителей Cottoidei – у байкальских желтокрылок (*C.*

grewingki) на разных этапах их жизненного цикла [Косицын и др., 1990; Косицын, Клименков, 1994], что в методологическом плане также представляется нам весьма оправданным. Исходя из этого, цитологические особенности, свойственные для обонятельных клеток желтокрылок, не испытывающих перепадов гидростатических давлений в период их прибрежного существования, мы использовали в качестве контроля.

Большая голомянка (*C. baicalensis*). Цитоплазма опорных (мерцательных и секреторных) клеток характеризуется повышенной базофилией, благодаря чему их внутриклеточные компоненты практически неразличимы и образуют плотную осмиофильную массу. Рецепторные клетки, в той или иной степени, имеют ультраструктурные признаки низкой функциональной активности. Многие из них имеют просветленный, часто обедненный внутриклеточными структурами матрикс, благодаря чему они хорошо выделяются на фоне более электроноплотных опорных клеток эпителия. Ядро обычно содержит одно–два слабо выраженных ядрышка с центральным, либо примембранным расположением. В большинстве клеток по всей площади ядерной мембраны в промежутках между пор перинуклеарное пространство существенно расширено, что является одним из проявлений дегенеративных изменений клетки (рис. 90; 91, а). В большинстве хемочувствительных клеток аппарат Гольджи неактивен. Он располагается в приядерной зоне и представлен в виде плотно прижатых друг к другу дисков и небольшого количества мелких везикул диаметром до 0,15 мкм. В цитоплазме клеток часто выявляются гранулы липофусцина и немногочисленные, главным образом, свободные рибосомы (Рис. 91, б). Характерно, что в перикарионе многих рецепторных клеток содержатся многочисленные вакуолеподобные образования с неровными краями и светлым содержимым. Размер таких структур в разных клетках колеблется от 0,2 до 2 мкм и более. Судя по всему, они не всегда являются производными аппарата Гольджи, а возникают вследствие фрагментации и вакуолизации расположенных здесь каналов эндоплазматического ретикулума. Иногда вакуоли вплотную примыкают

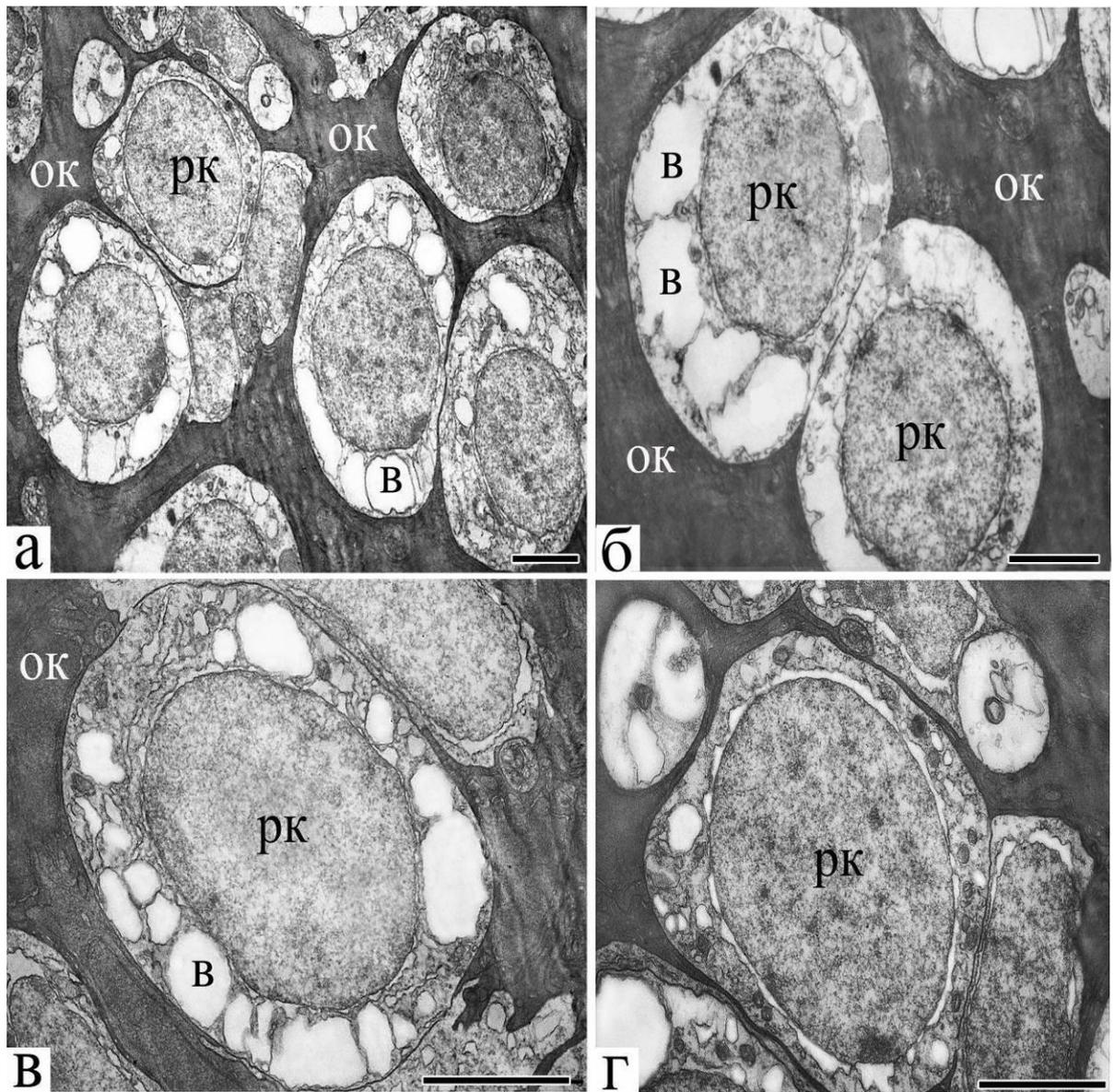


Рисунок 90. Ультраструктурные особенности обонятельного эпителия у большой голомянки. А–г – тела нейронов окружены плотным электроноплотным матриксом опорных клеток. В просветленной цитоплазме видны крупные вакуоли со светлым содержимым. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка; в – вакуоли. Масштаб: 2 мкм.

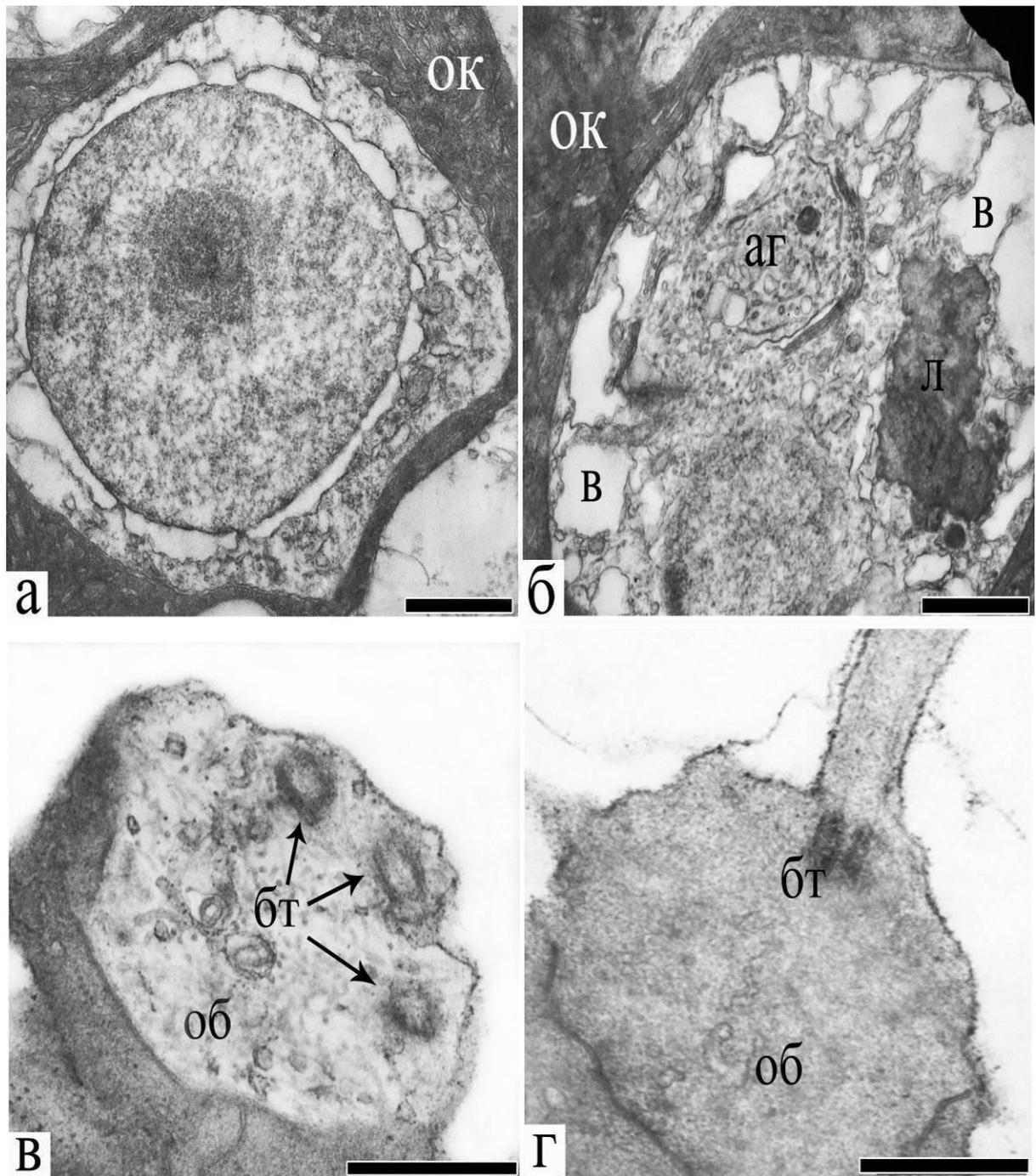


Рисунок 91. Ультраструктурные особенности приядерной зоны и терминалей дендритов рецепторных клеток в ольфакторном эпителии у большой голомянки. А – ядро с сильно расширенным перинуклеарным пространством и ядрышком в центре; б – крупная гранула липофусцина и аппарат Гольджи со слабой секреторной активностью; в – обонятельная булава чувствительной клетки жгутикового типа с признаками дегенеративных изменений и сохранившимися базальными тельцами; г – вершина клетки с ресничкой. Условные обозначения: ок – опорная клетка; аг – аппарат Гольджи; об – обонятельная булава; бт – базальное тельце. Масштаб: 1 мкм.

друг к другу, заполняя практически все свободное пространство цитоплазмы вблизи ядра. В некоторых нейронах такие образования обнаруживаются не только в центральной части, вблизи ядра, но и на всем протяжении дендрита (периферического отростка), включая вершину клетки. Важно отметить, что вакуоли не встраиваются в поверхностную мембрану клетки, оставаясь в пределах ее апикального участка. Обонятельная булава таких вакуолизированных рецепторных клеток, как правило, имеет низкую электронную плотность и не содержит целостных базальных телец и жгутиков, а у клеток микровиллярного типа – микровилл. Нужно отметить, что в пределах эпителия обнаруживаются также рецепторные нейроны со сходными внутриклеточными дегенеративными изменениями, однако их вершины еще сохраняют свойственный им плотный осмиофильный матрикс и четко выраженный хемочувствительный аппарат (**рис. 91, в, г**). В приядерной зоне и в периферическом отростке обонятельных клеток голомянки располагаются мелкие (0,2–0,3 мкм) немногочисленные митохондрии округлой или вытянутой формы с редкими кристами без признаков набухания и дегенерации. Данные конфокальной микроскопии, в которой использовался MitoTracker® Red, окрашивающий только функционально активные митохондрии, свидетельствуют о высокой степени сохранности данных органелл (**рис. 92**). Медиана их объема в 1×10^6 мкм³ эпителия составляет 10640 мкм³ (**рис. 100, а**). Несмотря на слабый уровень развития внутриклеточных органелл, в рецепторных клетках выявляются отчетливо выраженные элементы цитоскелета – микротрубочки. Они образуют плотные пучки в дендрите клетки, располагаясь между находящимися здесь вакуолями и митохондриями, проникая в вершину клетки – обонятельную булавку. На поперечных срезах дендритов видно, что кроме продольно расположенных микротрубочек здесь локализуются также и немногочисленные, горизонтально ориентированные нейрофиламенты. Они представлены в виде одиночных разнонаправленных нитей, которые в

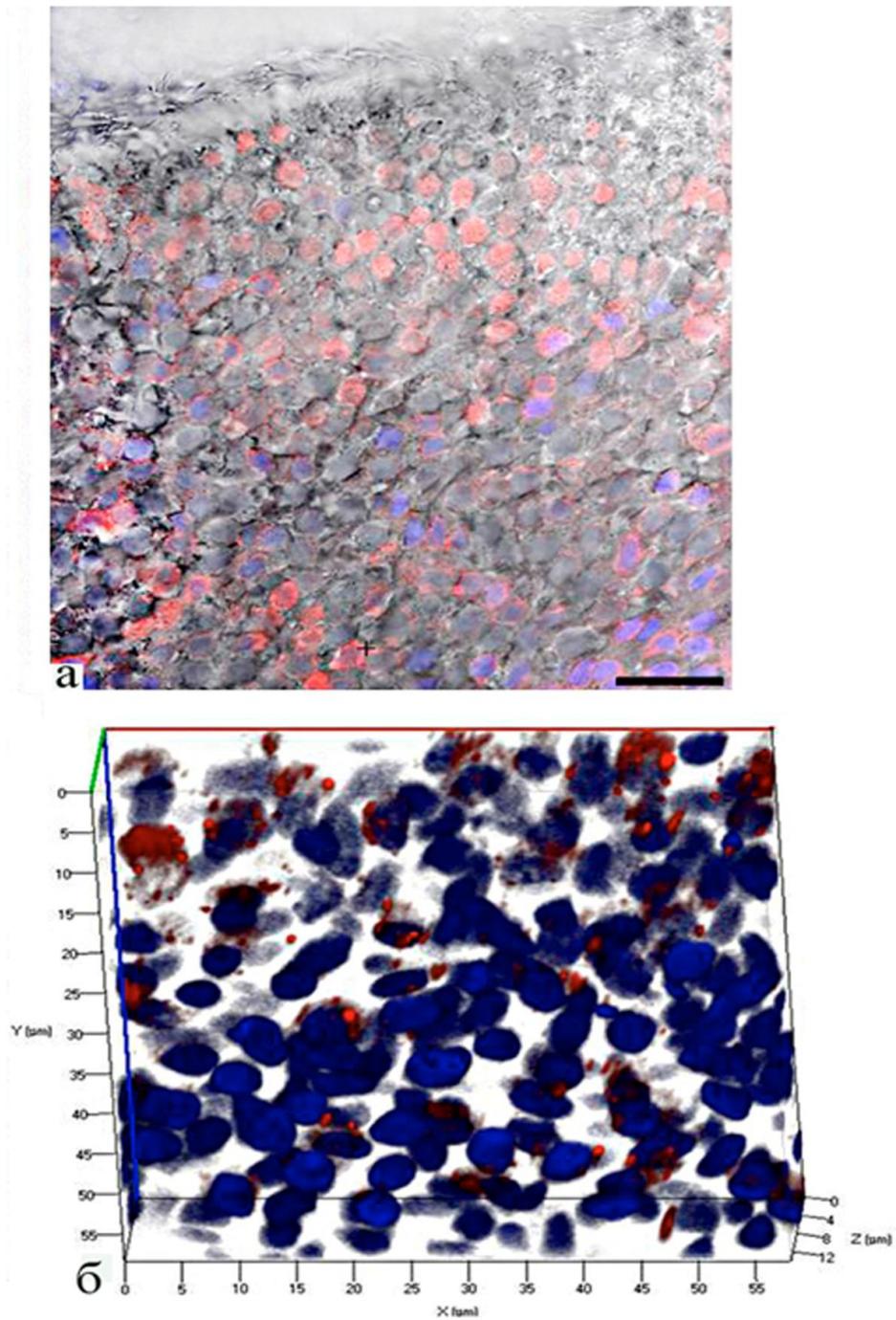


Рисунок 92. Цитохимическое окрашивание участков ольфакторного эпителия у большой голомянки (конфокальная микроскопия). А – режим «на просвет»; б – 3D-реконструкция фрагмента ткани. Ядра клеток (синий) окрашены DAPI, митохондрии (красный) – MitoTracker® Orange.

поперечном направлении прослеживаются на всем протяжении дендрита (рис. 93).

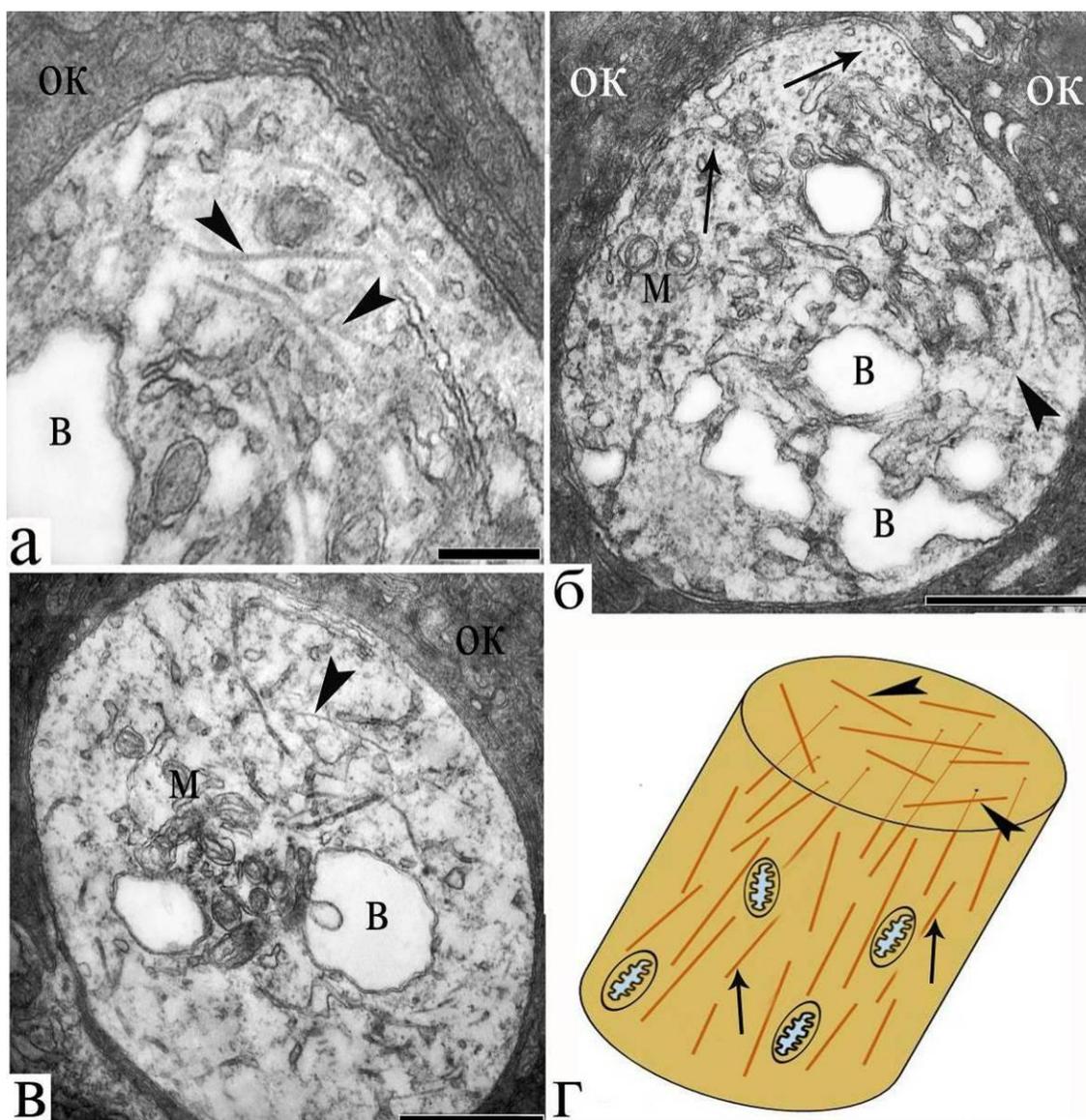


Рисунок 93. Особенности локализации микротрубочек в дендритах обонятельных клеток у большой голомянки. А – в – поперечные срезы дендритов; г – схема взаимной ориентации микротрубочек в дендрите рецепторных клеток. Условные обозначения: ок – опорные клетки; м – митохондрии; в – вакуоли; фигурные стрелки – поперечное; простые стрелки – продольное расположение микротрубочек относительно вертикальной оси дендрита. Масштаб: 1 мкм.

Длиннокрылая широколобка (C. inermis).

Как и у голомянки, цитоплазма многих опорных клеток обычно имеет повышенную осмиофильность, благодаря чему на их фоне отчетливо выявляются тела и отростки более светлых обонятельных нейронов. Уровень

внутриклеточного развития чувствительных клеток в целом аналогичен таковому у голомянок. Кроме клеток с выраженными деструктивными изменениями в эпителии также обнаруживаются клетки с более-менее сохранными телами и их дендритами, включая вершину (**рис. 94**). В просветленном матриксе цитоплазмы выявляется неактивный аппарат Гольджи и расширенные каналы эндоплазматического ретикулума с признаками вакуолизации. В периферическом отростке нейронов содержатся многочисленные вакуоли различного диаметра (0,1–0,7 мкм) и светлым содержимым. Аналогичные по размерам и электронной плотности пузырьки в большом количестве обнаруживаются также и в опорных клетках, преимущественно в верхних слоях эпителия. Кроме того, на разноплоскостных срезах хорошо видно, что в дендритах рецепторных клеток выявляются хорошо выраженные микротрубочки и ориентированные вдоль дендрита митохондрии, сохранившие свою ультраструктурную организацию (**рис. 95**). Характерно, что в отдельных участках эпителия среди электроноплотных опорных клеток часто обнаруживаются профили рецепторных клеток с очень крупными вакуолями, занимающими существенный объем периферического отростка клетки. Причем, характерно, что даже при такой значительной вакуолизации дендритов, в сохранившихся участках цитоплазмы митохондрии поддерживают свою структуру. Они имеют свойственную для них форму, немногочисленные кристы и отдельные гранулы гликогена (**рис. 96, а, б**). Конфокальная микроскопия подтверждает их высокую функциональную стабильность (**рис. 96, в, г**) на значительных по объему участках обонятельного эпителия (медиана в 1×10^6 мкм³ эпителия равна 9337 мкм³) (**рис. 100, б**).

В эпителии выявляются также обширные зоны, где локализируются незаполненные внутриклеточным материалом пустые профили рецепторных клеток. О том, что здесь раньше располагались нейроны, напоминают их характерные контуры и, иногда, частично сохранившиеся органеллы.

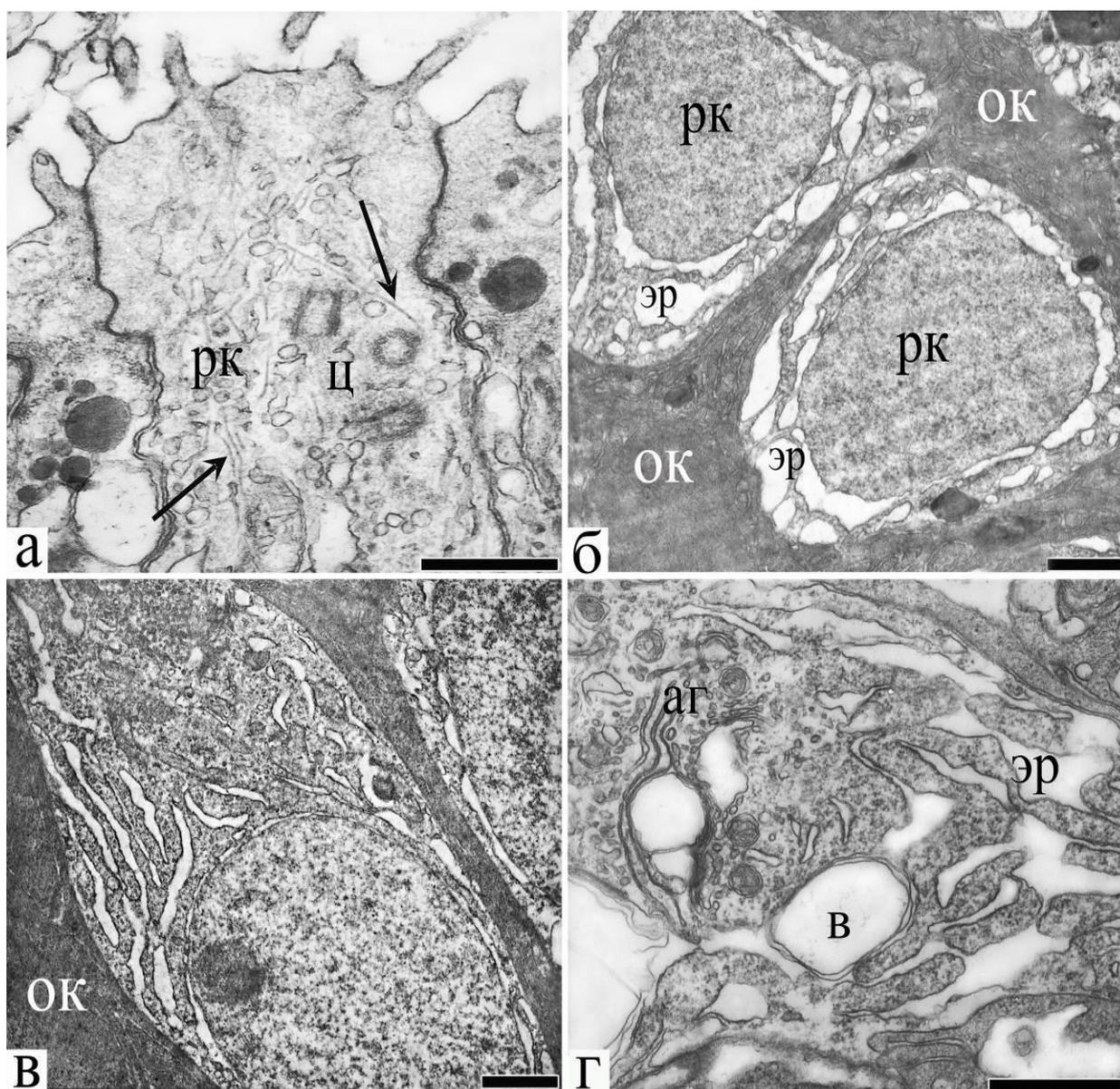


Рисунок 94. Цитологические особенности рецепторных клеток у длиннокрылой широколобки. А – апикальный участок рецепторной клетки микровиллярного типа в контакте с вершинами опорных клеток (стрелками показаны микротрубочки); б, в – поперечные и продольные профили чувствительных клеток, окруженные телами опорных клеток; г – цитоплазма рецепторного нейрона с признаками сильной вакуолизации органелл. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка; аг – аппарат Гольджи; эр – эндоплазматический ретикулум; ц – центриоли; в – вакуоль. Масштаб: 1 мкм.

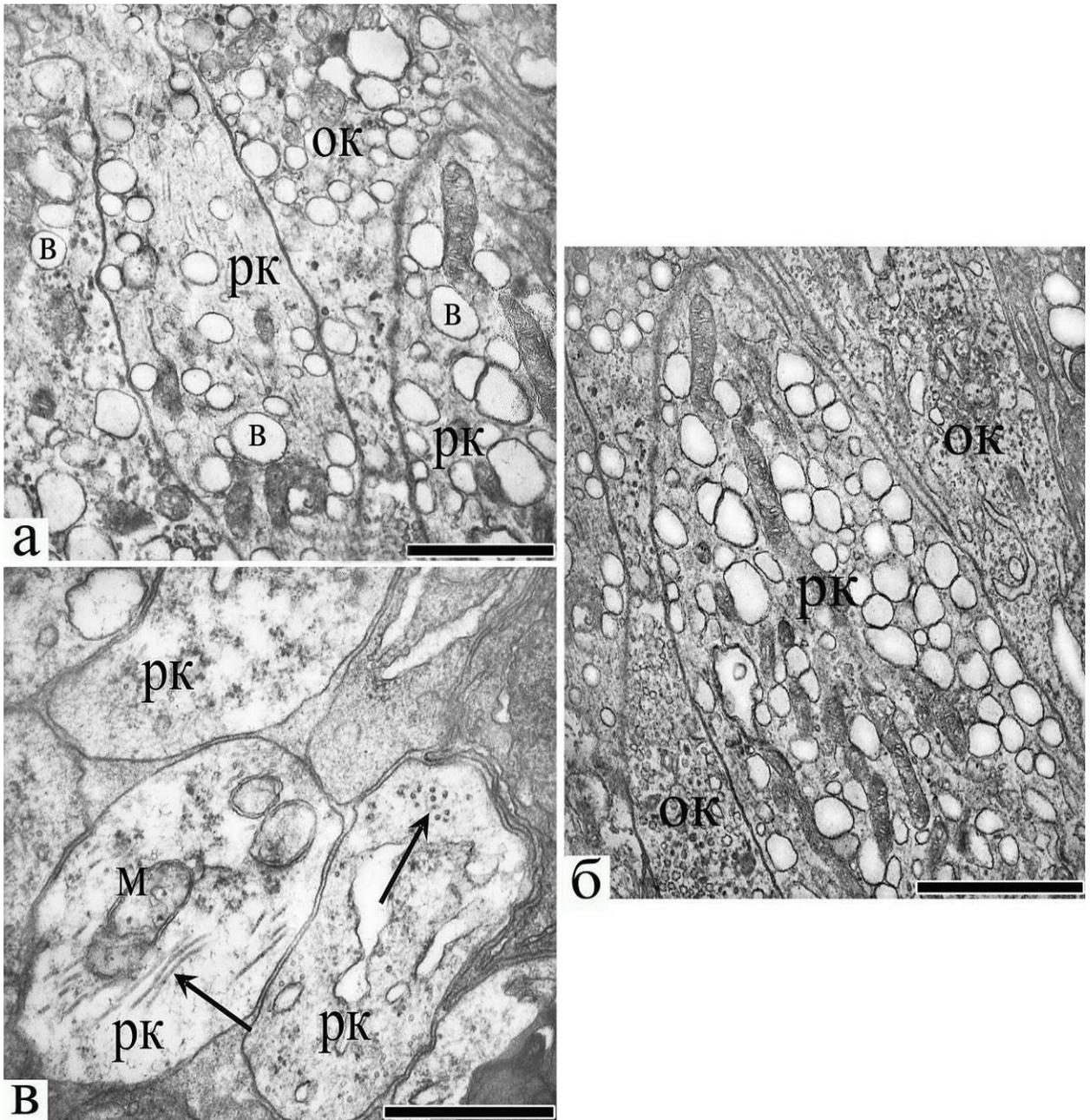


Рисунок 95. Вакуолизация опорных и рецепторных клеток (срезы на уровне дендритов) у длиннокрылой широколобки. А, б – большое количество пузырьков между сохранными митохондриями; в – различным образом ориентированные микротрубочки показаны стрелками. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка; в – вакуоль. Масштаб: 2 мкм.

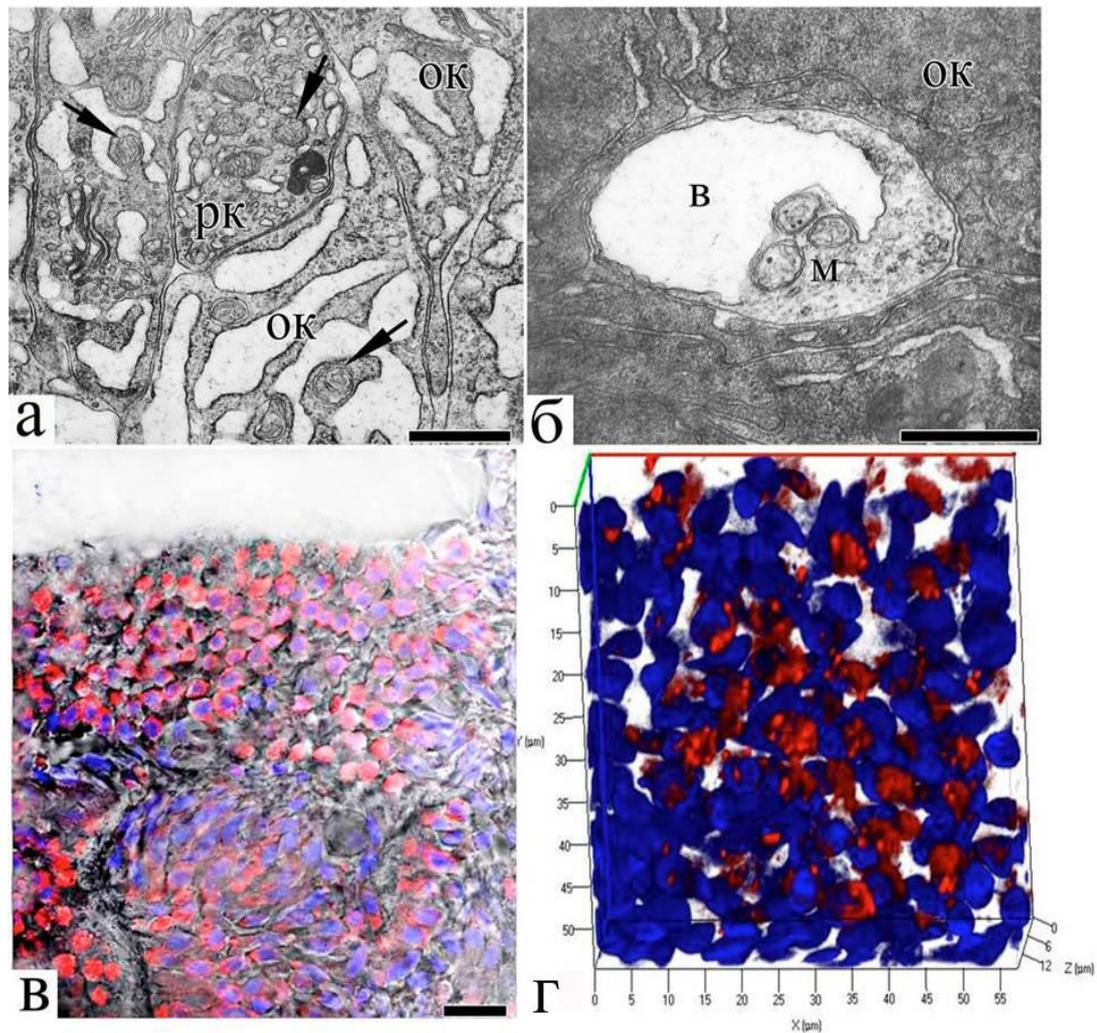


Рисунок 96. Цитохимические особенности цитоплазмы рецепторных и опорных клеток в ольфакторном аппарате у длиннокрылой широколобки. А – видны расширенные каналы шероховатого эндоплазматического ретикулума, вакуоли и сохранные митохондрии (показаны стрелками); б – крупная вакуоль в цитоплазме дендрита и сохранившие свою структуру митохондрии с гранулами гликогена; в, г – цитохимическое окрашивание участков ольфакторного эпителия (конфокальная микроскопия); в – режим «на просвет»; г – 3D-реконструкция фрагмента ткани. Ядра клеток (синий) окрашены DAPI, митохондрии (красный) – MitoTracker® Orange. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; ок – опорная клетка; в – вакуоль; м – митохондрии. Масштаб: а, б – 1 мкм; в – 25 мкм.

Интересно, что в таких участках эпителия дегенеративные изменения чувствительных клеток не распространились на близлежащие опорные клетки, сохраняющие свои границы и уплотненный матрикс (**рис. 97**).

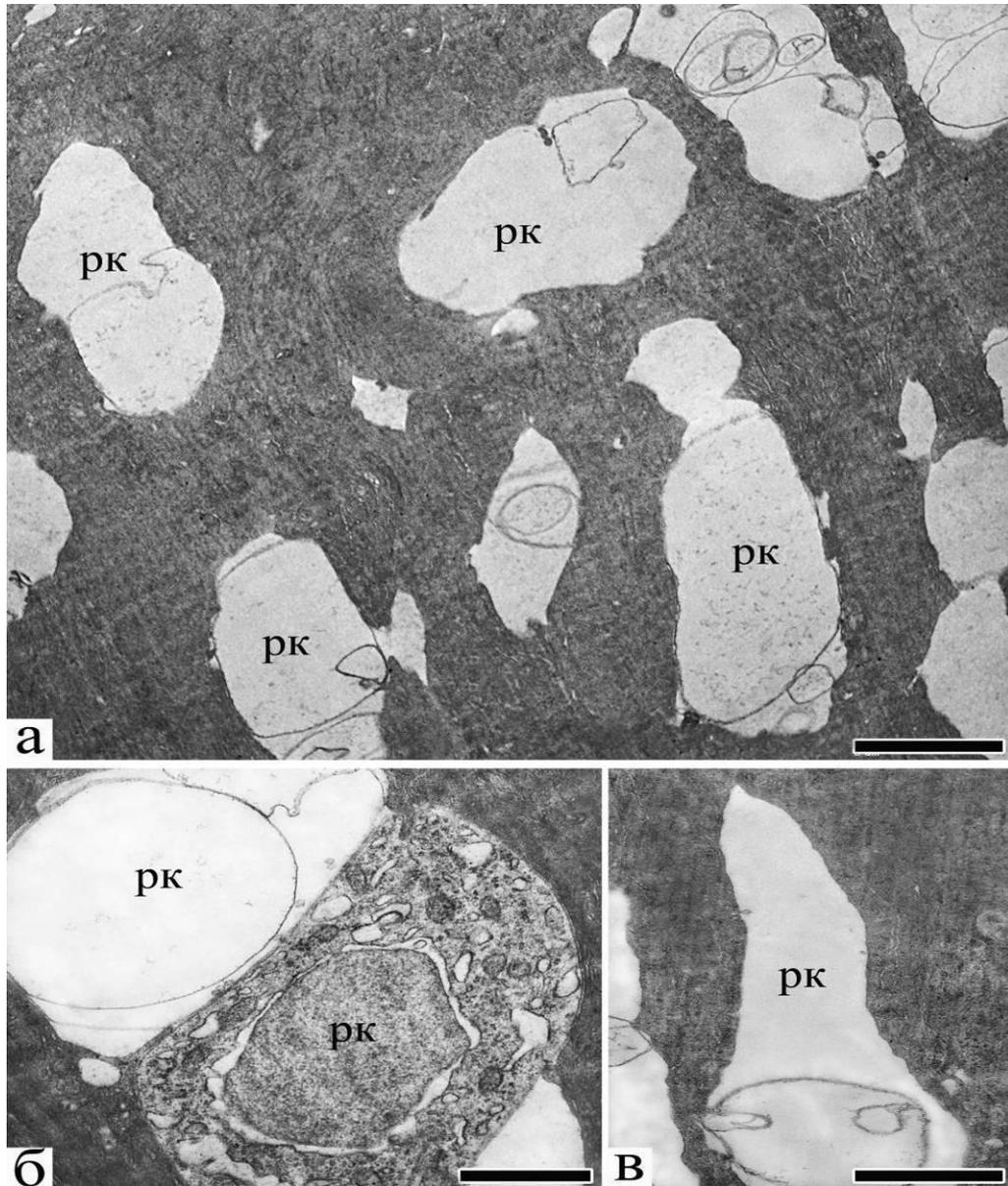


Рисунок 97. Нейродегенеративные процессы в ольфакторном эпителии у длиннокрылой широколобки. А – пустые профили многочисленных рецепторных нейронов в окружении опорных клеток; б – два рядом расположенных тела нейронов с различным состоянием цитоплазмы; в – контуры тела и периферического отростка обонятельной клетки с частично сохранившимися компонентами ядра. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка. Масштаб: а – 10 мкм; б – 2 мкм; в – 5 мкм.

Жирная широколобка (B. nikolskii).

В отличие от пелагических рыб, рецепторные клетки обонятельного эпителия жирной широколобки содержат хорошо развитый аппарат Гольджи и насыщены как свободными, так и связанными с каналами эндоплазматического ретикулума рибосомами. Характерной особенностью клеточных элементов эпителия является наличие в них многочисленных гранул липофусцина (**рис. 98, а–в**). В чувствительных клетках пигментные включения обычно локализуются как в теле, так и в разных участках дендрита. Как правило, такие гранулы имеют неправильную форму и повышенную электронную плотность. Размер пигментных образований в среднем составляет от 0,2 до 1 мкм. Крупные агрегаты липофусцина обычно располагаются в теле клетки и часто по величине соизмеримы с размером ядра. Внутри отдельной чувствительной клетки иногда выявляются профили 2–4 таких образований. Анализ разноплоскостных срезов через ольфакторную розетку показывает, что в целом объем данного пигмента в исследуемом материале довольно значителен и в одинаковой степени выявляется в цитоплазме как рецепторных, так и опорных клеток. В обоих типах клеток наблюдается фрагментация и вакуолизация каналов эндоплазматического ретикулума, а также частичное, или полное набухание митохондрий (**рис. 98, г; 99, а**). Особенно это касается нервных клеток, тела которых располагаются в нижних слоях эпителия. Судя по всему, в результате вакуолизации митохондрии теряют свою активность и далее подвергаются распаду. Об этом же свидетельствуют данные конфокальной микроскопии, при которой выявляется незначительное число цитохимически окрашенных митохондрий (**рис. 99, б, в**). Анализ содержания митохондрий в Z-стеках обонятельного эпителия жирной широколобки показывает, что в сравнении с вышеописанными пелагическими рыбами, количество функционально активных митохондрий в сенсорном эпителии снижено в 2

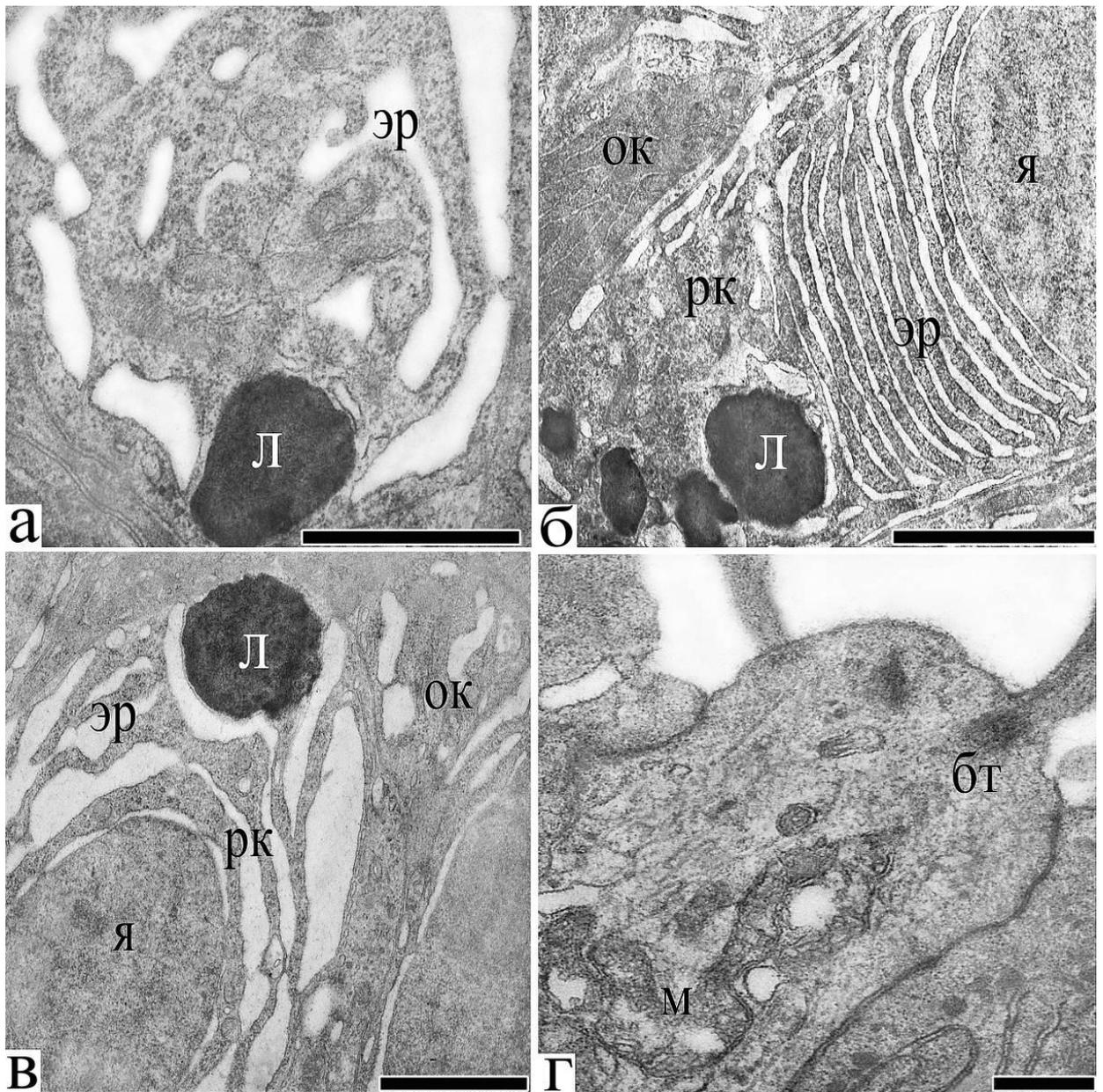


Рисунок 98. Морфологические особенности обонятельного эпителия у жирной широколобки, которая ведет придонный образ жизни. А – в – цитоплазма рецепторных клеток с гранулами липофусцина и вакуолизированным эндоплазматическим ретикуломом; г – вершина клетки с деструктивными изменениями митохондрии. Условные обозначения: рк – рецепторная клетка; л – лизосомы; эр – эндоплазматический ретикулум; ок – опорная клетка; бт – базальное тельце. Масштаб: а–в – 2 мкм; г – 0,3 мкм.

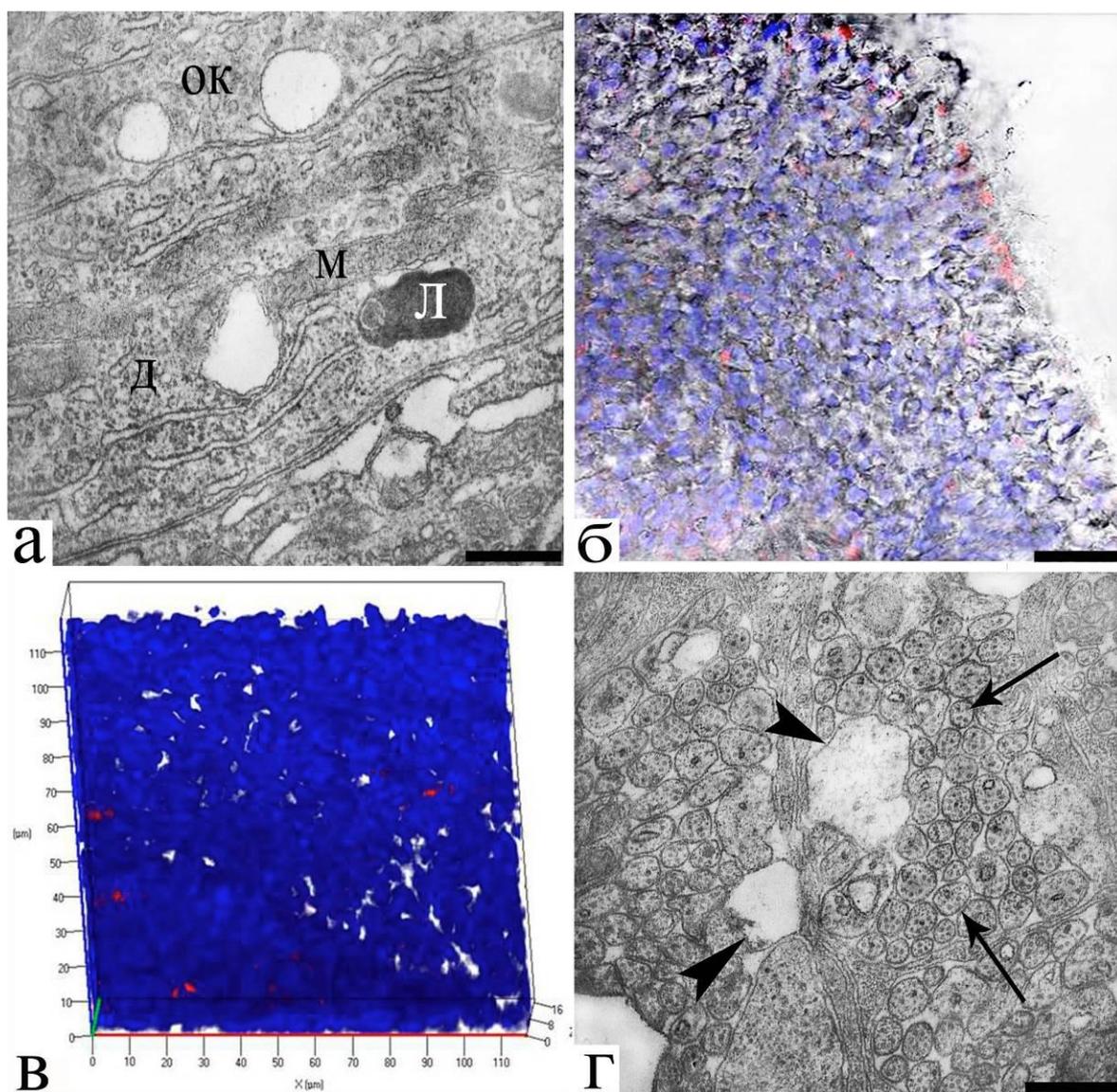


Рисунок 99. Цитохимические особенности ольфакторного эпителия у жирной широколобки. А – фрагмент дендрита рецепторной клетки с гранулой липофусцина и митохондриями с признаками вакуолизации; б, в – цитохимическое окрашивание участков ольфакторного эпителия (конфокальная микроскопия); б – режим «на просвет»; в – 3D-реконструкция фрагмента ткани. Ядра клеток (синий) окрашены DAPI, митохондрии (красный) – MitoTracker® Orange; г – сохранные (простые стрелки) и вакуолизованные (фигурные стрелки) центральные отростки обонятельных нейронов в базальных отделах эпителия. Масштаб: а – 0,5 мкм; б – 25 мкм; г – 0,5 мкм.

раза ($p=0,047$) в сравнении с голомянкой и в 1,7 раз ($p=0,119$) в сравнении с длиннокрылой широколобкой (рис. 100, в).

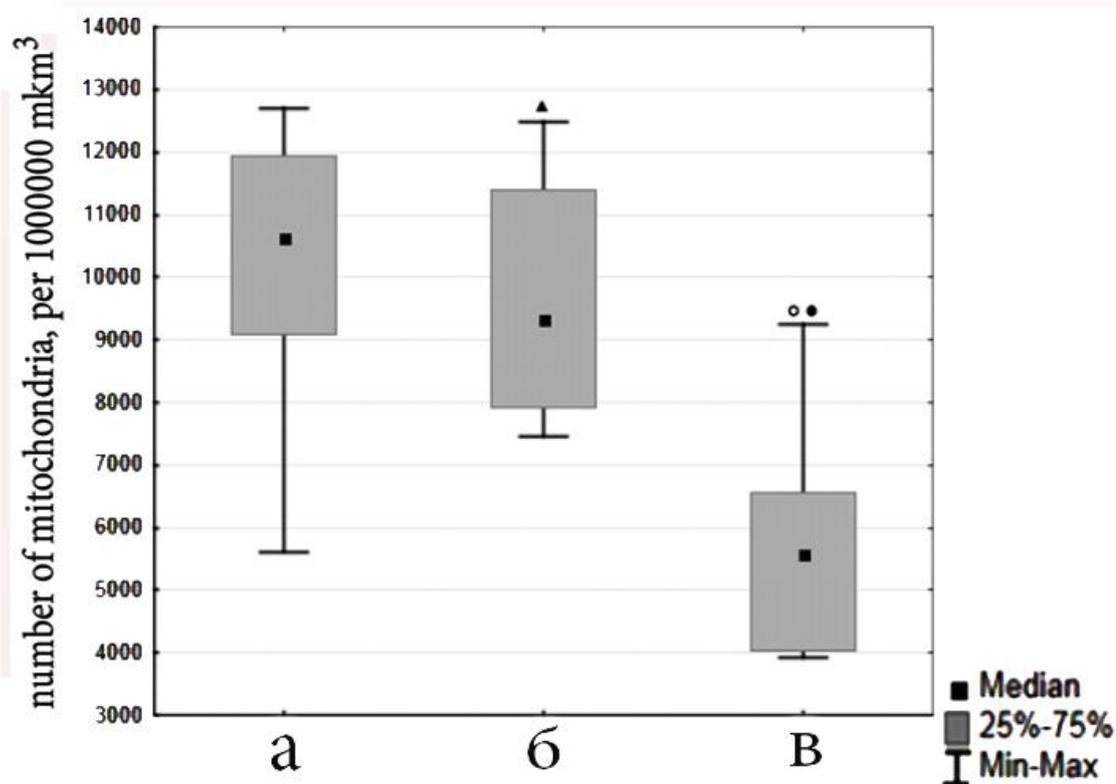


Рисунок 100. Количество функционально-активных митохондрий в $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ обонятельного эпителия у эндемичных рыб озера Байкал (а – голомянка, б – длиннокрылая широколобка, в – жирная широколобка). ▲ – $p=1,000$ в сравнении с голомянкой; ○ – $p=0,047$ в сравнении с голомянкой; ● – $p=0,119$ в сравнении с длиннокрылой широколобкой.

Нарушения структурной целостности обнаруживаются не только в дендрите и перикарионе рецепторных клеток, но и в их центральных отростках. У таких нейронов профили аксонов обычно в разной степени расширены и хорошо заметны на фоне центральных отростков других, сохранивших свою структуру обонятельных клеток. Они лишены нейрофиламентов, целостных митохондрий и по сравнению с центральными отростками жизнеспособных нейронов имеют ярко выраженную пониженную электронную плотность аксоплазмы (рис. 99, г). Оценка

морфологического состояния поперечных срезов пучков аксонов показывает, что число подвергшихся дегенерации обонятельных нейронов в среднем составляет 5–10 %. В эти цифры, вероятно, входят и клетки, разрушенные в процессе их естественной гибели, которая, как известно, постоянно происходит в эпителии на протяжении всей жизни животного [Graziadei G, Graziadei P, 1979].

7.1 Общие закономерности адаптации обонятельного аппарата рогатковидных рыб с разной стратегией пищевого поведения к глубоководному образу жизни

Проведенные исследования показывают, что особенности ультраструктурного развития обонятельных клеток у байкальских пелагических и донных рыб определяются совокупным действием разных факторов, в том числе и спецификой их поведения, которое еще во многом остается малоизученным. Известно, что в процессе жизнедеятельности пелагические рыбы осуществляют вертикальные миграции в толще воды, испытывая при этом резкие изменения гидростатических давлений. Кроме того, в Байкале существует градиент распределения органических веществ: с увеличением глубины их концентрация падает и только непосредственно у грунта вновь возрастает за счет продуктов распада диатомовых водорослей, зоопланктона, а также донных гидробионтов и продуктов их жизнедеятельности [Тарасова, 1975; Вотинцев и др., 1975]. Причем, такое распределение биогенных веществ неустойчиво вследствие перемешивания воды и сезонных колебаний их потребления и регенерации биотой [Грачев, 2002; Домышева, 2009]. Как показывают недавние исследования, уровень развития обонятельной системы животных во многом предопределяется не только возрастом, но и индивидуальным опытом их взаимодействия с обонятельными стимулами [Mandairon *et. al.*, 2006]. Эти адаптивные свойства хеморецепторного аппарата важны особенно для пелагических рыб, которые

перемещаются в разные водные горизонты, в связи с чем, их рецепторные клетки находятся в постоянно меняющихся физико-химических условиях внешней среды. Возможно, что все вышеперечисленные факторы могут существенно отражаться на ультраструктурных показателях хемочувствительных клеток рыб.

Установлено, что высокий уровень дегенеративных изменений, выявленный в клетках обонятельного эпителия у исследованных рыб, не характерен для них в норме. Вероятно, эти перестройки возникли в процессе гипобарической гипоксии, развивающейся у рыб при быстром подъеме на поверхность для отбора материала. Недавние исследования показывают, что обонятельные розетки очень чувствительны к дефициту кислорода и в условиях гипоксии в них значительно возрастают процессы апоптоза и связанного с ним нейрогенеза [Kuciel, 2014]. На препаратах видно, что цитологические нарушения, происходящие в процессе декомпрессии, в разной степени проявляются во всех клеточных элементах обонятельного эпителия. Особенно они касаются нейронов, хорошо выделяющихся на фоне осмиофильных опорных клеток. Причем, если проследить степень ультраструктурных повреждений клеток по высоте их расположения относительно базальной мембраны, то можно видеть, что процессы деструкции клеток развивались по направлению от нижних слоев эпителия к его поверхности. Вследствие этого, на тотальных продольных срезах эпителия можно наблюдать, что внутриклеточные органеллы перикарионов чувствительных нейронов в той или иной степени уже подверглись разрушению, а апикальные фрагменты отходящих от них дендритов сохраняют свою целостность, включая хемочувствительные реснички (либо микровиллы). Кроме того, в отдельных участках эпителия выявлялись также большие зоны с профилями нейронов с полностью отсутствующим содержимым.

Таким образом, можно отметить, что, дегенеративные изменения рецепторных клеток часто носили неоднородный, выборочный характер. Об

этом же свидетельствует феномен избирательных деструктивных перестроек центральных отростков рецепторных клеток, наиболее ярко проявившийся в ольфакторном эпителии у жирной широколобки. Кроме того, обращают на себя внимание хорошо выраженные только у пелагических рыб факты структурной стабильности одного из функционально важных компонентов клеток – митохондрий, являющихся, как известно, наиболее уязвимой мишенью при гипоксии [Vettier *et. al.*, 2006]. Это положение подтверждается также и сравнительными оценками количества функционально активных митохондрий, содержащихся в одинаковых объемах обонятельного эпителия исследованных рыб (**рис. 100.э**). На представленных графиках хорошо видно, что у пелагических рыб плотность сохранных митохондрий в среднем в 2 раза выше, чем у рыб, которые ведут придонный образ жизни. В связи с этим, возникает вопрос – существуют ли на уровне периферического отдела обонятельного анализатора рыб специальные механизмы, которые могли бы в экстремальных условиях острой гипоксии обеспечивать сохранность клеток и их органелл, в частности, митохондрий? Как уже отмечалось, пелагические рыбы в ходе пищевого поведения периодически перемещаются вслед за объектами своего питания из глубины в область низких гидростатических давлений и наоборот. Не исключено, что такой, повторяющийся режим действия высоких и низких давлений мог обеспечить в эволюции рыб формирование соответствующих метаболических адаптаций. О наличии таких приспособлений говорят эксперименты, в которых прибрежные рыбы приобретали устойчивость к действию высоких давлений и сохраняли это свойство в течение нескольких суток [Simon *et. al.*, 1989]. Исходя из этого, можно предположить, что хорошая сохранность митохондрий в чувствительных клетках мигрирующих в толще Байкала рыб может быть обусловлена протективным эффектом гипоксического прекондиционирования, обнаруженном недавно в экспериментах на млекопитающих. Так, показано, что содержание животных в условиях интервальной гипобарической гипоксии приводит к активации адаптивных

генетических механизмов, повышающих устойчивость мозга к дефициту кислорода [Самойлов, 2007; Рыбникова и др., 2007]. Установлено, что процессы нейропротекции включают активацию ранних генов, антиапоптозных факторов, цитозольных и митохондриальных антиоксидантов, металлопротеаз, белков теплового шока и других компонентов, обеспечивающих устойчивость нервных клеток к действию негативных факторов при острых ишемических повреждениях мозга. Нужно сказать, что эти данные были получены в экспериментах на наземных млекопитающих, эволюционно не приспособленных к гипоксии, т.к. их жизнедеятельность всегда протекает в условиях относительно стабильных давлений. На основании этого можно полагать, что у рыб, обитающих в широком диапазоне гидростатических давлений, могут существовать механизмы, которые обеспечивают их более высокую резистентность к недостатку кислорода, что представляет не только высокий научный, но и практический интерес. Прикладное значение этих исследований может быть обусловлено перспективой выявления у рыб молекулярных нейропротекторов, повышающих устойчивость мозга к ишемическим повреждениям, которые, как известно, сопряжены с развитием ряда социально значимых нейродегенеративных заболеваний [Pluta, 2004]. Решение этих вопросов требует дальнейших исследований. Тем не менее, на основании полученных данных можно сказать, что байкальские пелагические гидробионты являются во многом уникальными природными объектами, которые могут быть использованы не только для изучения адаптивных механизмов обонятельной системы, но и мозга в целом.

Сравнительные морфологические исследования свидетельствуют о том, что обонятельные клетки жирной широколобки имеют более высокий уровень развития, чем аналогичные клетки у пелагических рыб. Они содержат развитую сеть каналов эндоплазматического ретикулума и высокую плотность, как свободных, так и связанных с каналами эндоплазматического ретикулума рибосом. По-видимому, это обусловлено

тем, что в отличие от пелагических видов, жирная широколобка находится в условиях высокой сенсорной нагрузки на обоняние в связи с ее донным образом жизни в абсолютной темноте, где среда более насыщена органическими веществами различного происхождения.

Характерно, что клетки периферического отдела ольфакторной системы глубоководных рыб содержат довольно большое количество липофусцина. Наличие данного пигмента в обонятельном эпителии уже давно отмечалось во многих работах [Graziadei G., Graziadei P., 1979; Naguro, Iwashita, 1992]. В настоящее время нет однозначного толкования относительно происхождения и роли липофусцина во внутриклеточном обмене. Разные авторы относят его либо к пигменту старения [Double *et. al.*, 2008; Sulzer *et. al.*, 2008], либо к включениям, появление которых связано с развитием патологических процессов в клетках животных, независимо от их возраста [Tuunela, 2004]. Данные протеомного анализа липофусцина мозга человека и крысы свидетельствуют о наличии в его составе белков митохондрий, цитоскелета и плазматической мембраны, что объективно характеризует данный пигмент как продукт деградации данных органелл [Ottis *et. al.*, 2012]. В этой связи, логично предположить, что увеличенное содержание липофусцина в обонятельном эпителии глубоководных рыб может указывать на усиленные процессы аутофагии, необходимой для утилизации внутриклеточных компонентов, поврежденных в условиях перепадов гидростатических давлений и гипоксии. Известно, что наиболее негативным для клетки эффектом обладают функционально поврежденные митохондрии, которые продуцируют активные формы кислорода и высвобождают в цитозоль индукторы апоптоза [Braun *et. al.*, 2012]. По этой причине, процесс своевременной утилизации поврежденных митохондрий может быть важным звеном в поддержании внутриклеточного гомеостаза при гипоксии. Можно предположить, что наблюдаемое нами накопление липофусцина на фоне морфологически сохранных митохондрий является

следствием высокой интенсивности одновременно протекающих в клетках процессов митофагии и биогенеза митохондрий.

В связи с обнаружением в составе липофусциновых гранул каротиноидов было также высказано предположение о том, что каротиноиды могут выполнять функцию депонирования кислорода, позволяющего клеткам компенсировать малую скорость поступления кислорода при его низком парциальном давлении [Карнаухов, 1971]. При глубоководном погружении на дно озера можно было видеть, что жирные широколобки в основном малоподвижны и находятся на грунте, частично погрузившись в ил. Данные гидрохимии показывают, что содержание кислорода в воде Байкала составляет от 9 до 14 мг O_2 /л, а непосредственно в пограничном с грунтом слое воды, где чаще всего находятся донные бычки, существенно снижается. [Martin *et. al.*, 1998]. Не имея данных об особенностях обмена газов в тканях, мы не можем достоверно говорить о том, что рыбы в таких условиях могут испытывать гипоксию и в связи с этим, с помощью липофусцина, аккумулируют необходимое количество кислорода. Это также касается и пелагических рыб, осуществляющих периодические вертикальные миграции в толще воды. Только на основании морфологических данных сложно определить – чем обусловлено высокое содержание пигмента в клетках обонятельных розеток глубоководных байкальских рыб: возрастными изменениями, либо этот феномен носит адаптивный характер и связан с поддержанием окислительных процессов в нейроэпителии, и/или повышенным внутриклеточным уровнем аутофагии.

Другой важной особенностью обонятельных нейронов пелагических рыб является наличие в их дендритах хорошо развитой системы микротрубочек. Известно, что в составе нейронов цитоскелет выполняет очень важную структурно-функциональную нагрузку [Косицын, 1976; Conde, Cáceres, 2009]. Он предопределяет пространственную поляризацию клетки и в составе дендритов обычно характеризуется динамической нестабильностью, природа которой в последнее время главным образом

исследуется в дендритических шипиках центральных нейронов [Burbank, Mitchison, 2006; Urbanska *et. al.*, 2012]. Что касается молекулярных механизмов регуляции сборки микротрубочек и их участия в обеспечении рецепторных свойств обонятельных клеток, то до настоящего времени этот вопрос еще слабо освещен [Burton, 1992]. В этом смысле, для изучения цитоскелета интересными могут быть не только данные, полученные *in vitro* на изолированных культурах обонятельного эпителия [Goetze *et. al.*, 2002; Micholt *et. al.*, 2012], но и результаты исследования адаптивных свойств рецепторных клеток у животных, взятых как из естественной среды, так и после их содержания в контролируемых физико-химических условиях [Drazen, *et. al.*, 2005].

Как уже было сказано выше, микротрубочки являются наиболее характерными компонентами отростков нервных клеток не только у гидробионтов, но и у других групп животных. Поэтому мы не можем связывать наличие микротрубочек в рецепторных клетках глубоководных рыб с их приспособлением к действию высоких гидростатических давлений. В главе 4 отмечалось, что элементы цитоскелета в обонятельных клетках прибрежных байкальских рогатковидных рыб обнаруживаются только в нерестовый период – при их настройке на восприятие половых феромонов [Косицын и др., 1990; Косицын, Клименков, 1994]. Кроме того, нами установлено, что микротрубочки в дендритах хеморецепторных клеток рыб (*Barbus tetrazona tetrazona* Bleeker) формируются после их длительного (7 суток) содержания в обедненной органическими веществами воде [Клименков, Косицын, 2008]. Важно отметить, что в данных условиях формирование нейрофиламентов происходило на фоне значительного снижения электронной плотности цитоплазмы и существенного уменьшения уровня развития других внутриклеточных органелл. Эксперименты с длительным содержанием рыб в данных условиях среды показывают, что хорошо организованная система продольных и поперечных элементов цитоскелета в дендритах обонятельных клеток глубоководных рыб является

необходимым фактором поддержания их структурной целостности при низком содержании в воде обонятельных стимулов – органических веществ, что характерно для олиготрофного озера Байкал.

Известно, что микротрубочки непосредственно обеспечивают везикулярный транспорт участвующих в рецепторном процессе молекул и их комплексов от места синтеза в теле клетки к ее вершине [Burton, 1992]. В связи с этим, можно предположить, что микротубулярный аппарат функционально ослабленной хеморецепторной клетки не только препятствует дегенеративным изменениям дендрита, но и определенное время способствует сохранению необходимого уровня его рецепторной функции. С учетом наших ранних работ [Косицын и др., 1990; Косицын, Клименков, 1994], можно сказать, что цитоскелет в обонятельных нейронах принимает высокоструктурированную форму не только при их значительных функциональных нагрузках в период нереста, но и в условиях низкого содержания в воде биологически значимых химических агентов. Все эти факты указывают на то, что у глубоководных рыб, обитающих в обедненной органическими веществами среде, микротрубочки могут обеспечивать сохранность формы и объема дендрита в клетках, не вовлеченных в активные процессы хеморецепции. В рамках данного обсуждения можно также полагать, что в пределах обонятельного эпителия структурно-функциональная характеристика рецепторных нейронов для каждого из них должна быть строго индивидуальна и не может носить общий характер. Это связано с тем, что рецепторные свойства первичночувствующих клеток, по-видимому, существенно зависят не только от их исходной генетически обусловленной чувствительности [Buck, Axel, 1991], но и от влияния на их генную экспрессию факторов внешней среды [Harden *et. al.*, 2006] и возможностью дальнейшей стимул-зависимой дифференцировки [Клименков и др., 2011].

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что быстрый подъем глубоководных рыб на поверхность сопровождается

дегенеративными изменениями в структуре обонятельных клеток. Показано, что степень таких перестроек существенно зависит от образа жизни рыб. Морфологические исследования, а также количественный анализ функционально активных митохондрий в клетках сенсорного эпителия свидетельствуют о том, что в ходе гипобарической гипоксии клетки обонятельного эпителия жирной широколобки (типичного представителя донных байкальских рыб с малоподвижным образом жизни) претерпевают наиболее выраженные деструктивные перестройки. В сравнении с донными рыбами, обонятельный аппарат большой голомянки и длиннокрылки, пищевое поведение которых сопряжено с постоянными вертикальными миграциями и изменениями режимов гидростатических давлений, в большей степени адаптирован для поддержания его структурно-функциональной целостности. Полученные цитологические данные могут иметь важное значение для понимания фундаментальных механизмов, обеспечивающих устойчивое функционирование обонятельной системы животных при разных условиях их существования.

ГЛАВА 8. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУХОВОГО САККУЛЯРНОГО АППАРАТА У РОГАТКОВИДНЫХ (СЕМ. СОТТИДАЕ) И СИГОВЫХ (СЕМ. COREGONIDAE) РЫБ ОЗЕРА БАЙКАЛ

8.1 Морфологическая организация саккулюса у рогатковидных рыб

8.1.1 Ультраструктура сенсорных клеток и особенности их топографического расположения в саккулярном эпителии

У исследованных видов рогатковидных рыб саккулярная макула располагается на медиальной стороне отолитового органа, имеет вытянутую (до 0,8 мм) форму и ориентирована в ростро-каудальном направлении. У большой и малой голомянок максимальная ширина макулы, как правило, приходится на ростральную часть и в среднем равна 0,2 мм. К каудальному концу макула сужается до 0,1 мм. Максимальная ширина макулы у каменной широколобки и северобайкальской желтокрылки составляет 0,2 мм и приходится на центральную часть, а минимальная (0,1 мм) – на каудальную зону.

В состав макулы входят волосковые (рецепторные) и опорные клетки – микровиллярные эпителиоциты. У изученных видов рыб плотность волосковых клеток на единицу поверхности сенсорного эпителия, как правило, выше в ростральном и каудальном участках макулы (**рис. 101**).

В центральной зоне макулы волосковые клетки располагаются на значительном расстоянии друг от друга, особенно у голомянок (**рис. 102**). Средняя плотность волосковых клеток составила: у большой голомянки – 28 тыс. клеток/мм²; у малой голомянки – 27 тыс. клеток/мм²; у северобайкальской желтокрылки – 46 тыс. клеток /мм² и у каменной широколобки – 34 тыс. клеток /мм² (**табл. 2**).

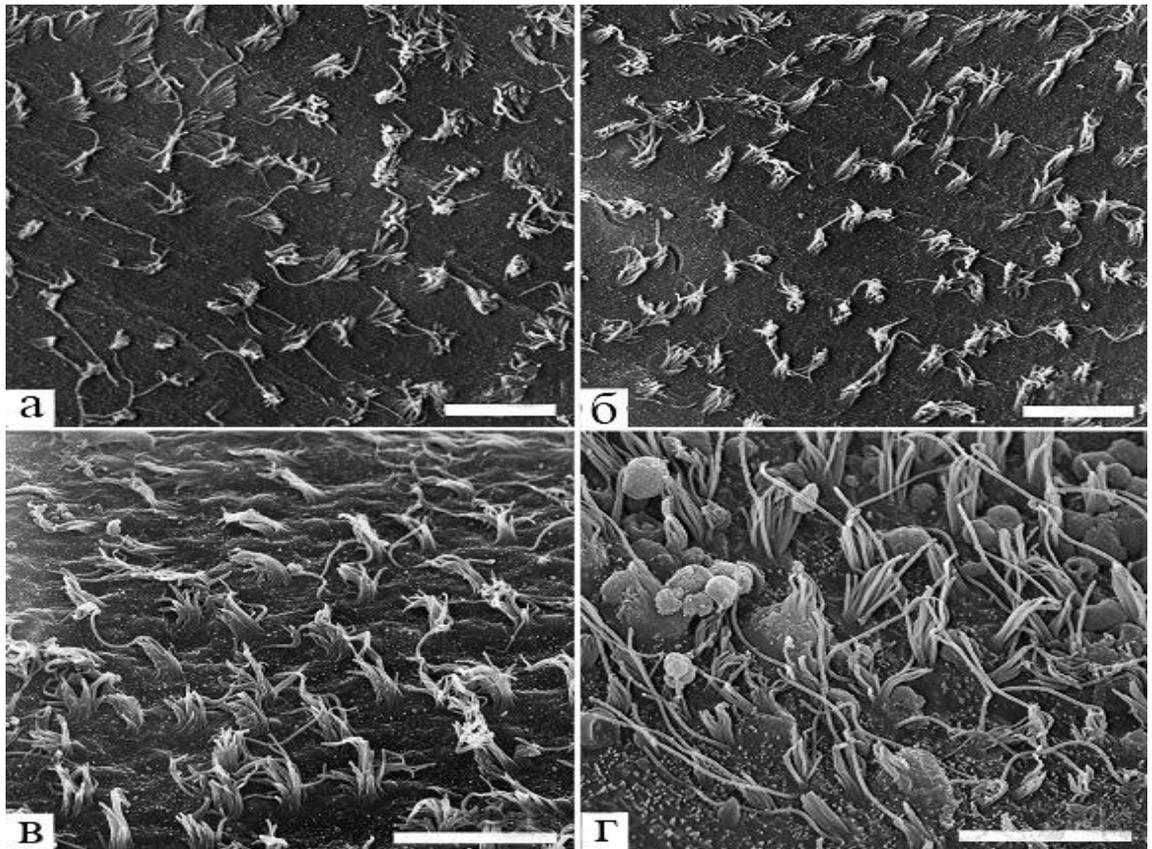


Рисунок 101. Различная плотность расположения волосковых клеток в периферических участках саккулярной макулы у большой голомянки (а), малой голомянки (б), северобайкальской желтокрылки (в) и каменной широколобки (г). Масштаб: 10 мкм. СЭМ.

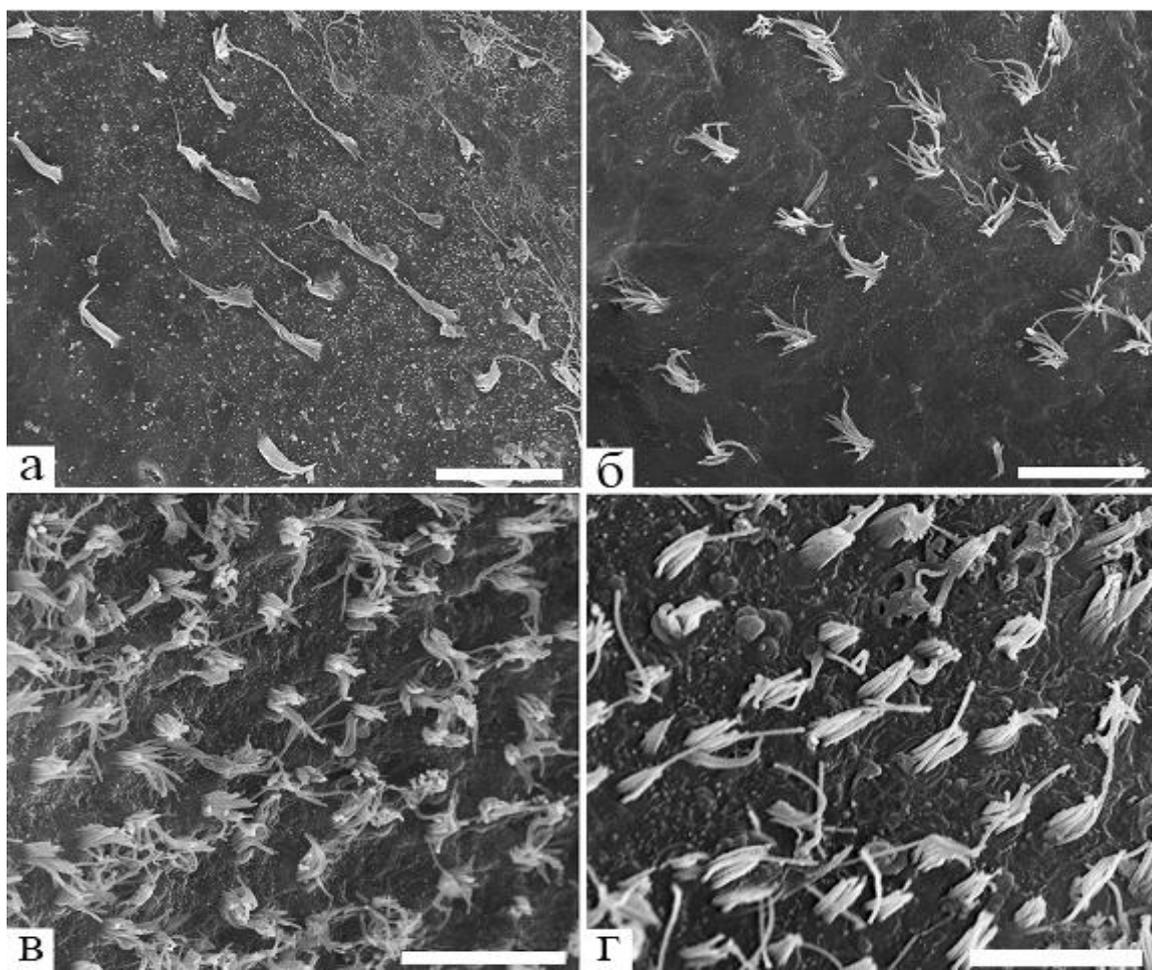


Рисунок 102. Различная плотность расположения волосковых клеток в центральном участке саккулярной макулы у большой у голомянки (а), малой голомянки (б), северобайкальской желтокрылки (в) и каменной широколобки (г). Масштаб: 10 мкм. СЭМ.

Несмотря на общее сходство ультраструктуры макул, изученные виды отличаются, прежде всего, длиной стереоцилий и киноцилии у периферических и центральных волосковых клеток (**рис. 103**). С помощью кластерного анализа по наиболее значимым и варьирующим признакам – длине киноцилии (к) и длине наиболее высокой стереоцилии (с) выделено шесть типов волосковых саккулярных клеток: к13с9, к9с8, к14с4, к8с4, к9с2, к11с1 (цифры обозначают длину киноцилии и максимальной по длине стереоцилии в микрометрах) (**рис. 103**), (**табл. 2**).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что макро- и ультраструктура саккулярных макул у исследованных рыб является

Таблица 2. Морфологические показатели волосковых клеток саккулярной макулы у байкальских рогатковидных рыб.

Виды	Площадь макулы, мм ²	Плотность расположения волосковых клеток в макуле (количество клеток на 1 мм ² , $M \pm m$)	Доля саккулярной макулы, занимаемая разными типами волосковых клеток, %*					
			к13с9	к9с8	к14с4	к8с4	к9с2	к11с1
большая голомянка	0.27±0.001	28100±1232	0	53	0	47	0	0
малая голомянка	0.24±0.001	27600±511	0	67	0	33	0	0
северобайкальская желтокрылка	0.09±0.001	46000±795	0	0	0	77	23	0
каменная широколобка	0.33±0.003	34400±358	18	14	11	26	22	9

* Примечание. Цифры в названии типов клеток (к13с9, к9с8, к14с4, к8с4, к9с2, к11с1) обозначают среднюю длину киноцилии (к) и среднюю длину наиболее высокой стереоцилии (с) в микрометрах.

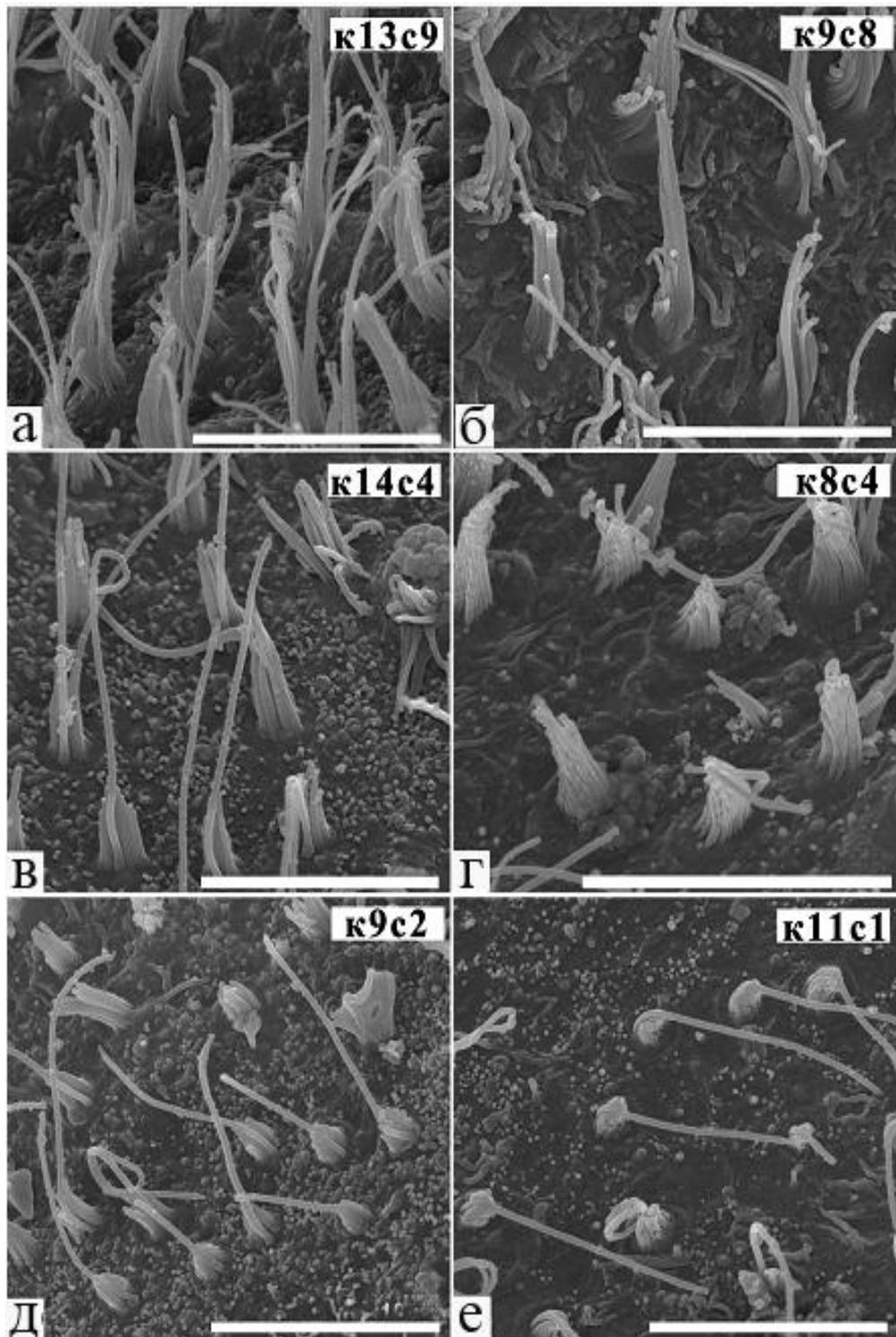


Рисунок 103. Волосковые клетки с разной длиной стереоцилий и киноцилии в саккулярной макуле у рогатковидных рыб: κ13с9 (а), κ9с8 (б), κ14с4 (в), κ8с4 (г), κ9с2 (д), κ11с1 (е), где κ – средняя длина киноцилии, мкм; с – средняя длина максимальной стереоцилии, мкм. Масштаб: 10 мкм. СЭМ.

видоспецифичной. Однако, для рыб, обитающих в одинаковых экологических условиях озера, наблюдаются некоторые общие морфологические особенности, касающиеся разновидностей волосковых клеток, плотности их расположения, а также длине стереоцилий и киноцилий. Для пелагических рыб (большая и малая голомянки) характерны большие по площади (более 50 %) участки в саккулярной макуле, занимаемые волосковыми клетками с удлинёнными (до 8 мкм) стереоцилиями. В отличие от этого, у прибрежной каменной широколобки и у обитающей в присклоновой зоне севербайкальской желтокрылки доминируют участки с волосковыми клетками, несущими более короткие стереоцилии (< 4 мкм) – 100 % и 68 % соответственно. Преобладание у пелагических голомянок волосковых клеток с длинными стереоцилиями, вероятно, связано с акустическими условиями, характерными для глубоководных мест их обитания, что способствует восприятию низкочастотных звуковых колебаний. Акустический спектр в пелагиали представлен в основном низкочастотными звуками – до 300 Гц [Карлик, Марапулец, 2004]. Такие звуки затухают слабее, чем высокочастотные, и поэтому в условиях пелагиали распространяются на большие расстояния. Высокочастотная компонента в акустическом спектре открытой пелагиали водоемов практически отсутствует [Урик, 1978].

На основании данных сканирующей микроскопии рассчитана площадь, занимаемая полями волосковых клеток разного типа (**рис. 104**). Процентное соотношение таких полей, характерных для рогатковидных рыб приведено в таблице 2. Необходимо отметить, что у каждого вида рыб деление макулы на зоны с разными типами волосковых клеток не всегда совпадает с делением макулы на зоны, образуемые волосковыми клетками с разной морфологической поляризацией.

В отличие от пелагиали, прибрежная зона характеризуется шумами с широким спектром частот от 0,05 до 16 кГц [Карлик, Марапулец, 2004].

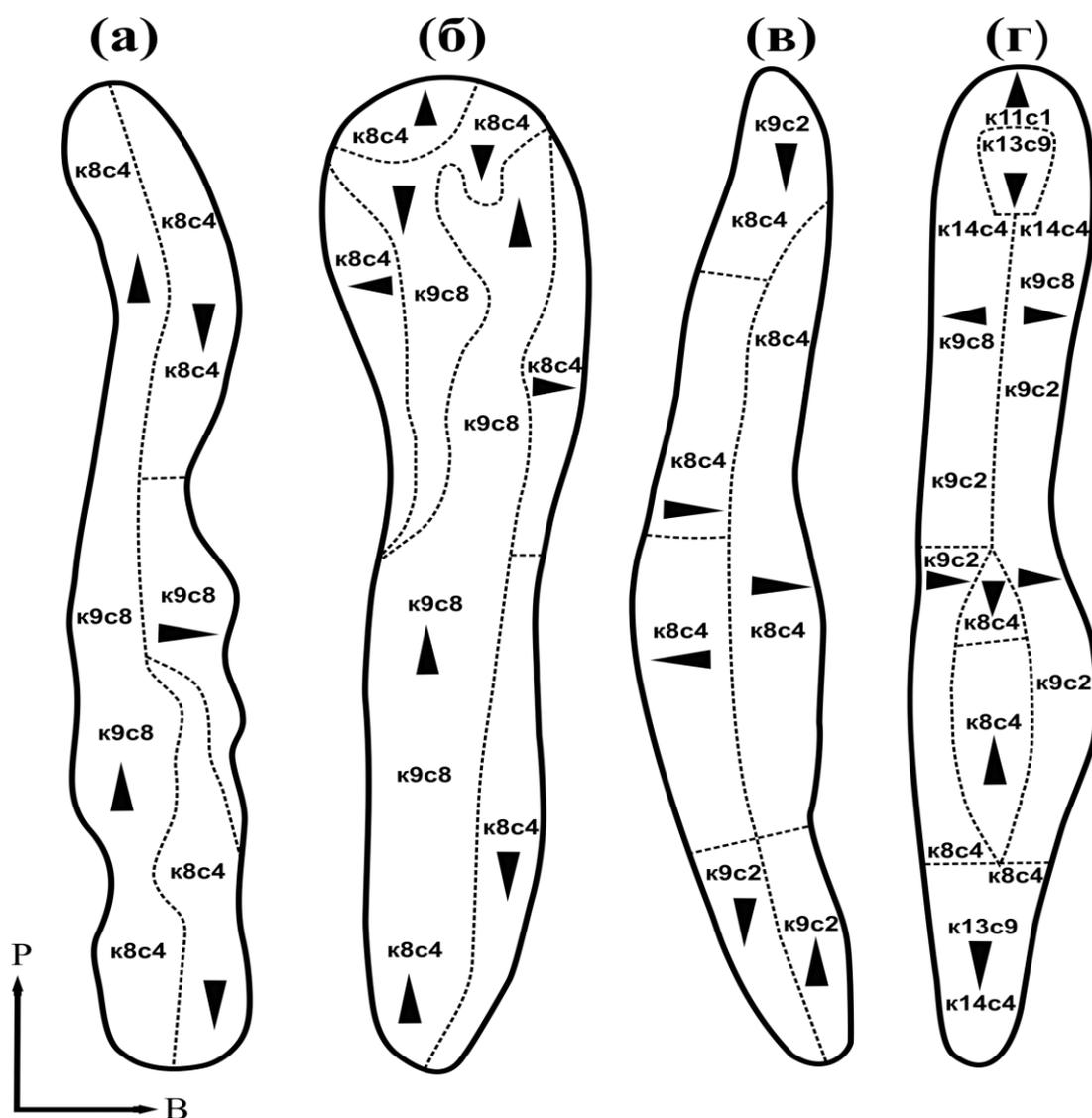


Рисунок 104. Схемы зонального распределения волосковых клеток разного типа в саккулярной макуле и особенности их морфологической поляризации (отмечены черными стрелками) у большой голомянки (а), малой голомянки (б), северобайкальской желтокрылки (в) и каменной широколобки (г). По данным СЭМ. Пунктирной линией нанесены зоны макул с разной морфологической поляризацией волосковых клеток, вектор поляризации указан стрелкой. Р – роstralная сторона макулы; В – вентральная сторона макулы.

Благодаря неоднородности рельефа и высокой плотности бентосного населения акустический спектр прибрежной зоны насыщен высокочастотными звуковыми колебаниями, которые лучше, чем

низкочастотные, распространяются в мелководной зоне водоемов и имеют для многих водных животных сигнальный характер. По-видимому, именно этой особенностью мелководья объясняется то, что для каменной широколобки и северобайкальской желтокрылки более типичными в саккулярной макуле являются волосковые клетки с короткими стереоцилиями.

Низкочастотные колебания от волнового прибоя создает шумовой фон, который способен скрыть коммуникативные акустические сигналы [Урик, 1978]. Вероятно, именно по этой причине типичные представители рогатковидных прибрежной зоны имеют адаптации, направленные на высокодифференцированное восприятие биологически значимых акустических сигналов в условиях шума. У каменной широколобки к такого рода адаптациям можно отнести не только большие по площади участки макулы, занятые волосковыми клетками с короткими стереоцилиями, но и относительно большую общую площадь макулы, повышенное морфологическое разнообразие типов волосковых клеток и их высокую плотность. Кроме того, для прибрежных байкальских рыб характерно наличие так называемых аберрантных (ватеритовых) отолитов, которые отличаются от обычных (арагонитовых), геометрией кристаллов и низкой плотностью. По мнению некоторых авторов [Oxman *et al.*, 2007], низкая ($2,65 \text{ г/см}^3$) плотность ватеритного отолита по сравнению с арагонитным ($2,93 \text{ г/см}^3$) того же размера, вызывает ослабление связи ватеритного отолита с сенсорным эпителием и снижает акустическую чувствительность рыб.

Нами показано, что аберрантные отолиты растут неравномерно относительно их первичного центра закладки за счет так называемых отокониальных масс, адсорбция которых происходит на периферии отолита (**Рис. 105**). Прирост периферической зоны макулы у прибрежных рыб может расширить чувствительность этих рыб в высокочастотной области спектра при наличии аберрантных отолитов и снижении чувствительности к низким частотам.

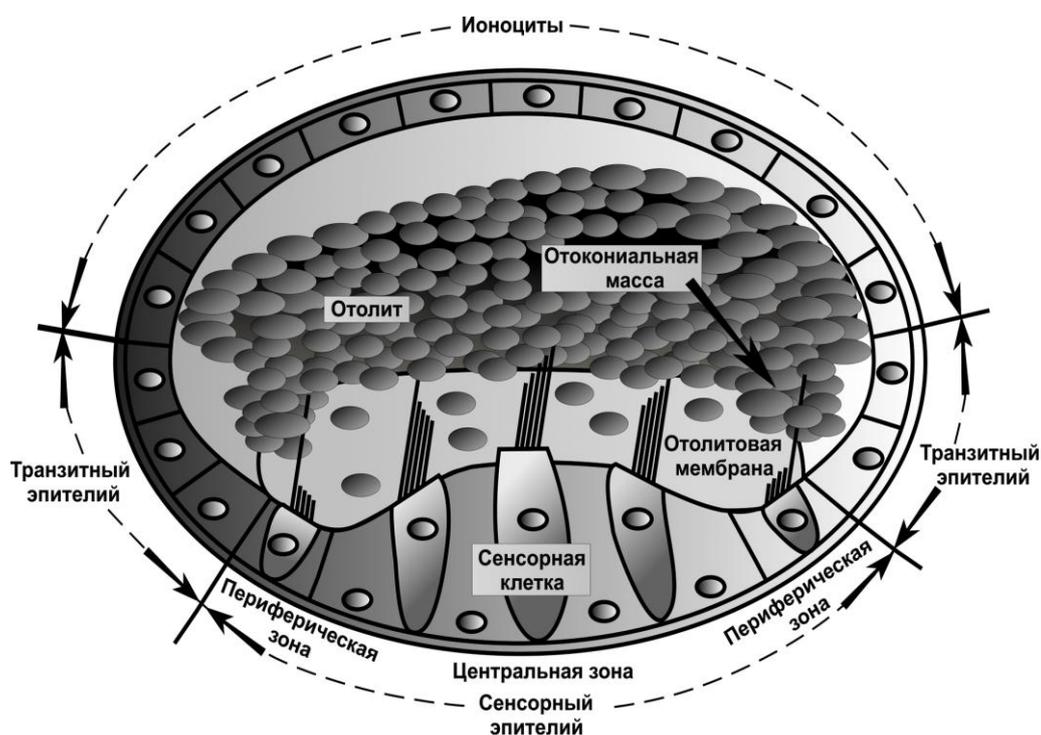


Рисунок 105. Схема расположения волосковых клеток разного типа в саккулярной макуле с аберрантным отолитом у байкальских рогатковидных рыб. Волосковые клетки перемежаются с опорными элементами. Над эпителием располагается отолит, колебания которого передаются на сенсорные клетки.

8.1.2 Особенности дирекционной чувствительности саккулюса

Анализ взаимного расположения стереоцилий и киноцилий на апикальной поверхности волосковых клеток показал, что у исследованных рогатковидных рыб схемы морфологической поляризации сенсорных элементов эпителия отличаются от уже описанных ранее у других костистых рыб (раздел 1.6.1).

На рис **104** представлены особенности морфологической поляризации сенсорных элементов в саккулярной макуле у рогатковидных рыб, причем на схеме сохранена ее нативная форма, которая близка форме желоба *sulcus acoustics* соответствующего саккулярного отолита. Каждая макула была подразделена на роstralную, каудальную и центральную зоны, которые соответствуют направлениям к роstralному и каудальному концам рыбы.

Горизонтальная ориентация сенсорных пучков предполагает их направленность по рострокаудальной оси макулы и рыбы соответственно; вертикальная – по дорсовентральной оси.

Особенности морфологической поляризации рецепторного аппарата сенсорных клеток у пелагической большой голомянки состоят в следующем: ростральная и каудальная области макулы имеют по две смежные зоны горизонтально ориентированных и противоположно направленных сенсорных элементов волосковых клеток (**рис. 104, а; 106, а, б**). В центральной зоне с дорсальной стороны рецепторные пучки имеют горизонтальную ориентацию и направлены так же, как и в ростральном и каудальном концах этой стороны. Таким образом, дорсальная сторона макулы поляризована в одном направлении. Вентральная часть макулы подразделена на три участка: ростральный и каудальный концы (с горизонтальной ориентацией и противоположным направлением пучков по сравнению с поляризацией пучков дорсальной стороны) и центральный фрагмент с вертикальной ориентацией пучков и направлением поляризации от центра макулы к периферии. В некоторых областях макулы поляризация сенсорных элементов макулы у большой голомянки похожа на «удвоенный» тип морфологической поляризации [Porper, Coombs, 1982].

Для второго изученного вида – пелагической малой голомянки характерна поляризация с разделением макулы на шесть зон (**рис. 104, б**). На ростральном конце картина поляризации повторяет «чередующуюся» [Porper, Coombs, 1982] с наличием дополнительных участков волосковых клеток с вертикальной ориентацией на периферии макулы с направлением поляризации сенсорных пучков от центра макулы. На каудальном конце пучки стереоцилий дорсальной и вентральной сторон поляризованы не вертикально, как при «чередующемся» типе поляризации, а горизонтально. При этом, пучки стереоцилий дорсальной и вентральной сторон макулы направлены противоположно.

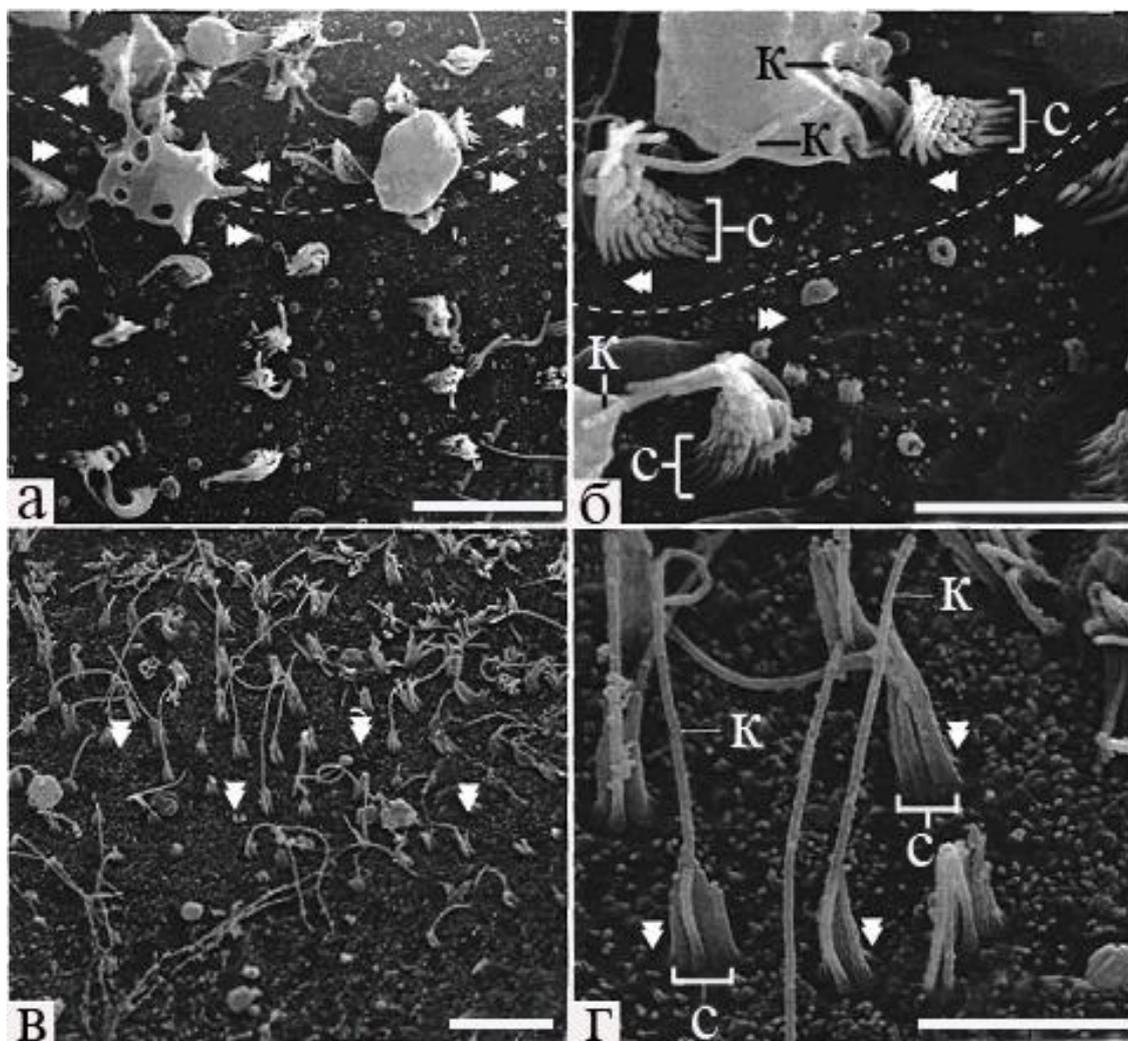


Рисунок 106. Особенности морфологической поляризации волосковых клеток саккулярного эпителия у байкальских рогатковидных рыб. А, б – рostrальная область макулы большой голомянки со смежными зонами горизонтально ориентированных и противоположно направленных сенсорных элементов волосковых клеток; в, г – периферический фрагмент вентральной стороны макулы каменной широколобки с вертикальной ориентацией и однонаправленной поляризацией сенсорных элементов волосковых клеток. Пунктиром обозначена граница между различными зонами поляризации волосковых клеток. Обозначения: с – стереоцилии, к – киноцилия. Масштаб: а, в – 10 мкм; б, г – 5 мкм. СЭМ.

Поляризация макулы у бентопелагической северобайкальской желтокрылки близка к ранее описанному «удвоенному» типу [Porper, Coombs, 1982]. Специфическая особенность заключается в том, что сенсорные пучки каудального и рострального концов макулы ориентированы в противоположных направлениях (**рис. 104, в**). На ростральном участке сенсорные пучки дорсальной и вентральной сторон макулы ориентированы горизонтально и направлены к центру макулы. Отличия в поляризации состоят также в следующем: в центральной зоне дорсальной стороны макулы имеется две области противоположно направленных и вертикально ориентированных сенсорных пучков. В той области, что ближе к ростральному участку, сенсорные пучки направлены к центру макулы, а на той, что ближе к каудальной области – к периферии.

У бентической каменной широколобки «вертикальный» тип поляризации [по Porper, Coombs, 1982] характерен для ее центральной части и периферических фрагментов вентральной и дорсальной сторон макулы (**рис. 104, г; 106 в, г**). На ростральном и каудальном концах макулы пучки цилий волосковых клеток горизонтально ориентированы и направлены к периферии макулы. Во внутренних областях макулы можно выделить сенсорные пучки, которые горизонтально ориентированы и противоположно направлены относительно периферических пучков рострального и каудального участков. С дорсальной поверхности, ближе к каудальному концу, имеется участок сенсорных пучков, ориентированных противоположно по сравнению с сенсорными пучками центральной зоны той же дорсальной стороны.

На основе данных, полученных с помощью сканирующей микроскопии, для каждой из макул мы рассчитали процентное соотношение участков с разной ориентацией волосковых клеток относительно всей макулы. Это позволило построить диаграммы дирекционной чувствительности саккулюса в сагиттальной плоскости. На диаграммах в направлении, соответствующем ориентации сенсорных пучков макулы

относительно тела рыбы (ростральном, каудальном, вентральном, дорсальном), откладывали в процентах значения площадей, которые занимали волосковые клетки с разной поляризацией. Всю площадь макулы принимали за 100 % (рис. 107).

При сравнительной оценке морфологической поляризации сенсорных элементов и дирекционной чувствительности саккулюса у прибрежного бентического вида каменной широколобки и у бентопелагического вида северобайкальской желтокрылки отмечено доминирование вертикальной ориентации сенсорных пучков волосковых клеток и, соответственно, чувствительности саккулюса к смещениям отолита в вертикальном направлении (рис. 107, а, б; 108). Характерно, что подобную тенденцию можно увидеть и на саккулярной макуле у ранее исследованных бентических рыб: пятнистого гурами *Trichogaster trichopterus*, мормировых рыб рода *Gnathonemus* [Popper, Coombs, 1982], золотой рыбки *Carassius auratus* (Saidel *et al.*, 1995) и у бычка-буйвола *Taurulus bubalis* [Lovell *et al.*, 2005]. Нужно отметить, что для частично связанных с дном рыб – сигов *Coregonus clupeaformis* [Popper, Coombs, 1982], налимов *Lota lota* [Popper, 1981] и трески *Gadus morhua* [Dale, 1976] – характерна значительная разнонаправленность сенсорных пучков макулы как в вертикальном, так и в горизонтальном направлениях. Подобная разнонаправленность сенсорных пучков макулы свойственна также для бати- и абиссопелагических угрей группы *Eloromorph* [Buran *et al.*, 2005], а также для морских мурен рода *Gymnothorax* [Popper, 1979], которые являются активными хищниками-засадчиками и большую часть времени проводят, затаившись в подходящих по размеру укрытиях. Такая особенность, вероятно, связана с тем, что всем вышеперечисленным рыбам требуются высокочувствительные отолитовые органы для того, чтобы совершать вблизи препятствий и грунта наиболее тонкие, рассчитанные движения [Лычаков, 1994] и чувствовать малейшие колебания донных организмов. В отличие от этого, в макуле пелагических большой и малой голомянок горизонтальная ориентация сенсорных пучков

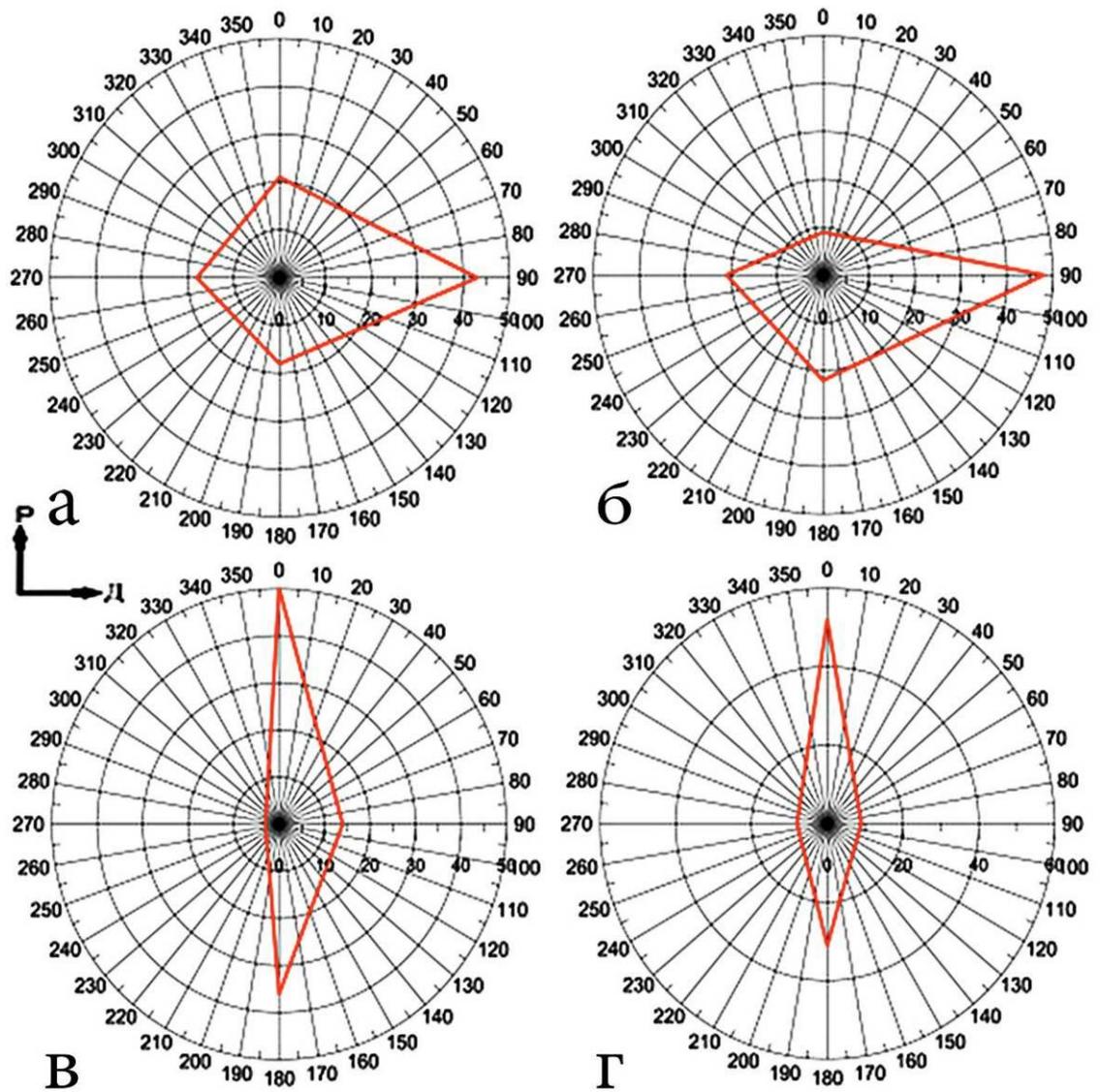


Рисунок 107. Диаграммы максимальной дирекционной чувствительности саккулюса у каменной широколобки (а), северобайкальской желтокрылки (б), большой голомянки (в) и малой голомянки (г). Направления дирекционной чувствительности: д – дорсовентральное (вертикальное), р – ростокаудальное (горизонтальное).

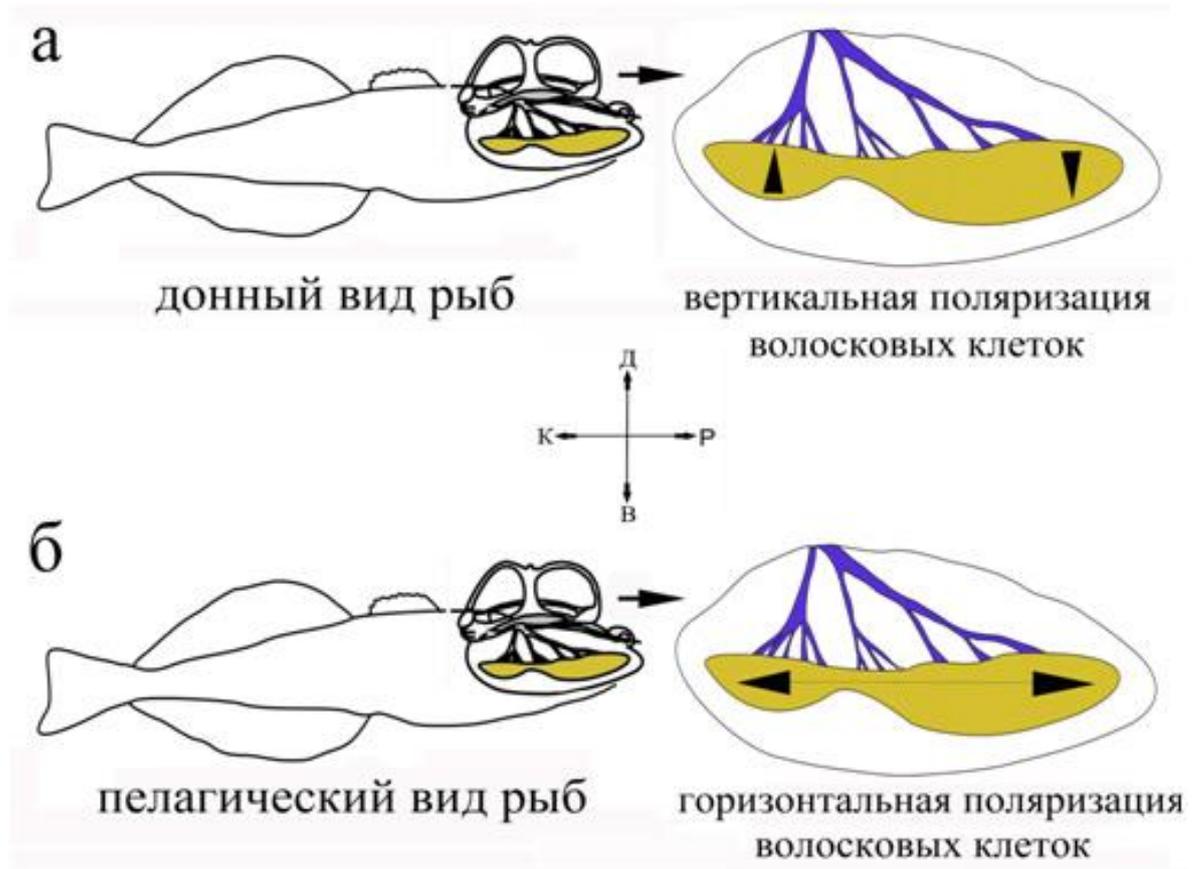


Рисунок 108. Особенности морфологической поляризации сенсорных пучков волосковых клеток, свойственной для донных (а) и пелагических видов рыб (б). Саккулюс окрашен желтым цветом; ▲, ▼ – вертикальная поляризация волосковых клеток; ◀, ▶ – горизонтальная поляризация волосковых клеток.

превалирует над вертикальной (рис. 107, в, г; 108), что свидетельствует о доминировании чувствительности саккулюса к смещениям отолита в горизонтальном направлении. Несмотря на вертикальные миграции, голомянки малоподвижны в толще воды и не связаны с дном [Sideleva, 2003; Мамонтов и др., 2004]. Это говорит о том, что потребность в анализе сильных рывковых ускорений у них невелика, что отмечалось ранее при сравнении образа жизни пелагических и донных видов рыб [Лычаков, 1994]. Схемы морфологической поляризации у байкальских голомянок уникальны и отличаются от описанных ранее у мезопелагических брегмацеровых рыб рода *Bregmaceros* [Popper, 1980] и мерлузовых рыб рода *Merluccius* [Lombarte

et al., 1992], для саккулярной макулы которых, однако, также характерно доминирование горизонтальной ориентации сенсорных пучков.

Представленные схемы морфологической поляризации слухового эпителия рогатковидных рыб дают новую информацию, необходимую для понимания адаптивного поведения рыб, которое предопределяется их слуховой чувствительностью в связи с характерными для них стратегиями поведения в оз. Байкал.

8.2 Морфологическая характеристика саккулюса у сиговых рыб

8.2.1 Ультраструктура сенсорных клеток и особенности их топографического расположения в саккулярном эпителии

Как и у бычковых, у байкальских сиговых рыб макро- и ультраструктура слухового эпителия также является видоспецифичной. Максимально широкий участок макул у всех сиговых рыб, как правило, приходится на ростральный отдел – 0,5 мм, к каудальному концу она сужается и составляет в среднем 0,2 мм. Аналогичная тенденция наблюдается и в плотности распределения рецепторных клеток на единицу поверхности эпителия: у изученных видов сиговых рыб число клеток выше с рострального и каудального концов макул (**рис. 109**). В центральной зоне макулы волосковые клетки располагаются на значительном расстоянии друг от друга, особенно у пыжьяна и озерного сига. Средняя плотность волосковых клеток составляет: у байкальского омуля – 571 тыс. клеток/мм²; у пыжьяна — 379 тыс. клеток /мм² и у озерного сига – 236 клеток/мм² (**табл. 3**).

Различия периферических и центральных волосковых клеток проявляются, прежде всего, в морфологических параметрах цилий в пучке. Так же, как и для рогатковидных рыб, кластерный анализ дал возможность объединить сенсорные клетки саккулюса сиговых рыб в классы таким образом, чтобы в один класс попали максимально схожие из них.

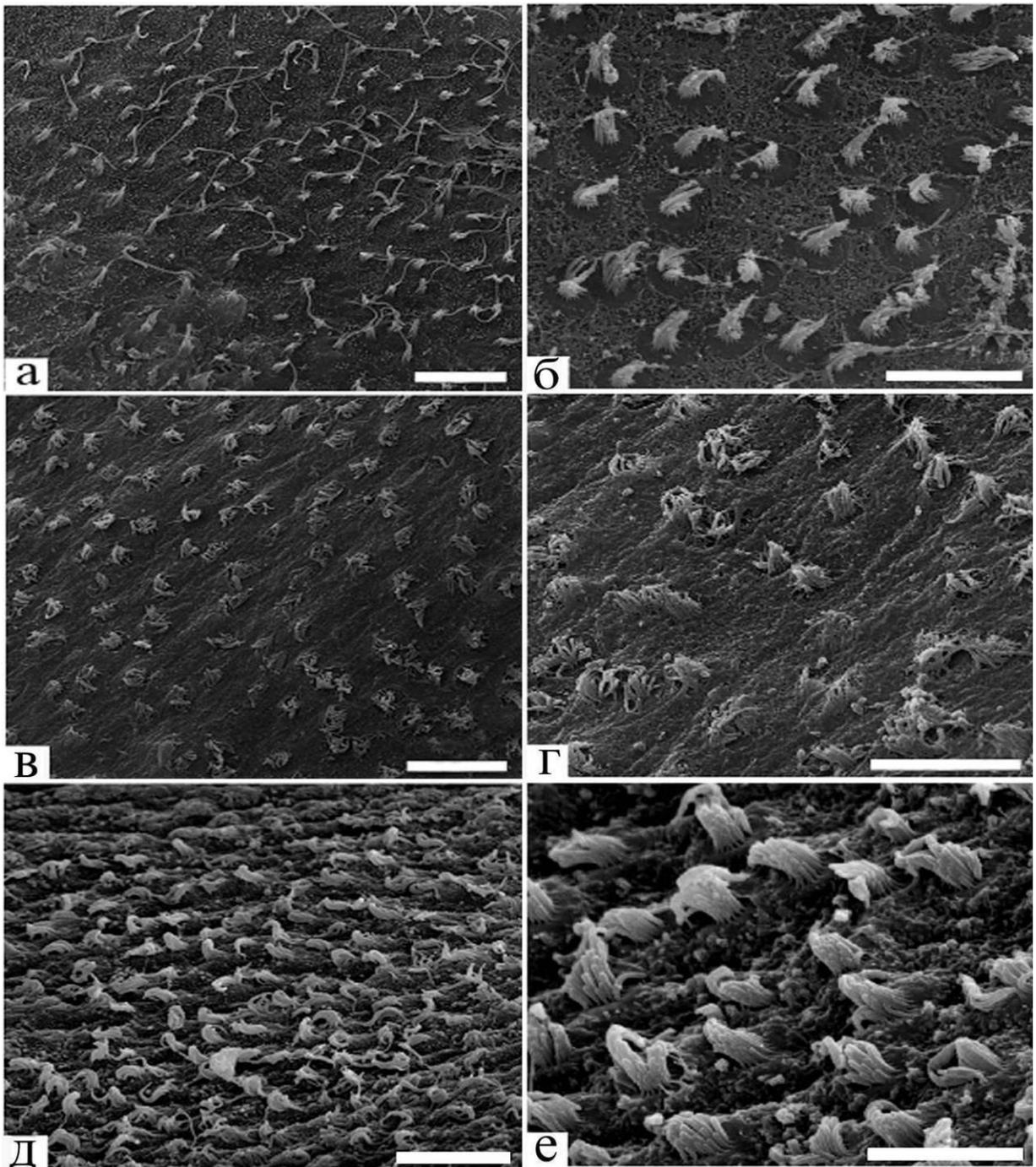


Рисунок 109. Различная плотность расположения волосковых клеток в центральном (а, в, д) и периферическом (б, г, е) участках саккулярной макулы у байкальского омуля (а, б), пыжьяна (в, г) и озерного сига (д, е). Масштаб: 10 мкм. СЭМ.

В результате проведенного анализа, у байкальского омуля было выделено четыре типа сенсорных клеток (к3с2, к11с4, к6с5, к7с2), у озерного сига – также четыре (к4с3, к6с2, к3с2, к2с2) и у пыжьяна — два типа саккулярных клеток (к4с3, к2с2), где цифрами приведены длины киноцилий (к) и максимальных по длине стереоцилий (с) в микрометрах (мкм) (**рис. 110**). Таким образом, с помощью этого анализа удалось выявить большое разнообразие типов чувствительных клеток в макулах исследованных видов рыб. При этом у одного конкретного вида деление макулы на зоны с разными типами сенсорных клеток не всегда совпадает с делением этой макулы на зоны с их разной морфологической поляризацией (**рис. 111**).

Сравнительные исследования показывают, что площадь сенсорной макулы, плотность расположения волосковых клеток, их разновидности, а также длины стереоцилий и киноцилий у рецепторных элементов неодинаковы у сиговых рыб, обитающих в различных экологических условиях озера.

На основе данных сканирующей микроскопии саккулярных макул сиговых рыб проведен сравнительный анализ площадей, занимаемых волосковыми клетками разных типов (табл. 3). Для пелагического вида – байкальского омуля – характерны достаточно большие площади (около 44 %), занимаемые сенсорными пучками с удлинненными стереоцилиями (4–5 мкм), что в свою очередь способствует наиболее адекватному восприятию пелагическими рыбами низкочастотных акустических волн. Подобная тенденция, как было сказано выше, наблюдается и у пелагических большой и малой голомянок (раздел 8.1).

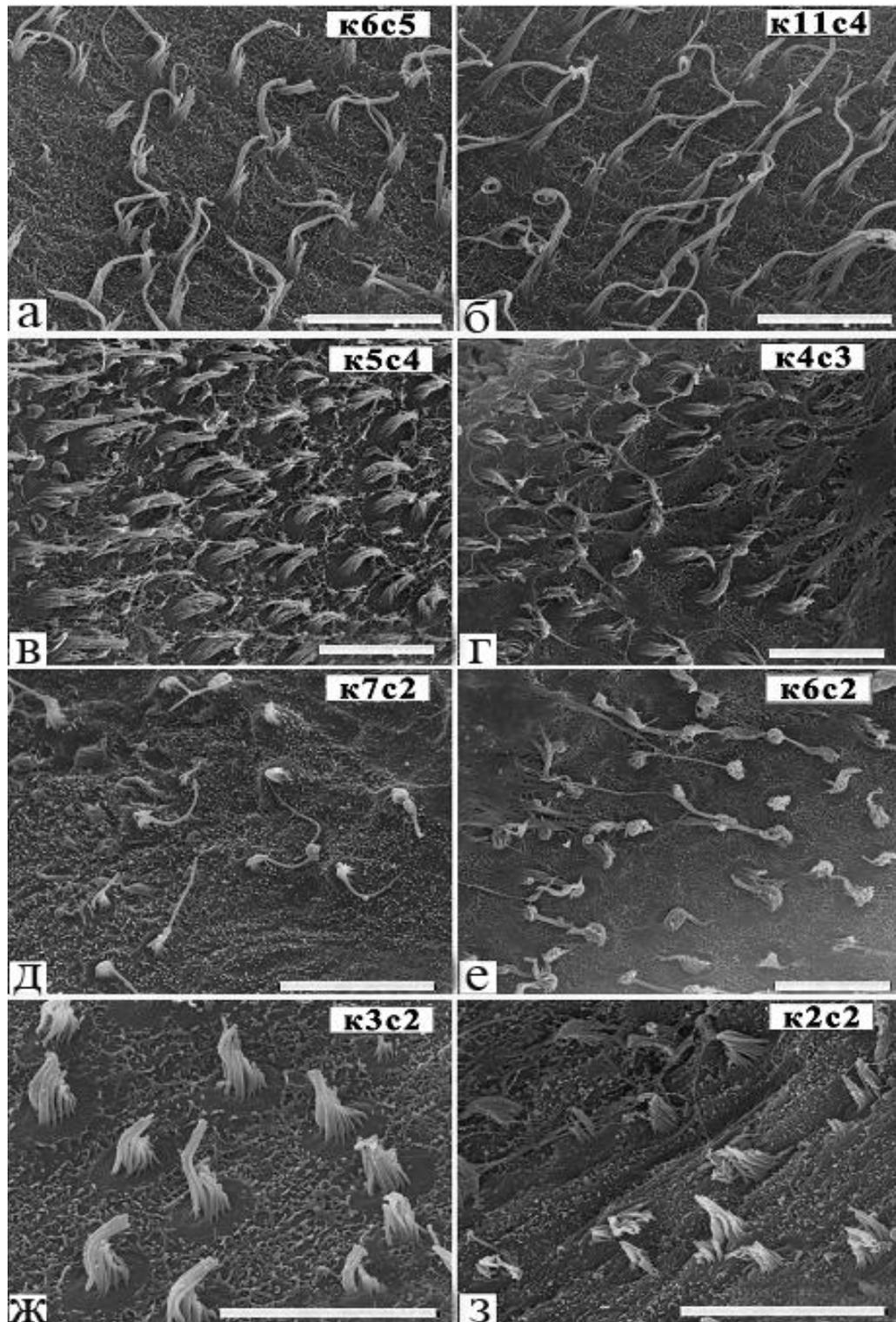


Рисунок 110. Волосковые клетки с разной длиной стереоцилий и киноцилии в саккулярной макуле у сиговых рыб: к6с5 (а), к11с4 (б), к5с4 (в), к4с3 (г), к7с2 (д), к6с2 (е), к3с2 (ж), к2с2 (з), где "к" – средняя длина киноцилии, мкм; "с" – средняя длина максимальной стереоцилии, мкм. Масштаб: 10 мкм. СЭМ.

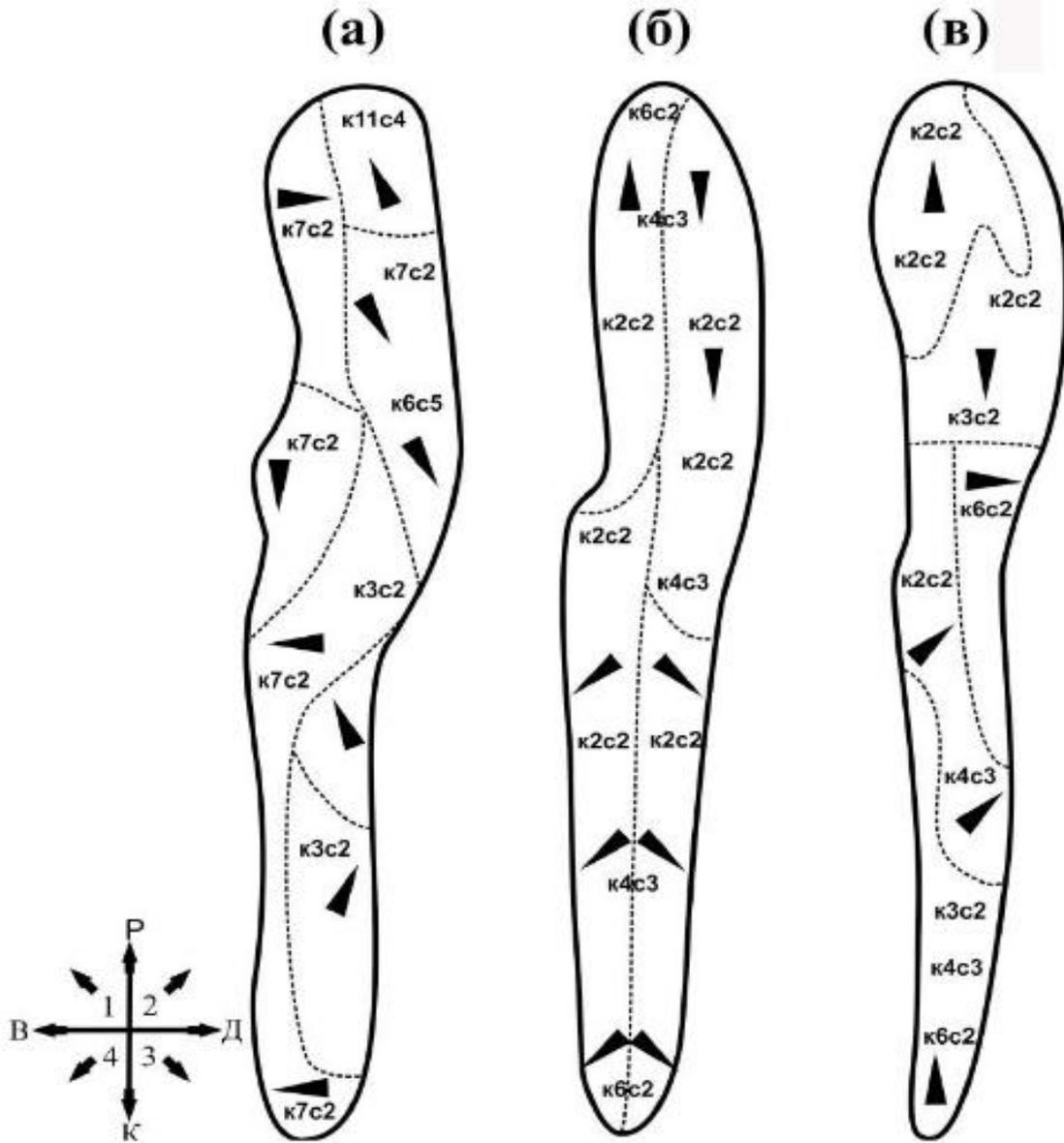


Рисунок 111. Схемы зонального распределения волосковых клеток разного типа в саккулярной макуле и их морфологической поляризации у байкальского омуля (а), пыжьяна (б) и озерного сига (в). На представленных схемах сохранена нативная форма саккулюса. Размеры всей макулы и отдельных зон с разной ориентацией пучков даны схематически. Направления поляризации сенсорных клеток: в – вентральное, д – дорсальное, р – ростральное, к – каудальное, 1 – ростровентральное, 2 – ростродорсальное, 3 – каудодорсальное, 4 – каудовентральное. (↓) – вектор поляризации (от стереоцилий к киноцилии). По данным СЭМ.

Таблица 3. Морфологические показатели саккулярной макулы у байкальских сиговых рыб.

Виды	Площадь макулы, мм ²	Плотность расположения волосковых клеток в макуле (количество клеток на 1 мм ² , $M \pm m$)	Доля саккулярной макулы (%), занимаемая разными типами волосковых клеток*							
			к6с	к11с	к5с	к4с	к7с	к6с	к3с	к2с
байкальский омуль	1.63±0.009	571500±8975	31	13	0	0	32	0	24	0
пыжьян	1.80±0.009	379200±4854	0	0	0	44	0	0	0	56
озерный сиг	0.16±0.003	236400±3486	0	0	0	24	0	16	21	39

В отличие от пелагических рыб, для пыжьяна (типичного обитателя мелководной зоны) свойственны меньшее морфологическое разнообразие и плотность расположения сенсорных клеток на макуле. Кроме того, для клеток пыжьяна, а также мелководного озерного сига типичны сенсорные пучки с короткими стереоцилиями (< 3 мкм), воспринимающими более высокочастотные звуковые колебания, которые, судя по всему, легче идентифицируются на фоне низкочастотного шума в мелководной зоне.

Появление у пузырных рыб дополнительных слуховых структур (плавательный пузырь) дало им возможность воспринимать более

высокочастотные звуковые колебания. Таким образом, благодаря преобладанию сенсорных клеток с короткими стереоцилиями (до 2 мкм), сиговые рыбы озера Байкал чувствительны к более высокочастотному спектру, что показано в ходе поведенческих экспериментов по определению спектра воспринимаемых ими частот (раздел 8.4). По нашему мнению, выявленная закономерность, обусловлена не только ультраструктурными особенностями сенсорного эпителия, но и наличием у сиговых рыб плавательного пузыря, который является хорошим резонатором акустических сигналов и способствует трансформации высокочастотных колебаний в легко воспринимаемые волосковыми клетками низкочастотные колебания [Kenyon *et al.*, 1998; Popper, Fay, 2011; Yan *et al.*, 2000].

Нужно обратить внимание на то, что на всех зонах саккулярной макулы с разной поляризацией встречаются волосковые клетки разных типов. Если особенности морфологической поляризации макулы отражают способность слухового аппарата рыб в определении направления на источник акустических сигналов в воде, то вероятно, что наличие тех или иных типов сенсорных клеток (с разным по длине набором цилий) предопределяет функциональные возможности слухового аппарата в отношении частотного кодирования поступающих сигналов.

Существуют экспериментальные доказательства того, что длинные стереоцилии участвуют в восприятии низкочастотных колебаний, тогда как короткие стереоцилии связаны с восприятием более высокочастотных звуковых сигналов [Pujol *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2011]. Как уже отмечалось выше, рыбы отличаются большим многообразием морфологической организации органа слуха, в связи с чем вопрос о пространственном тонотопическом кодировании акустических сигналов на уровне саккулюса сохраняет свою актуальность. В наших экспериментах, проведенных на гибридах ♀ пыжьяна и ♂ байкальского омуля, обнаружено, что после продолжительной (24 часа) стимуляции интенсивным тональным высокочастотным звуком (3000 Гц, 160 дБ) происходят деструктивные

изменения только определенных типов сенсорных клеток – кбс2 и к3с2, которые охватывают до 60 % от общей площади макулы (**рис. 112**). В частности, в отдельных зонах макулы выявлены локальные повреждения эпителия – деструктивные изменения ее поверхности. Такие участки имели округлую форму диаметром от 0,85 до 5,1 мкм, равные площади апикальной поверхности сенсорных клеток, выходящих на поверхность эпителия (**рис. 113, а, б**). В отдельных случаях наблюдалось слипание стереоцилий, описанное ранее при повреждении звуком большой интенсивности или действием антибиотиков у других животных [Gale *et al.*, 2002]. Кроме того, в центральной и периферической зонах на участках с сенсорными клетками типов кбс2 и к3с2 отмечалось явление вакуолизации апикальной поверхности этих клеток (**рис. 113, в, г**). Характерно, что волосковые клетки с длинными стереоцилиями сохраняли свою целостность. Мы полагаем, что такие изменения клеток возникли в результате длительного стрессорного воздействия высокоинтенсивной звуковой стимуляции высокой частоты. Причем, дегенеративные изменения проявлялись очень избирательно и возникали только в чувствительных к высокочастотным колебаниям клетках, снабженных короткими стереоцилиями (**рис. 114**). Таким образом, эти эксперименты подтверждают положение об участии клеток с короткими стереоцилиями в восприятии высокочастотных звуковых колебаний. В отличие от данных, полученных Смитом [Smith *et al.*, 2011] о преимущественной локализации клеток, чувствительных к высокочастотным сигналам в ростральном отделе макулы, наши результаты показывают более сложный характер распределения таких зон у сиговых рыб. По видимому, различия в этих результатах могут быть связаны не только с различающейся морфологической спецификой саккулярных аппаратов у исследованных рыб, но и с неадекватностью теста (деструктивные изменения цилий), который использовался для картирования акустической чувствительности эпителия. Применение более чувствительных функциональных критериев активности волосковых клеток в будущем может дать более полное представление о

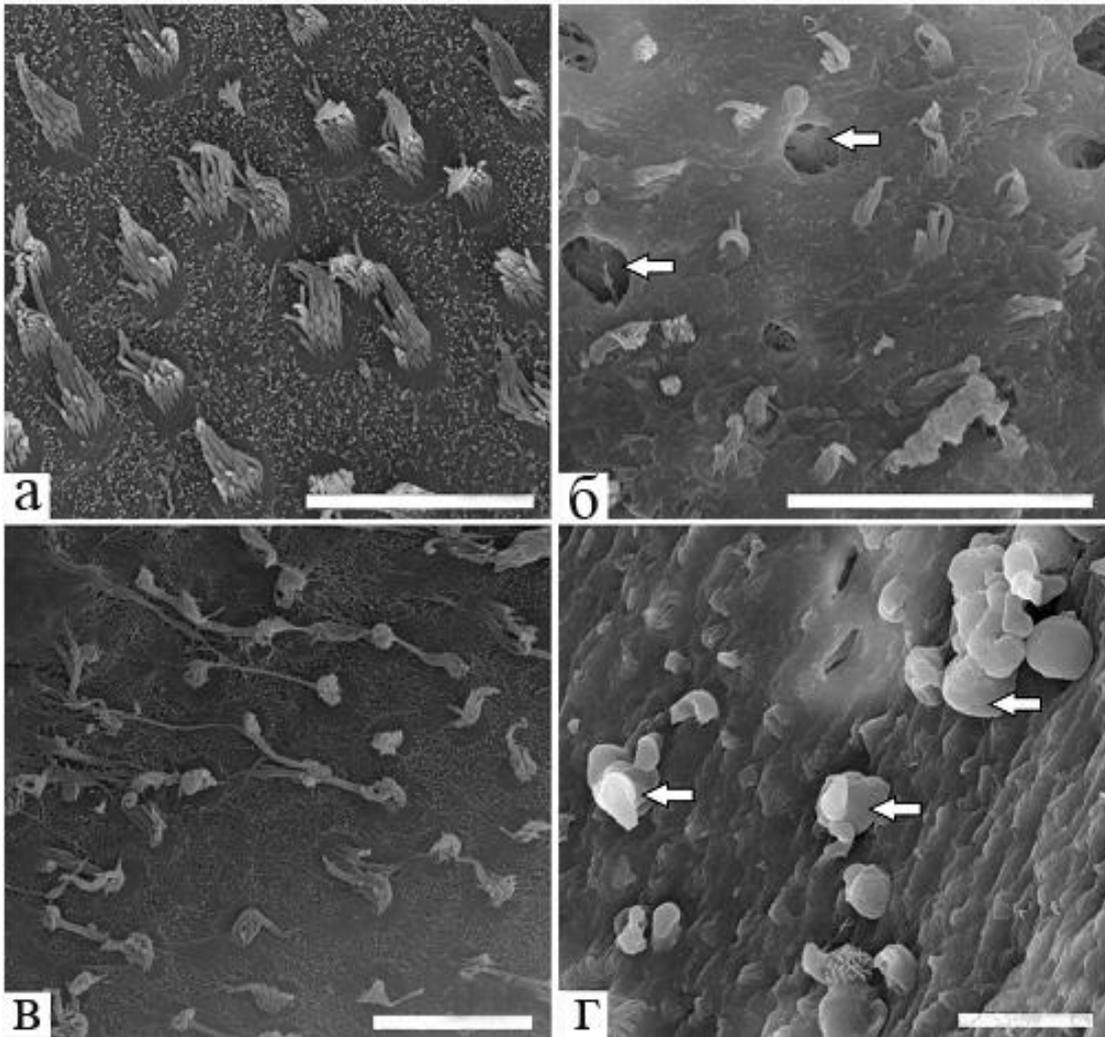


Рисунок 112. Сенсорный саккулярный эпителий у гибридов пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ в контроле (а, в) и после стимуляции (б, г) интенсивным тональным звуком (3000 Гц) в течение 24 ч: а, б – участок макулы, представленный сенсорными клетками типа к3с2; в, г – участок макулы, представленный сенсорными клетками типа к6с2. Деструктивные изменения клеток эпителия указаны стрелками. Масштаб: 10 мкм. СЭМ.

принципах пространственного восприятия акустических сигналов, которые могут проявляться на уровне сенсорного эпителия.

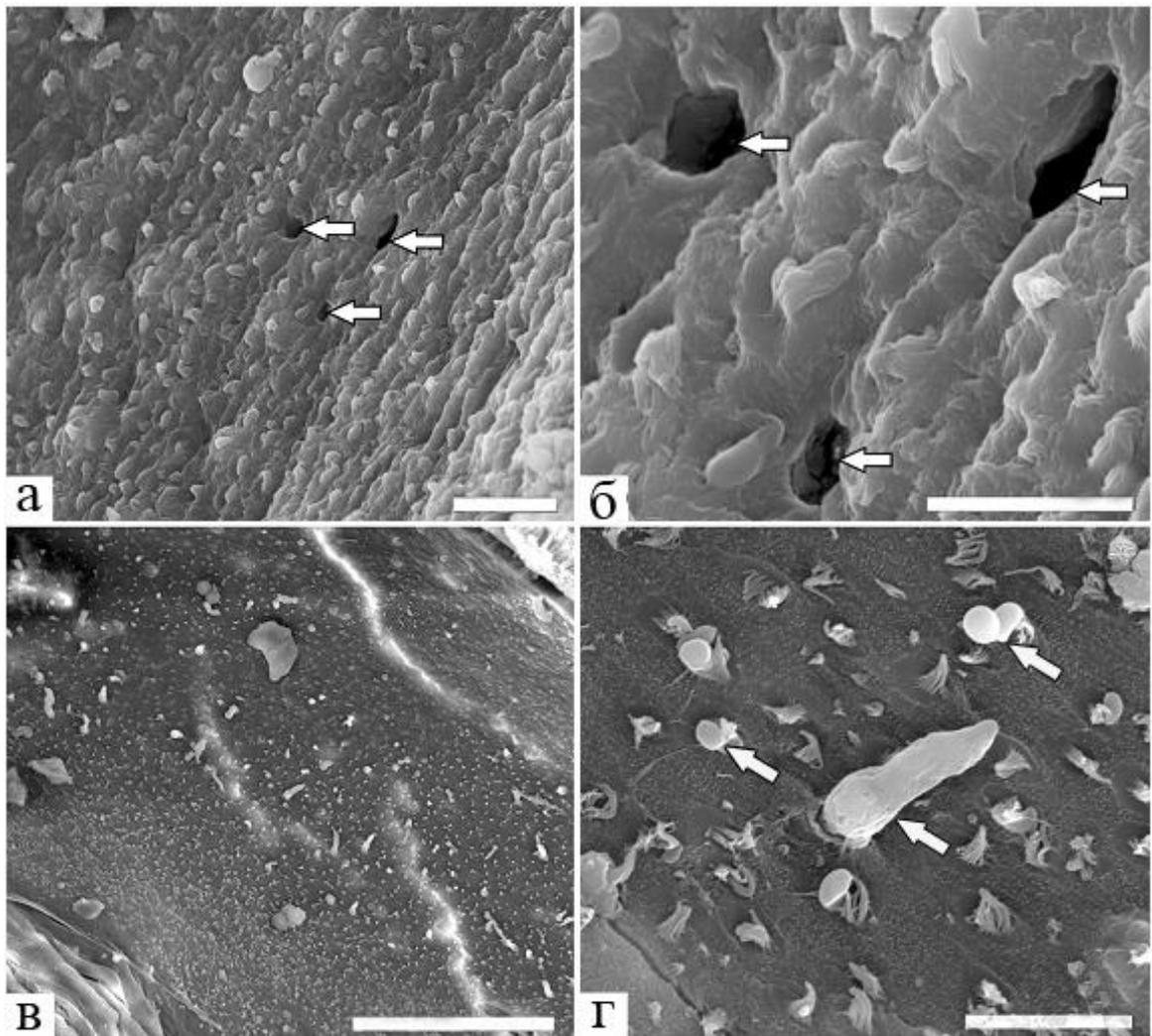


Рисунок 113. Особенности деструктивных изменений сенсорных клеток у гибридов пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ вследствие стимуляции интенсивным тональным звуком (3000 Гц) в течение 24 часов (указаны стрелками): разрывы сенсорного эпителия периферической зоны сенсорного эпителия (а, б); вакуолизация сенсорных клеток в центральной зоне эпителия (в, г). Масштаб: 10 мкм. СЭМ.

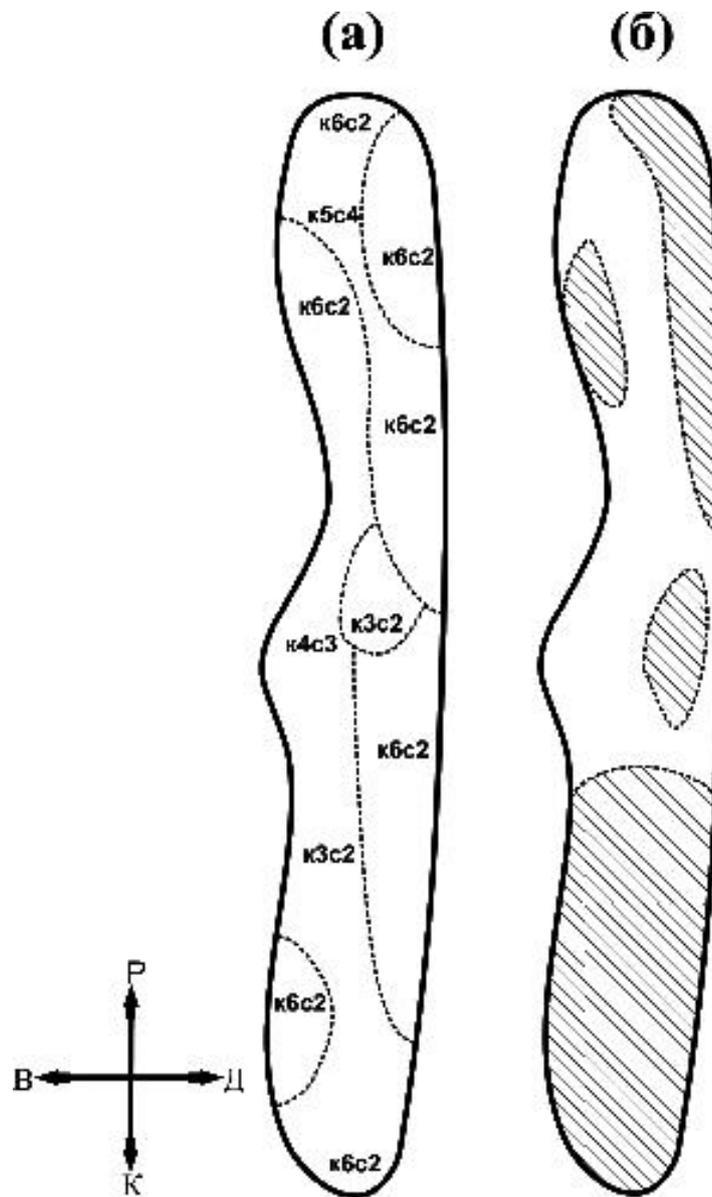


Рисунок 114. Избирательность деструктивных изменений волосковых клеток в саккулюсе у гибридов пыжьяна ♀ и байкальского омуля ♂ вследствие стимуляции интенсивным тональным звуком (3000 Гц) в течение 24 часов. Штриховкой обозначены зоны, в которых расположены клетки с короткими киноцилиями (к3с2 и к6с2), чувствительными к действию высокочастотных акустических сигналов.

8.2.2 Особенности дирекционной чувствительности саккулюса

По данным сканирующей микроскопии у сиговых рыб морфологическая поляризация рецепторных клеток в разных зонах саккулярной макулы неодинакова. В качестве примера на **рис. 115** представлены фрагменты поверхности саккулюса байкальского омуля, где хорошо видны зоны с однонаправленным и смежные зоны с разнонаправленным характером поляризации волосковых клеток. Особенности морфологической поляризации волосковых клеток состоят в следующем: макулу можно условно разделить на семь участков с определенной ориентацией (**рис. 111, а**). Ростральная область имеет две смежные зоны разнонаправленных горизонтально под углом и строго вертикально ориентированных стереоцилий волосковых клеток. В центральной зоне макулы с вентральной стороны и в ее каудальной области рецепторные пучки имеют строго вертикальную ориентацию. В центральной зоне, ближе к вентральной стороне, выделяется участок макулы со строго горизонтальной ориентацией сенсорных пучков. Центральная зона с дорсальной стороны имеет сенсорные элементы, ориентированные под углом, меняющимся в зависимости от расположения сенсорных клеток относительно ростокаудальной оси.

Сенсорный эпителий макулы пыжьяна имеет достаточно простую схему поляризации (**рис. 111, б**). Макулу можно условно разделить на четыре участка: ростральная область имеет две зоны с волосковыми клетками, имеющими ростокаудальную и каудоростральную ориентацию сенсорных пучков. Каудальная часть макулы также представлена двумя участками, сенсорных пучки на которых ориентированы не строго горизонтально по ростокаудальной оси.

Саккулярная макула озерного сига подразделяется на пять участков (**рис. 111, в**). От рострального конца до центральной области она разделена

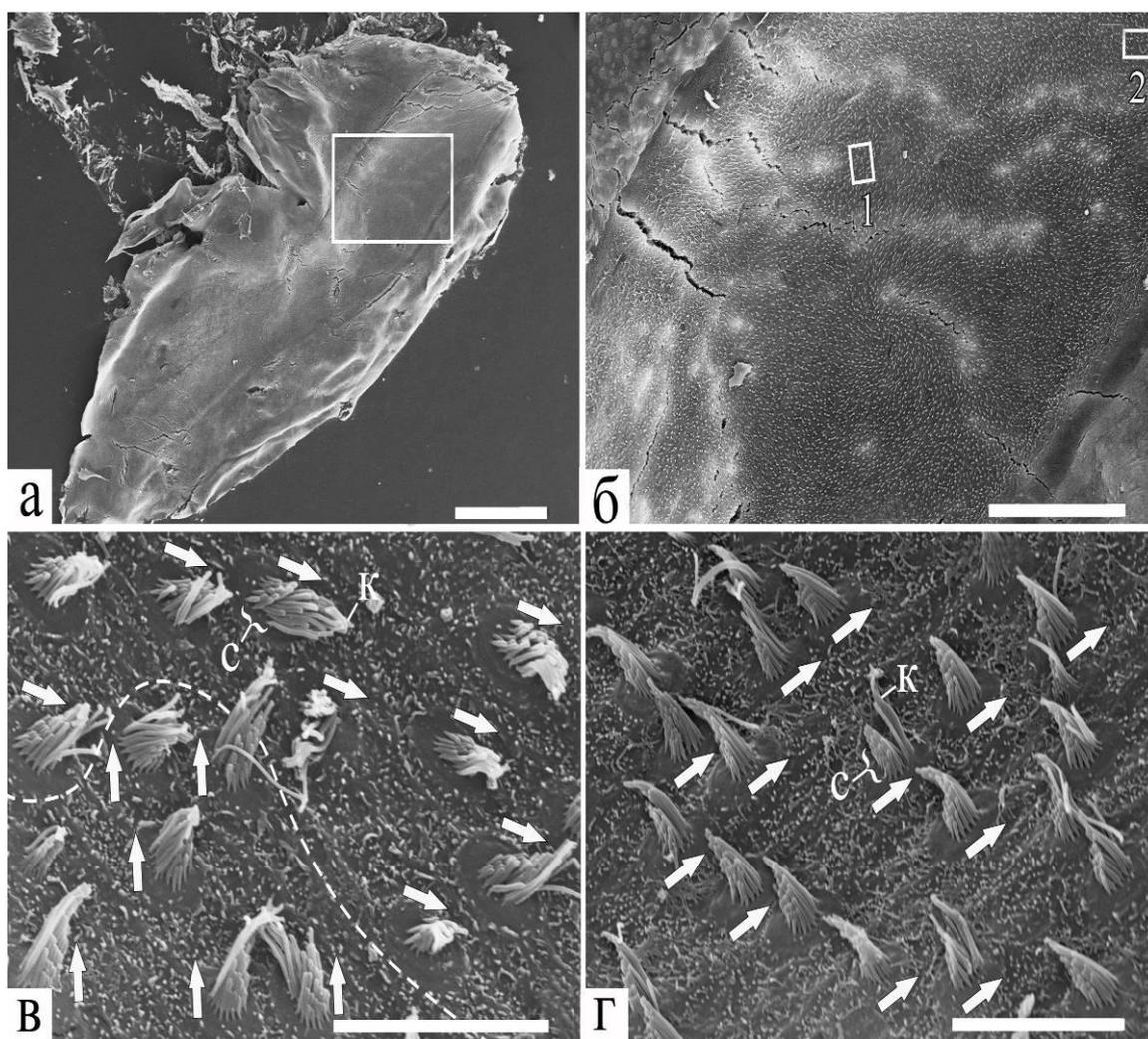


Рисунок 115. Особенности морфологической поляризации волосковых клеток в саккулярном эпителии у байкальского омуля. А – общий вид саккулярной макулы; б – увеличенный фрагмент выделенной области рисунка "а" в центральной зоне ростральной части макулы; в – увеличенный фрагмент "1" рисунка "б" со смежными разнонаправленными горизонтально и вертикально ориентированными сенсорными пучками волосковых клеток; г – увеличенный фрагмент "2" рисунка "б" с однонаправленной горизонтальной ориентацией сенсорных цилий волосковых клеток. Пунктиром обозначена граница между различными зонами поляризации волосковых клеток; с – стереоцилии, к – киноцилии. Масштаб: 10 мкм. СЭМ.

на две смежные зоны с разнонаправленными и горизонтально ориентированными сенсорными пучками волосковых клеток. Каудальная зона макулы также имеет волосковые клетки с горизонтально ориентированными сенсорными пучками, направленными в каудоростральном направлении. Центральная зона саккулюса разделена на два участка с волосковыми клетками, сенсорные пучки которых с дорсальной стороны ориентированы в вентродорсальном направлении, а с вентральной стороны имеют ростродорсальное направление.

Анализ особенностей морфологической поляризации сенсорных клеток у байкальских сиговых рыб показывает, что сенсорный аппарат волосковых клеток может иметь не только строго горизонтальную или вертикальную ориентацию, как было выявлено ранее [Popper, Coombs, 1982; Ricci, 2002], но и более сложные варианты их расположения. Это указывает на существование большей вариабельности поляризации сенсорных клеток, благодаря чему увеличивается возможность их стимулирования в разных направлениях.

Как и для рогатковидных, для каждой из макул сиговых рыб рассчитано процентное соотношение участков с разной ориентацией сенсорных пучков волосковых клеток относительно всей макулы и построены диаграммы дирекционной чувствительности саккулюса в сагиттальной плоскости.

У байкальского омуля диаграмма дирекционной чувствительности саккулюса является наиболее сложной и имеет значительные проекции как в вертикальной, так и в горизонтальной плоскостях (**рис. 116, а**). Омуль обладает достаточно сложным поведением, образует быстро мигрирующие стаи и крупные промысловые скопления, имеет рассеянное распределение, наконец, для него характерны активные горизонтальные и вертикальные миграции в пелагиали озера. Тем не менее, размножение байкальского омуля тесно связано с речными системами, а его популяционная структура в

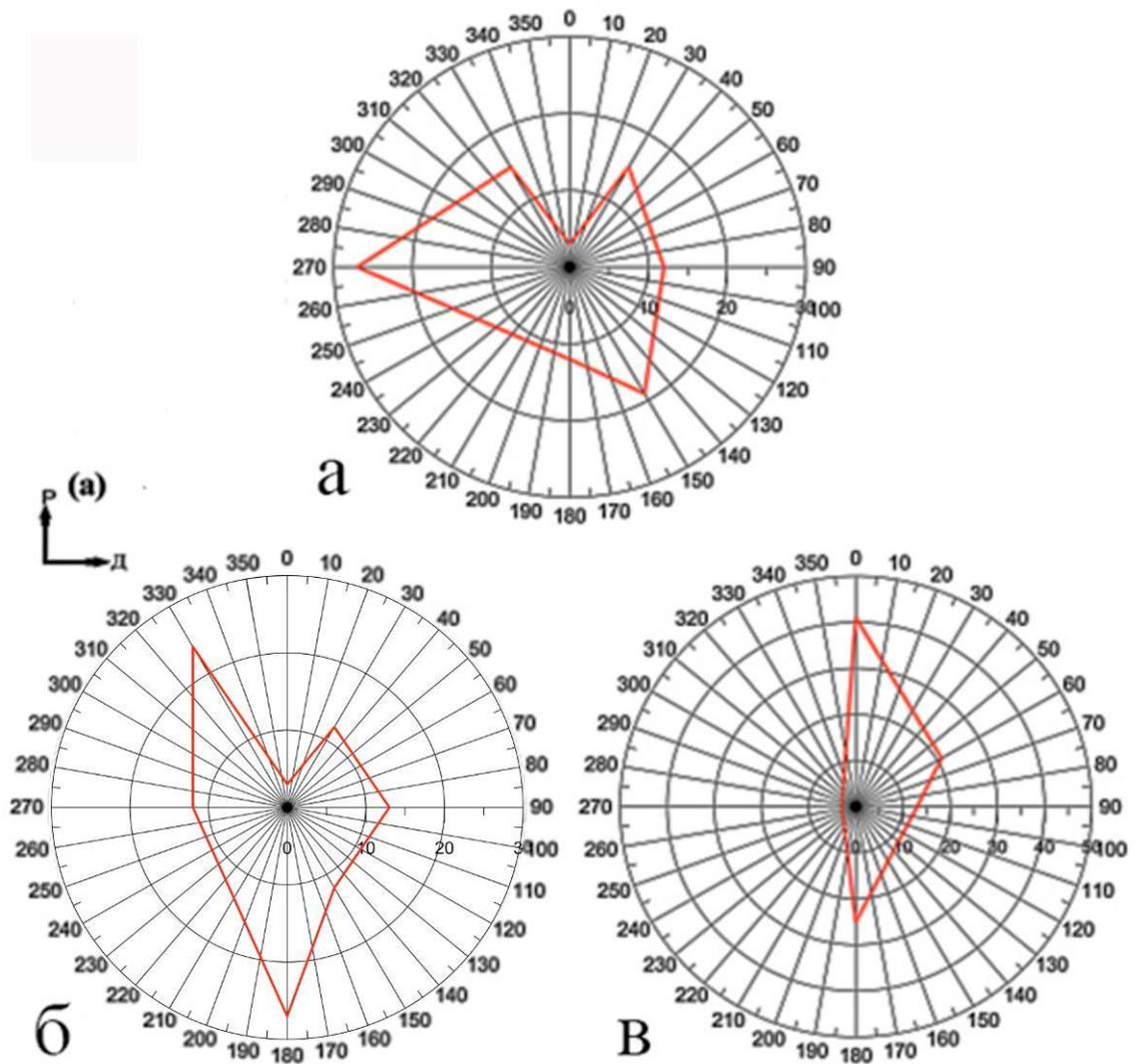


Рисунок 116. Диаграммы дирекционной чувствительности саккулюса у байкальского омуля (а), пыжьяна (б) и озерного сига (в). Направления дирекционной чувствительности: д – дорсовентральное (вертикальное), р – rostrocaudальное (горизонтальное).

большей степени определяется особенностями ареала размножения и фактором пространственной изоляции [Скрябин, 1969; Смирнов и др., 2009]. Дирекционная чувствительность саккулюса у пелагической селенгинской популяции байкальского омуля показывает, что оптимальным направлением для восприятия акустических сигналов является горизонтальная плоскость. У придонно-глубоководного байкальского омуля акустическая чувствительность, напротив, увеличивается в вертикальной плоскости, что

определяется необходимостью в акустической идентификации движений донных организмов.

Дирекционная чувствительность саккулюса у сига-пыжьяна к акустическим сигналам ориентирована как в горизонтальной, так и в вертикальной плоскости (**рис. 116, б**). Его макулу условно можно разделить на четыре участка: ростральная часть имеет две зоны с волосковыми клетками, имеющими ростокаудальную и каудоростральную ориентацию, каудальная часть макулы также представлена двумя участками, клетки которых направлены не строго горизонтально по ростокаудальной оси. Выявленную картину можно связать с приуроченностью пыжьяна к мелководной зоне и его обитанием преимущественно в речных системах [Скрябин, 1969]. Именно поэтому типичные обитатели рек должны иметь адаптации, направленные на высокодифференцированное восприятие биологически значимых акустических сигналов в условиях шума. Такого рода пространственная изоляция, судя по всему, позволила пыжьяну сформировать слуховую систему, ориентированную на восприятие сигналов как в вертикальном, так и в горизонтальном направлении.

Диаграмма дирекционной чувствительности саккулюса у озерного сига значительно варьирует в горизонтальной плоскости, имея достаточно узкую проекцию в вертикальной плоскости, и организована проще по сравнению с диаграммой дирекционной чувствительности саккулюса у байкальского омуля (**рис. 116, в**). Кроме того, в отличие от байкальского омуля и пыжьяна, озерный сиг не связан с речными системами и нерестится во внутренних частях заливов Байкала [Скрябин, 1969; Смирнов и др., 2009]. Озерные сиви большую часть года обитают на глубинах 40–100 м, питаются крупными формами амфипод и бычками. Освоив большие по сравнению с пыжьяном глубины, озерные сиви так или иначе больше связаны с открытым Байкалом.

8.3 Структурная специфика саккулярных отолитов у байкальских рыб

Несмотря на непрерывный рост тела рыбы, отолиты, как правило, сохраняют свою специфическую, характерную только для данного вида рыб форму. Это ставит вопрос о механизмах морфогенеза отолита у рыб в связи с их слуховой специализацией на разных этапах жизненного цикла и о роли формы и химического состава отолитов в обеспечении их акустического поведения. Изменение процессов развития отолита на макро- и микроуровнях приводит к различным вариациям его структуры, в том числе, к полиморфизму кристаллизации (абберации) карбоната кальция, при котором вместо типичного арагонита формируются его специфические модификации – ватерит или кальцит [Parmentier *et al.*, 2007]. Эти полиморфы карбоната кальция отличаются, прежде всего, геометрией кристаллов: ватерит имеет гексагональную структуру, кальцит – тригональную, арагонит – призматическую [Parmentier *et al.*, 2007; Сапожникова и др., 2010]. «Кристаллизованные» (абберантные) отолиты могут быть полностью или частично составлены из ватерита, отличаются меньшей толщиной, большей прозрачностью, отсутствием четкой оптической структуры, в частности, чередования оптически плотных (сезонных опаковых) и прозрачных (гиалиновых) зон [Jolivet *et al.*, 2008; Сапожникова и др., 2008, 2010].

Изучение механизмов сложных процессов кристаллизации отолитов представляет интерес с точки зрения использования этих данных при изучении механизмов сенсорной чувствительности тех видов рыб, для которых такого рода отолиты являются типичными [Аношко и др., 2007; Oxman *et al.*, 2007; Morat *et al.*, 2008]. Это связано с тем, что абберация отолита вызывает ослабление связи отолита с сенсорным эпителием и, соответственно, приводит к изменению слуховой чувствительности у рыб за счет повышения слухового порога в низкочастотной области [Oxman *et al.*, 2007].

8.3.1 Особенности формирования отолитов на примере рогатковидных рыб из разных экологических групп

У рыб вокруг саккулярного эпителия располагается так называемый транзитный эпителий, в состав которого входят клетки, секретирующие большую часть органического и минерального вещества, составляющего отолит (**рис. 105**) [Oxman *et al.*, 2007; Parmentier *et al.*, 2007; Сапожникова и др., 2003]. По данным рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии показано, что основным минеральным компонентом отолита и составляющих его отоконий является кальций [Михлин и др., 2010]. У каменной широколобки и у большой голомянки кальций-содержащие элементы обнаруживаются непосредственно в приядерной зоне цитоплазмы клеток транзитного эпителия в виде отдельных, не ограниченных мембраной электроноплотных нитей длиной до 1 мкм. Локализуясь в центральном отделе клетки, некоторые нити объединяются в более крупные округлые агрегаты, которые перемещаются в апикальные участки клетки и далее высвобождаются на поверхность эпителия (**рис. 117**).

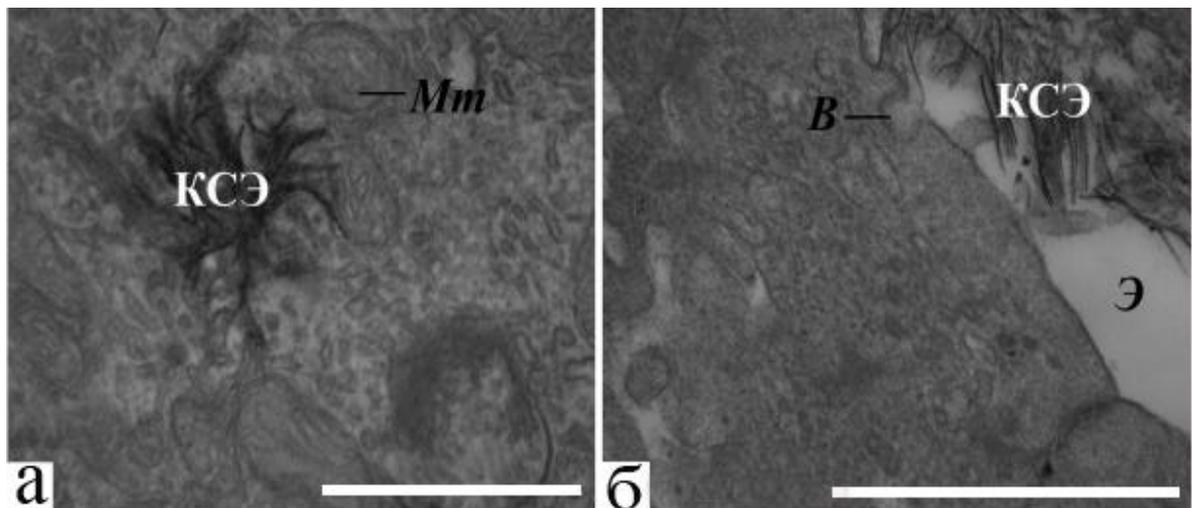


Рисунок 117. Формирование (а) и дальнейшее созревание кальций-содержащих элементов на поверхности транзитного эпителия у каменной широколобки (б): Условные обозначения: КСЭ – кальций-содержащие элементы, Мт – митохондрия; э – эндолимфа; в – везикула. Масштаб: а – 1 мкм; б – 5 мкм. СЭМ.

В клетках с интенсивной сборкой таких минерализованных структур обычно выявляется большое количество митохондрий с хорошо выраженными кристами, что, вероятно, говорит об энергоемкости процессов сборки и транспортировки этих образований. После секреции кальций-содержащих элементов из них далее формируются более крупные (0,9–8,4 мкм) отоконии, которые обнаруживаются на поверхности сенсорного и транзитного эпителия (**рис. 118**). У отоконий каменной широколобки наблюдается вариабельность их топографии: на их поверхности может располагаться от одной до нескольких выемок. Кроме того, иногда вместо типичной сферической формы, отоконии имеют форму дисков, что вероятно способствует их более упорядоченному скреплению между собой.

При детальном изучении макулы каменной широколобки видно, что минерализованные элементы могут нарастать на апикальной поверхности эпителия не только в виде отдельных отоконий, но и в виде более крупных образований – полиотокониальных масс. Такие массы имеют размер от 10,3 до 51,7 мкм и формируются непосредственно на транзитном эпителии. Кроме внутриклеточных белков в сборке таких высокоминерализованных компонентов клетки, вероятно, могут принимать участие и белки эндолимфы, выявленные недавно в слуховом органе у кемжи *Salmo trutta* и у американской палии *Salvelinus fontinalis* [Morat *et al.*, 2008]. По мере созревания эти минерализованные структуры отделяются от поверхности эпителия и прикрепляются к определенному участку растущего отолита. Показано, что адсорбция отоконий и полиотокониальных образований происходит в местах прироста дополнительной массы отолита, за счет которой у отолита формируются характерные борозды и неровности [Lychakov *et al.*, 2000; Lychakov, Rebane, 2005]. Благодаря тому, что отолит нарастает неравномерно относительно первичного центра закладки, сохраняется его видоспецифичная, более или менее фигурная форма. Без проведения дополнительных исследований нельзя сказать – как долго

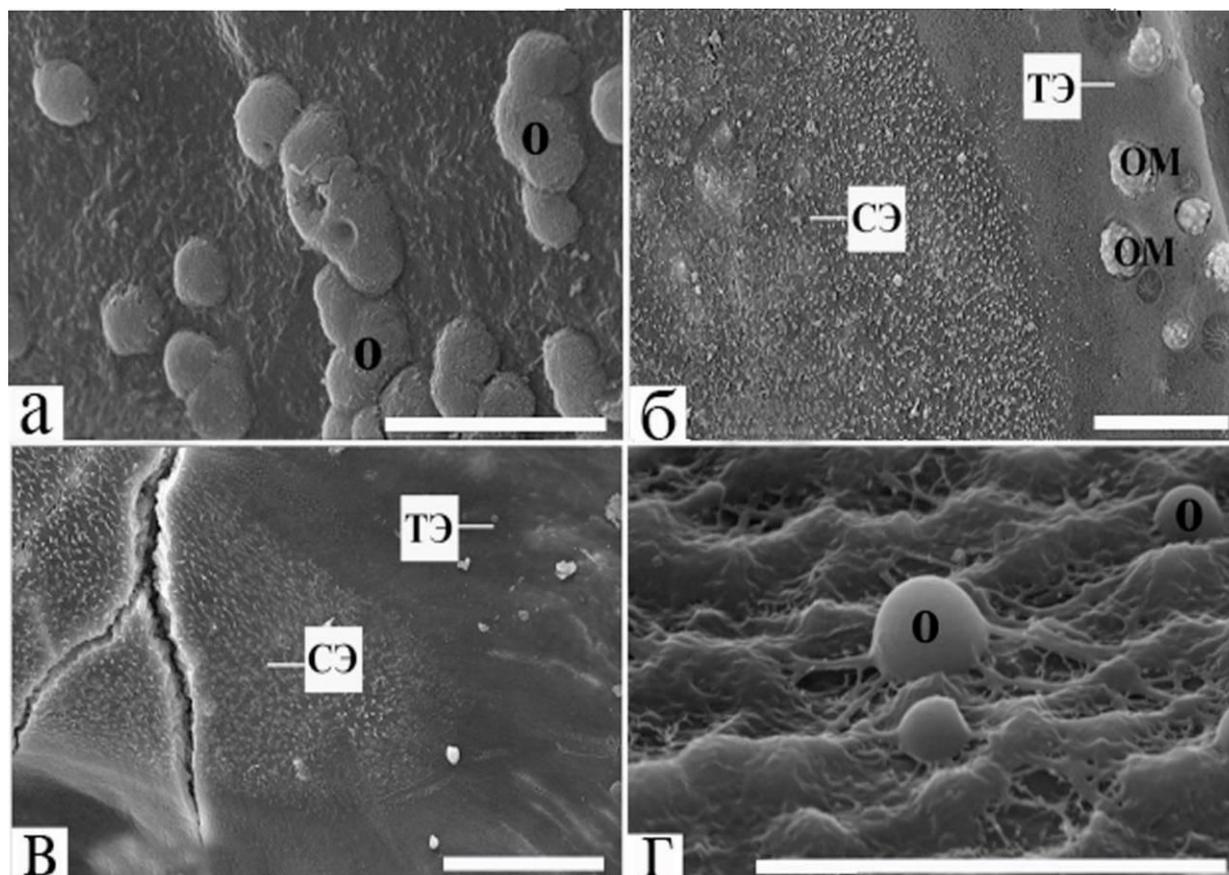


Рисунок 118. Поверхность транзитного саккулярного эпителия, участвующего в секреции кальций-содержащих элементов и образовании отдельных отоконий и отокониальных масс. А – общий вид и участок (б) транзитного эпителия у каменной широколобки с отокониальными массами на апикальной поверхности эпителия; в – общий вид и участок (г) транзитного эпителия большой голомянки с отдельными отокониями на апикальной поверхности эпителия. Условные обозначения: СЭ – сенсорный эпителий, ТЭ – транзитный эпителий, ОМ – отокониальные массы, О – отоконии. Масштаб: а – 10 мкм; б, в – 100 мкм; г – 10 мкм. СЭМ.

обнаруженные нами минерализованные образования остаются в составе поверхности эпителия. В сканирующем электронном микроскопе хорошо видно, что они в разной степени погружены в цитоплазму клеток транзитного эпителия (**рис. 118**). В связи с этим, можно предположить, что находясь в составе апикальных участков клеток эпителия, они повышают жесткость транзитного эпителия и таким образом способны существенно

модулировать акустическую чувствительность сенсорного эпителия. Исходя из этого, не исключено, что данные минерализованные образования, встроенные в поверхность эпителия до их высвобождения в эндолимфу, могут принимать непосредственное участие в первичной обработке акустических сигналов. Отделившись от поверхности эпителия, отоконии и отокониальные массы далее прикрепляются к определенному участку растущего отолита. Ранее было показано, что продолжающийся рост отолита связан с увеличивающимся щелочным градиентом эндолимфатической жидкости по направлению от эпителия к отолиту [Mugiya, 1972; Gauldie, 1993]. Отверждение отолита и отоконий зависит от химического состава эндолимфатической жидкости [Falini *et al.*, 2005], которая содержит все ионные предшественники (например, ионы K^+ , Ca^{2+} и HCO_3^-), а также коллаген и аминокислоты, секретлируемые транзитным эпителием, ионоцитами и, в меньшей степени, опорными и сенсорными клетками слухового эпителия [Oxman *et al.*, 2007].

Показано, что у каменной широколобки (**рис. 119**) и у большой голомянки (**рис. 120**) прикрепленные к различным участкам отолита отоконии имеют различный размер. Отоконии большего диаметра (в среднем – 8,19 мкм) свойственны для ростральной и постростральной зоны продолговатого отолита каменной широколобки и для характерного выступа на отолите большой голомянки (в среднем – 7,2 мкм), что совпадает с количественными показателями прироста дополнительной массы отолитов относительно их центров (**рис. 121**).

В отличие от фигурного отолита каменной широколобки, менее рельефный отолит большой голомянки не содержит на поверхности полиотокониальных масс.

На основании полученных данных можно заключить, что отоконии (или их определенная часть), изначально сгруппированные на поверхности транзитного эпителия, далее перемещаются через эндолимфу и адсорбируются на отолите не только на начальном этапе их формирования (в

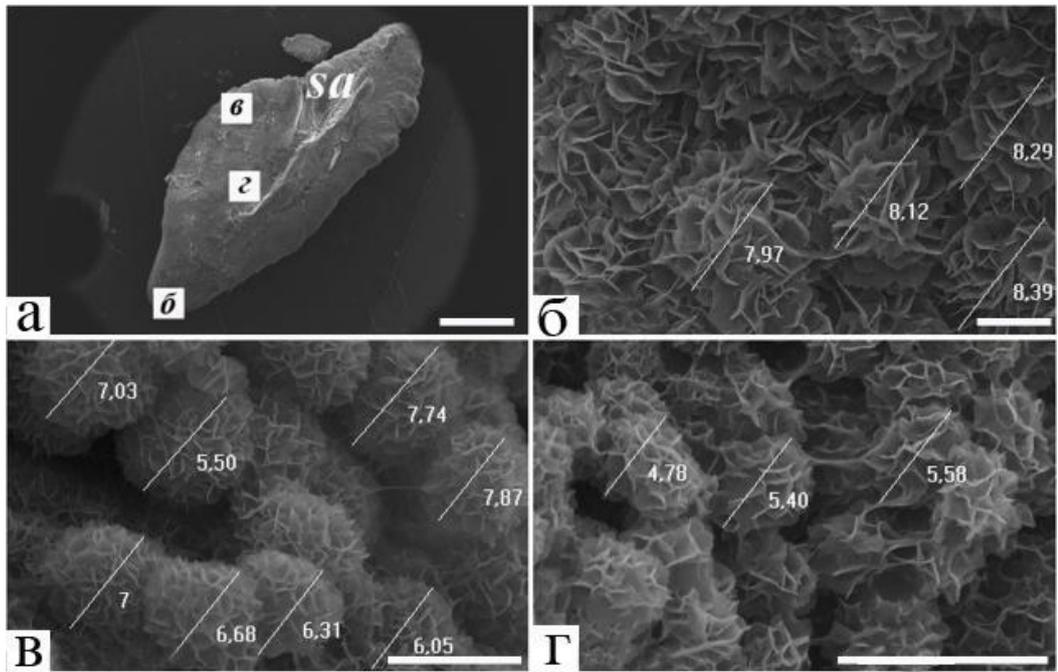


Рисунок 119 Участки поверхности отолита у каменной широколобки с указанием диаметра (в мкм) составляющих его отдельных отоконий: общий вид отолита (а), далее даны отдельные зоны отолита – построструм отолита (б); латеральная (периферическая) зона (в); центральная зона (г); sa – sulcus acusticus. Масштаб: а – 1 мм; б – г – 10 мкм. СЭМ.

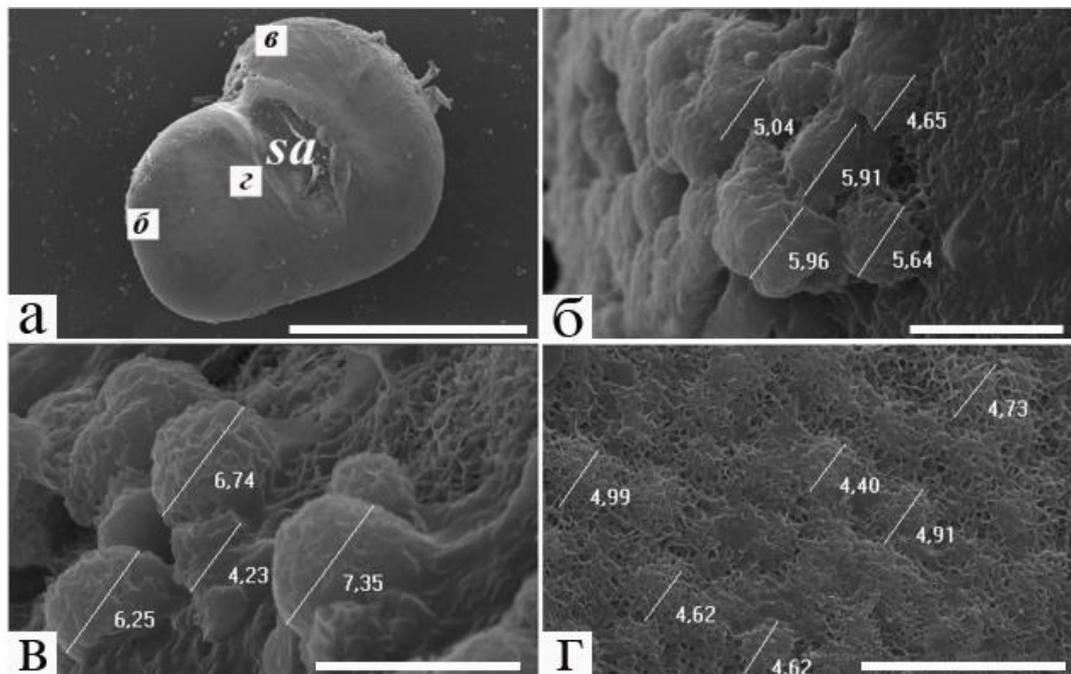


Рисунок 120. Участки поверхности отолита у большой голомянки с указанием диаметра (в мкм) составляющих его отдельных отоконий: общий вид отолита (а), далее в соответствии с приведенными указаниями даны отдельные зоны отолита; построструм отолита (б); латеральная (периферическая) зона (в); центральная зона (г); sa – sulcus acusticus. Масштаб: а – 1 мм; б – г – 10 мкм. СЭМ.

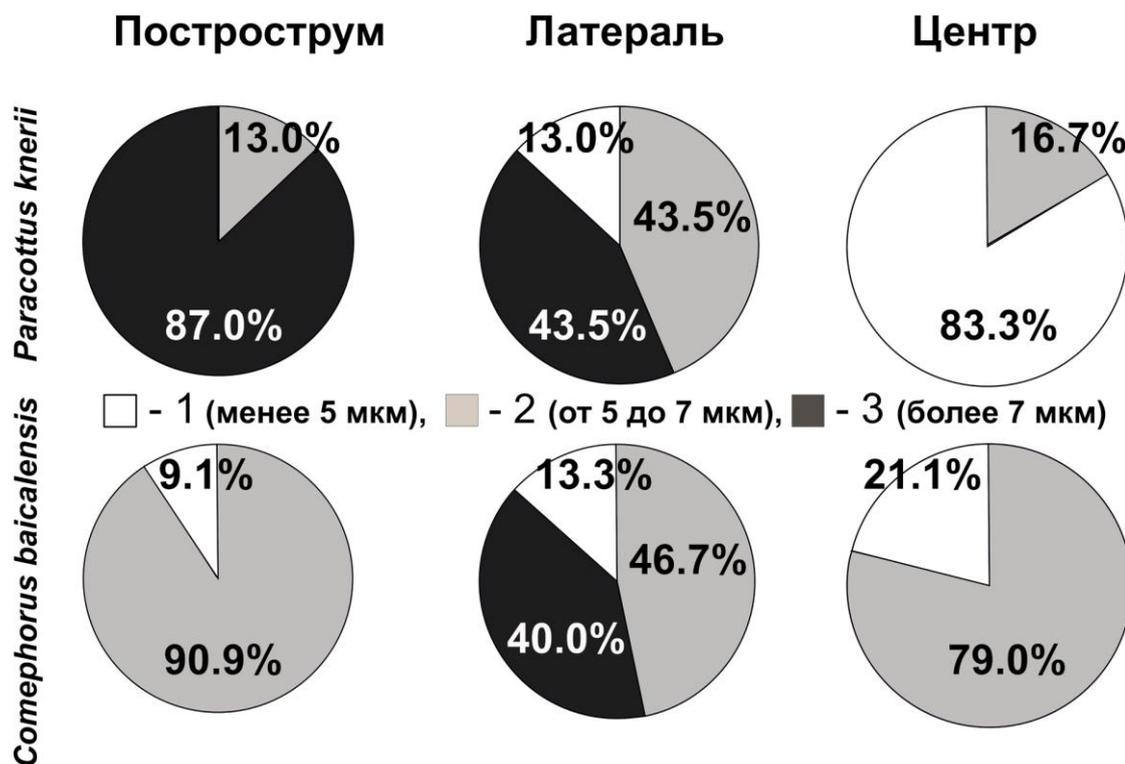


Рисунок 121. Диаграммы зонального распределения отоконий разного размера на отолитах каменной широколобки и большой голомянки. 1 – количество малых отоконий (диаметр – менее 5 мкм), %; 2 – количество отоконий среднего размера (диаметр – от 5 до 7 мкм), %; 3 – количество больших отоконий (диаметр – более 7 мкм), %.

эмбриональном периоде) [Salem, Zaghoul, 2001], но и на протяжении всего роста рыбы.

По данным ряда авторов [Lychakov *et al.*, 2000; Lychakov, Rebane, 2005], асимметричные отолиты имеют иной центр массы, нежели симметричные отолиты. Следовательно, размер и форма отолита могут влиять на динамику их микродвижений в ответ на акустические или вестибулярные стимулы. Судя по всему, наличие полиотокониальных масс на поверхности отолитов является адаптивной особенностью, характерной для прибрежных видов рыб в связи с их повышенной активностью в условиях значительных колебаний физических условий литоральной зоны озера – волновом воздействии и температурном режиме. Кроме того, можно

предположить, что наличие полиотокониальных масс у прибрежных видов рыб предопределяет возможность образования кристаллизованного (аберрантного) отолита при изменении центра и вектора его кристаллизации (рис. 122).

Наши данные показывают, что наличие полиотокониальных масс, а также аберрации отолитов – характерная черта отолитового аппарата у донных обитателей прибрежной зоны озера Байкал, в частности, для каменной широколобки. Для пелагических глубоководных видов рыб, в частности, большой голомянки, полиотокониальные массы и аберрантные отолиты нетипичны. На основе данных по микромеханике отолита и морфологических исследований ранее был проведен математический анализ колебаний отолита в поле звуковой волны с целью оценки влияния формы отолита на амплитуду его сдвига относительно сенсорного эпителия под воздействием звука [Lychakov *et al.*, 2000; Lychakov, Rebane, 2005]. Оказалось, что амплитуда его микроколебаний зависит от морфологических параметров присоединенных масс. Установлено, что для звуков с частотами, большими или равными частоте собственных колебаний отолита диаграмма направленности восприятия звука с помощью отолита обладает существенной анизотропией, зависящей от его формы. Это еще раз доказывает, что вариабельность формы отолитов байкальских рогатковидных рыб – продолговатой у прибрежных видов и объемной грибовидной формы у пелагических голомянок – имеет приспособительное значение и обусловлена необходимостью настройки отолитовых органов на распознавание сенсорными клетками различных направлений звука.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что отолиты имеют строго определенную архитектуру и ориентацию в саккулярной макуле, также имеющей специфические особенности пространственной поляризации сенсорных пучков волосковых клеток. В процессе восприятия акустических сигналов микродвижения отолита через

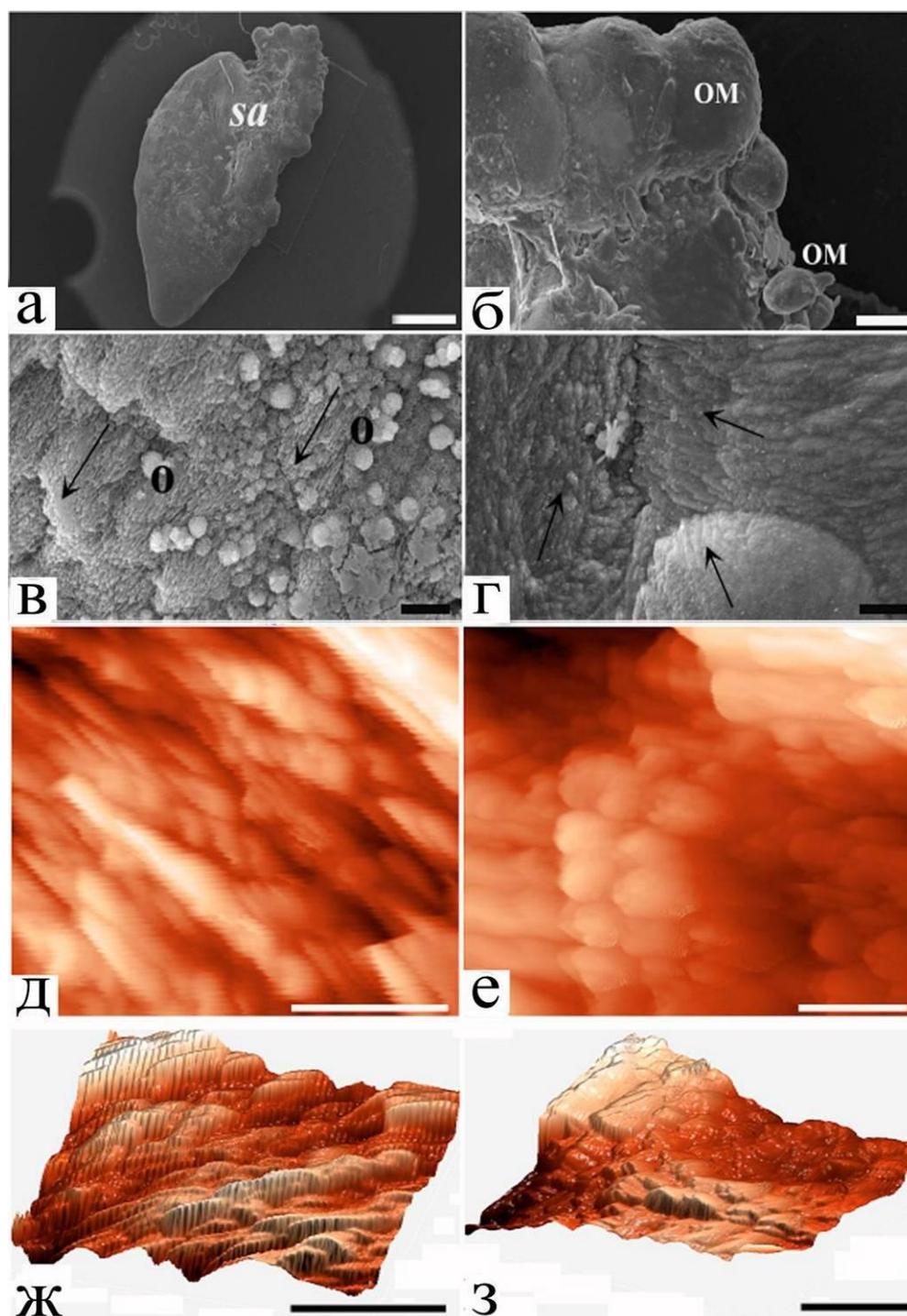


Рисунок 122. Аберрантные отолиты у каменной широколобки как типичного представителя прибрежной зоны оз. Байкал по данным сканирующей (а – г) и атомно-силовой (д – ж) микроскопии. А – общий вид отолита; б – роstralная зона отолита с обилием отокониальных масс; в, г – направления вектора прироста отоконий на поверхности отолита отмечены стрелками; д – особенности топографии арагонитных «игольчатых» кристаллов карбоната кальция; е – особенности топографии "аберрантных" ватеритовых кристаллов карбоната кальция. Микрорельеф поверхности по данным АСМ: д, е – 2D; ж, з – 3D реконструкции. Sa – sulcus acusticus, OM – отокониальные массы и отдельные отоконии (O) на поверхности кристаллизованного отолита. Масштаб: 0,5 мкм.

отолитовую мембрану могут передаваться на разные волосковые клетки, имеющие соответствующий тип поляризации. Для прибрежной донной каменной широколобки оптимальным является сочетание вертикальной поляризации киноцилий сенсорного эпителия и плоского продолговатого отолита, а для пелагической большой голомянки – горизонтальной поляризации киноцилий и объемного отолита грибовидной формы.

8.4 Оценка акустической чувствительности у байкальских рогатковидных и сиговых рыб

При изучении уровней акустической чувствительности у рыб с помощью условно-рефлекторного метода возникает необходимость объективного анализа их поведения в контроле и в эксперименте. В ходе тестирования функциональных параметров слухового восприятия у рыб были использованы алгоритмы качественного анализа, которые позволили регистрировать поведение гидробионтов при воздействии акустических сигналов [Куликов, Куликов, 2008, Куликов, Сапожникова, 2011]. С помощью этих алгоритмов удалось охарактеризовать пройденный путь, среднюю скорость и пространственное предпочтение рыб в контроле и после предъявления акустических стимулов. Проведенные исследования показали, что диапазон слуховой чувствительности у рогатковидных рыб находится в более низкочастотном диапазоне по сравнению с сиговыми рыбами (**рис. 123, табл. 4**). Благодаря наличию у сиговых плавательного пузыря, который является хорошим резонатором и способствует трансформации высокочастотных сигналов в легко воспринимаемые сенсорными клетками низкочастотные колебания [Popper et al., 2003; Popper, Fay, 2011], эти рыбы чувствительны к более высокочастотному спектру акустических сигналов, что показано в ходе поведенческих экспериментов.

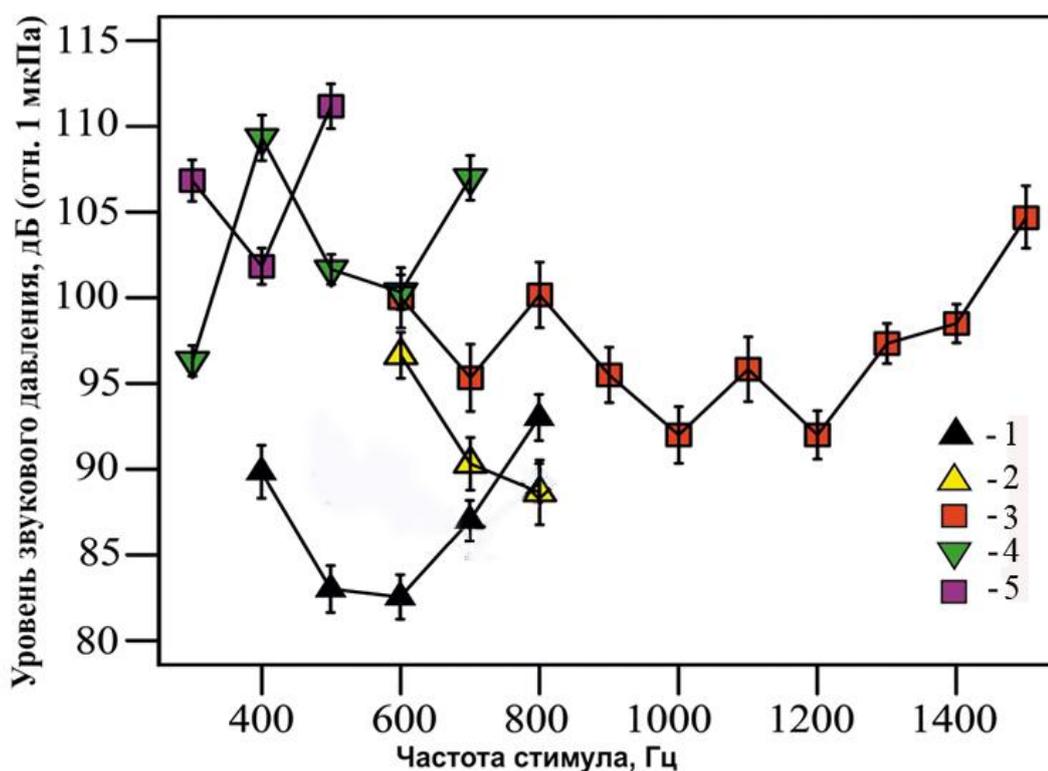


Рисунок 123. Сравнительные особенности аудиограмм у байкальского омуля (1), пыжьяна (3), озерного сига (4), каменной широколобки (5) и северобайкальской желтокрылки (6).

Таблица 4. Частотные диапазоны слуховой чувствительности у байкальских рогатковидных и сиговых рыб.

Вид, средняя длина, мм	Диапазон максимальной чувствительности, Гц
каменная широколобка, 114	300–700
северобайкальская желтокрылка, 116	300–500
байкальский омуль, 301	400–800
пыжьян, 178	600–800
озерный сиг, 154	600–1500

Характерно, что области максимальной чувствительности у изученных байкальских рыб достаточно узкие по сравнению с ранее исследованными диапазонами слуховой чувствительности у морских рыб

[Кузнецов, Кузнецов, 2007; Popper *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011; Wahlberg, Westerberg, 2005]. У рогатковидных рыб это может быть связано с отсутствием плавательного пузыря, который, как отмечалось выше, расширяет диапазон воспринимаемых частот. Специфические особенности участия плавательного пузыря и других газ-содержащих структур в преобразовании акустических сигналов у сигов еще не изучены. Нет также полных сведений об особенностях распространения звуков в водной толще Байкала в связи со спецификой его рельефа и другими физико-химическими особенностями среды обитания изучаемых рыб. Кроме того, при сравнительной оценке слуха у пресноводных и морских рыб нужно учитывать, что данные по чувствительности слуха могут отличаться в зависимости от применяемого метода его оценки. В настоящее время наряду с электрофизиологическими [Ramcharitar, Popper, 2004] и морфологическими методами, основанными на рецепции волосковыми клетками резонансных частот [Smith *et al.*, 2011], используются различные поведенческие методы определения параметров слуха: оценка акустической чувствительности после предварительного обучения к восприятию разных частот [Cervi *et al.*, 2012], акустические реакции испуга, преимпульсного торможения и фонотаксиса [Bhandiwad, Sisneros, 2016]. Необходимо отметить, что анализ слуховой чувствительности у байкальских рыб мы проводили без учета того, что помимо волосковых клеток внутреннего уха в восприятии звуковых сигналов могут также принимать участие невромасты боковой (сейсмоденситивной) линии. По этой причине мы не можем определить – в какой мере пищевое поведение экспериментальных рыб (вызванное действием акустических сигналов) было обусловлено функционированием только волосковых клеток внутреннего уха, либо в этом процессе дополнительно могли принимать участие механорецепторы боковой линии. Как известно, невромасты непосредственно вовлечены в процессы рецепции низкочастотных колебаний воды [Kalmijn, 1989] и морфологически хорошо представлены как у сиговых [Knizhin *et al.*, 2006],

так и у бычков-подкаменщиков [Сиделева, 1982; Sideleva, 2003] Байкала. Причем, с помощью электрофизиологических методов показано, что разные невромасты в пределах одной боковой линии рыб могут быть настроены на восприятие звуков различной частоты в пределах от 20 до 100 Гц [Weeg, Bass, 2002]. Кроме того, авторы данного исследования полагают, что у рыб, имеющих газ-содержащие органы, границы акустической чувствительности боковой линии могут быть увеличены за счет отраженного сигнала от плавательного пузыря.

В связи с вышеперечисленными обстоятельствами, в плане изучения тонотопической карты восприятия разночастотных звуков волосковыми клетками саккулюса наиболее перспективным подходом может быть использование цитохимических методов регистрации ранних функциональных перестроек клеток при резонансном восприятии звуков. В отличие от методов избирательного разрушения волосковых клеток [Smith *et al.*, 2011], этот подход может дать более точные сведения о специфических особенностях пространственного кодирования восприятия акустических сигналов у рыб в связи с их адаптациями к конкретным условиям обитания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что особенности ультраструктурного развития клеток обонятельного эпителия у рыб зависят от фазы их жизненного цикла. В репродуктивный период в рецепторных клетках формируются адаптивные перестройки, которые вначале мобилизуют их для восприятия феромонов во время химической коммуникации половых партнеров, а впоследствии выключают эту функцию при переходе самцов рыб к охране икры. Причем, соответствующие изменения обнаруживаются и в опорных элементах эпителия. В мерцательных клетках увеличивается количество митохондрий, что необходимо для усиления перемешивания обонятельной слизи и увеличения вероятности рецепции феромонов, действующих в очень низких концентрациях. Таким образом, это говорит о том, что сложное одорант-зависимое поведение рыб обеспечивается не только центральными механизмами нервной системы, но и перестройками, которые возникают на уровне сенсорного отдела обонятельного анализатора.

Сравнительный анализ полученных данных показывает, что динамика ультраструктурных перестроек обонятельных клеток в нерестовый период сходна с таковой у В-лимфоцитов иммунной системы в процессе их стимул-зависимой дифференцировки в плазматические клетки. Вопрос о возможности существования общих принципов функционирования иммунных и обонятельных клеток обсуждается уже давно [Thomas, 1974; Boyse *et al.*, 1982; Chen, Lancet, 1984; Lancet *et al.*, 1993; Farbman, 1992; Shykind, 2005; Косицын, Клименков, 1993; Марков, Куликов, 2006; Magklara, Lomvardas, 2013; Margolis, Getchell, 2013]. Главными аргументами в пользу проведения такой аналогии являются два наиболее значимых факта: полиморфизм семейства генов, кодирующих мембраносвязанные одорант-связывающие рецепторы [Buck, Axel, 1991] и моноспецифичность обонятельных клеток [Chess, 1994]. Как показывают наши исследования, рецепторные нейроны обладают еще одним важным свойством,

наблюдающимся у стимулированных антигеном В-клеток: они также способны трансформироваться на режим активной секреции, причем такая секреция в нейронах возникает со стороны терминали дендрита. Необходимо отметить, что по ультраструктурным признакам эти изменения клеток развиваются как метаболически активный процесс, сопровождающийся усилением ядерно-цитоплазматических взаимодействий, увеличением количества рибосом и активацией аппарата Гольджи. Эти факты свидетельствуют о том, что обонятельные клетки могут не ограничиваться только рецепторной функцией. Отдельные, полученные нами морфологические данные свидетельствуют о том, что дендритная секреция может быть вызвана также продолжительной стимуляцией одорантами, однако для подтверждения данного вывода необходимы более тщательные исследования. Таким образом, в настоящее время сложно однозначно определить функциональное назначение секреторного процесса в обонятельных клетках, считающихся клетками со стабильным структурно-функциональным статусом. Тем не менее, можно предположить, что способность клеток переходить на режим дендритной нейросекреции вероятно носит адаптивный характер и направлена на реализацию какой-то новой специфической функции. Для выявления молекулярных механизмов, которые вызывают такие перестройки, необходимы специальные экспериментальные исследования.

Оказалось, что адаптивные изменения в обонятельном эпителии рыб могут возникать не только в связи с феромональной регуляцией их репродукции. Они могут быть вызваны также влиянием других физико-химических факторов водной среды. Так, показано, что глубоководные рыбы, эволюционно приспособленные к разным стратегиям пищевого поведения, имеют неодинаковую резистентность к гипобарической гипоксии. По сравнению с донными рыбами, ольфакторный аппарат гидробионтов, пищевое поведение которых связано с постоянными вертикальными миграциями и изменениями режимов гидростатических

давлений, в большей степени адаптирован для поддержания его структурно-функциональной целостности. Кроме того, установлено, что дендриты хеморецепторных нейронов глубоководных рыб содержат хорошо организованную систему цитоскелета, что вероятно является дополнительным фактором, обеспечивающим структурную стабильность клеток с пониженной функциональной активностью, что наблюдается в условиях низкого содержания в байкальской воде органических веществ – потенциальных раздражителей рецепторных клеток. Полученные цитологические данные могут быть интересны для понимания фундаментальных механизмов, обеспечивающих устойчивое функционирование обонятельной системы гидробионтов в условиях воздействия разных режимов гидростатических давлений.

Непрерывное взаимодействие обонятельного эпителия с многообразными факторами внешней среды делает его уязвимым по отношению ко многим токсическим агентам антропогенного происхождения. Даже кратковременный контакт поверхностно активных веществ, в частности, фенолов, с сенсорным отделом обонятельной системы вызывает в нем глубокие дегенеративные изменения, что приводит к их интенсивному накоплению в организме и переносу в другие трофические уровни. Кроме того, показано, что длительная одорантная стимуляция нетоксичными водорастворимыми веществами также приводит к стрессированию обонятельных клеток и их последующему апоптозу. Такие деструктивные перестройки в сенсорном аппарате могут существенно влиять на естественное социальное поведение рыб, поиск пищи и их репродукцию. В связи с этим, нами проведены детальные исследования процессов компенсаторного нейрогенеза в обонятельном эпителии при его продолжительной стимуляции веществами нетоксичной природы – смесью аминокислот и пептидов. В отличие от распространенной практики работы с замороженными или парафинизированными срезами, для изучения процессов нейрогенеза у рыб с помощью BrdU мы использовали только

целостные обонятельные розетки. Небольшой объем препаратов давал возможность проводить такие исследования без повреждения их нативной структуры методами конфокальной микроскопии. Использование этого подхода позволило не только регистрировать интенсивность нейрогенеза, но и определять динамику топографического распределения новообразованных клеток в эпителии во времени. В частности, установлено, что процессы естественного нейрогенеза могут быть активизированы не только после острых, нарушающих обонятельное восприятие воздействий, но и после длительной стимуляции нетоксичными запаховыми стимулами.

Кроме того, благодаря анализу особенностей развития процессов нейрогенеза во времени, впервые удалось увидеть, что молодые клетки вначале структурируются в отдельные небольшие кластеры, а затем в верхних слоях эпителия они образуют более крупные клеточные скопления – домены. Мы полагаем, что такие пространственно разграниченные массивные популяции опорных и рецепторных клеток, синхронизированные относительно начала их жизненного цикла, могут стабильно функционировать в качестве отдельных функциональных единиц. Полученные результаты могут быть важны в связи с актуальностью вопроса о возможности существования пространственного кода восприятия запахов, который может осуществляться не только в обонятельной луковице, но и на уровне периферического отдела хемосенсорной системы [Buck, 1996; Mori *et al.*, 2006; Arzi, Sobel, 2011].

Установлено, что обонятельные клетки, возникшие в базальных отделах эпителия после деления стволовых клеток, претерпевает ряд цитохимических перестроек, которые направлены на их дальнейшую миграцию и дифференцировку. Причем, впервые обнаружено, что ключевую роль в этих процессах приобретают актиновые микрофиламенты. Показано, что перед миграцией молодого нейрона в его дендритном отростке происходит уплотнение примембранного слоя F-актина, благодаря чему внутрь дендрита перемещается наиболее массивная часть клетки – ядро.

Такая трансформация клетки придает ей наиболее удобную форму для успешного передвижения и позиционирования в межклеточном пространстве сенсорного аппарата.

После закрепления переднего участка дендрита в поверхности эпителия, в его апикальном участке формируется плотный примембранный слой актиновых микрофиламентов с порой, просвет которой открывается в цитоплазму. Какую функциональную нагрузку выполняет этот, не заполненный F-актином примембранный участок клетки – неизвестно. Возможно, что через пору от мембраносвязанных рецепторов проходит первый внутриклеточный сигнал, исходящий от одорантов внешней среды. Результаты этих исследований очень важны в связи с обсуждающимся в последнее время вопросом о механизмах, которые обеспечивают моногенную и моноаллельную экспрессию генов, кодирующих обонятельные рецепторы [Tan *et al.*, 2015; Monahan, Lomvardas, 2015; Nagai *et al.*, 2016]. В частности, наиболее важными представляются данные о том, что эпигенетическая регуляция отбора такого единичного гена запускается при обязательном участии функционального рецептора, расположенного в составе чувствительного участка дендрита [Lewcock, Reed, 2004; Serizawa *et al.*, 2003; Serizawa *et al.*, 2004; Shykind, 2005; Shykind *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2014; Monahan, Lomvardas, 2015].

Восприятие химических сигналов интегрировано с функционированием других сенсорных модальностей, в частности, со слуховой системой, что позволяет животным более полно анализировать доступную информацию о внешней среде [Budinger, Scheich, 2009; Wesson, Wilson, 2010; Kulahci *et al.*, 2014]. Для изучения адаптивных особенностей в периферическом отделе акустического анализатора мы использовали представителей из разных таксономических групп рыб озера Байкал с характерными особенностями их поведения и экологии.

С помощью сканирующей электронной микроскопии установлено, что для саккулярной макулы рыб, обитающих в мелководной зоне, типичными

являются сенсорные клетки с преимущественно короткими стереоцилиями, воспринимающими высокочастотные звуковые колебания, связанные с грунтом. В отличие от этого, для пелагических видов сиговых рыб и голомянок свойственны большие по площади макулы, занимаемые волосковыми клетками с удлиненными стереоцилиями, что способствует восприятию низкочастотных акустических колебаний, свойственных для глубоководной зоны Байкала.

Такие же элементы сходства у разных групп рыб, обитающих в сходных биотопах, наблюдаются и в отношении особенностей их дирекционной акустической чувствительности. Так, у прибрежного бентического вида каменной широколобки и у бентопелагического вида северобайкальской желтокрылки выявлено доминирование вертикальной морфологической поляризации сенсорных пучков, что обеспечивает восприятие акустических сигналов, распространяющихся в дорсо-вентральном направлении вблизи со дном. В сравнении с этим, в саккулярной макуле у пелагических сиговых рыб, а также у глубоководных большой и малой голомянок горизонтальная ориентация волосковых клеток превалирует над вертикальной. Такая поляризация рецепторных элементов рыб направлена на восприятие звуковых волн, распространяющихся преимущественно в росто-каудальном направлении.

Сравнительно-морфологические исследования говорят о том, что, несмотря на таксономические различия, рыбы, обитающие в сходных биотопах, имеют морфологически близкие параметры устройства рецептивного участка волосковых клеток как в отношении их морфологии, так и дирекционной чувствительности. Из этого следует, что структура чувствительных клеток в большей степени предопределяется не систематическим положением рыб, а особенностями занимаемой ими экологической ниши. Это еще раз подтверждает известный эволюционный принцип о том, что существование организмов в одинаковых условиях среды приводит к формированию структур, имеющих сходные

морфологические особенности. В данном случае, такие элементы сходства наблюдаются в структуре и поляризации цилиарного аппарата в составе саккулярных макул у волосковых клеток.

Таким образом, существенные отличия образа жизни у различных групп байкальских рыб были использованы нами в качестве естественной модели для выявления морфо-функциональных адаптаций обонятельного и слухового анализаторов у гидробионтов, эволюционно приспособленных к жизнедеятельности в разных экологических условиях. В данных исследованиях Байкал выступает не как озеро, богатое эндемиками, а как метод, методологический подход, который дает нам модельные объекты, на которых можно изучать проблемы, связанные с изучением тех, или иных физиологических адаптаций. Отдельные вопросы, касающиеся изучения процессов нейрогенеза, в модельных экспериментах решались также на других, более неприхотливых к содержанию аквариумных видах рыб. Результаты проведенных исследований показывают, что периферические отделы как обонятельного, так и слухового аппарата рыб обладают большим приспособительным потенциалом, позволяющим им адаптироваться к меняющимся условиям внешней среды. Полученные сведения не исчерпывают того структурно-функционального многообразия свойств, которые заключены в этих системах и могут быть использованы для дальнейшего изучения сложных процессов их функционирования и межсенсорных взаимодействий.

ВЫВОДЫ:

1. В смене фаз сложного репродуктивного поведения рыб важную роль играют адаптивные перестройки периферического отдела обонятельного анализатора.
2. Обонятельный эпителий пелагических рыб имеет существенно большую, чем у бентосных, структурно-функциональную устойчивость к воздействию гипобарической гипоксии, что, вероятно, является результатом их адаптации к сезонным и суточным вертикальным миграциям в процессе пищевого поведения.
3. Цитоскелет в дендритах рецепторных клеток формируется не только при значительных функциональных нагрузках в период нереста, но и при низкой концентрации одорантов во внешней среде. При сенсорной депривации система микротрубочек является важным компонентом, обеспечивающим структурно-функциональную целостность рецепторных клеток.
4. Длительная одорантная стимуляция рыб нетоксичными веществами вызывает избирательную дифференцировку и программированную гибель отдельных клеток обонятельного эпителия, что приводит к компенсаторному усилению процессов нейрогенеза.
5. Обонятельные нейроны могут трансформироваться в клетки с дендритной нейросекрецией, что свидетельствует об их способности к переключению на другой тип функциональной специализации.
6. В ходе конститутивного нейрогенеза новообразованные клетки мигрируют к апикальной поверхности обонятельного эпителия, где они формируют пространственно разграниченные домены, которые, возможно, могут функционировать в качестве морфо-функциональных единиц.
7. В процессе дифференцировки и миграции молодого обонятельного нейрона значительная доля его ядерного материала проникает внутрь дендрита с хорошо выраженным примембранным слоем актиновых

микрофиламентов, благодаря чему клетка принимает наиболее удобную форму для миграции в межклеточном пространстве.

8. После установления контакта обонятельной клетки с внешней средой, в примембранном слое F-актина терминали дендрита формируется пора, через которую от одорант-связывающих рецепторов может проходить первый внутриклеточный сигнал, необходимый для стабилизации экспрессии обонятельных рецепторов.

9. У байкальских бентических и бенто-пелагических рыб слуховой саккулярный эпителий представлен сенсорными клетками с вертикальной поляризацией и преимущественно короткими стереоцилиями, воспринимающими высокочастотные звуковые колебания, связанные со дном. В отличие от этого, для пелагических голомянок и сиговых видов рыб свойственны волосковые клетки с горизонтальной поляризацией и удлинёнными стереоцилиями, что способствует наиболее адекватному восприятию низкочастотных акустических сигналов в толще воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абберантные отолиты байкальского хариуса / П. Н. Аношко [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007 – Т. 2, № 54. – С. 10-13.
2. Адаптивные ультраструктурные особенности обонятельных рецепторных клеток у глубоководных рыб озера Байкал / И. В. Клименков [и др.] // Сенсорные системы. – 2013. – Т. 27, № 4. – С. 350–363.
3. Баранов, В. С. Метод стряхивания-отпечатывания – простой и надёжный способ приготовления прямых хромосомных препаратов из биоптатов хориона / В. С. Баранов // Цитология. – 1989. – Т. 31, № 2. – С. 251–253.
4. Бахтин, Е. К. Электронномикроскопическое исследование дифференцировки рецепторных клеток обонятельной выстилки осетровых рыб / Е. К. Бахтин, Е. Е. Филюшина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 1974. – Т. 16, № 8. – С. 936–940.
5. Бигдай, Е. В. Опорно-двигательный аппарат обонятельных клеток / Е. В. Бигдай [и др.] // Цитология. – 2012. – Т. 54, Вып. 9. – С. 666–667.
6. Бронштейн, А. А. Обонятельные рецепторы позвоночных / А. А. Бронштейн. – Ленинград: Наука, 1977. – 160 с.
7. Бянкин, А. Г. Действие солей тяжелых металлов на обонятельный эпителий красноперки болынечешуйной (*Tribolodon hakonensis*) / А. Г. Бянкин // Сборник научных трудов Дальрыбвтуза. – Владивосток, 2001. – Вып. 14. – С. 148-152.
8. Валеев, Р. Б. Изучение половых феромонов самки желтокрылого бычка. Ч. 2 / Р. Б. Валеев, Н. И. Валеева, В. А. Остроумов // Тезисы докладов пятой конференции молодых ученых. – Иркутск, 1987. – С. 106.
9. Валеева, Н. И. Изучение феромонально-активной фракции смыва с икры самки бычка-желтокрылки / Н. И. Валеева, Т. М. Дмитриева //

- Актуальные проблемы биологии: тезисы докладов конференции, посвященной 75-летию ИГУ. – Иркутск: б. и., 1994. – С. 39.
10. Валеева, Н. И. Химические сигналы самок бычков-подкаменщиков в репродуктивный период / Н. И. Валеева // Проблемы экологии: материалы международной конференции. Т. 1. – Новосибирск: Наука, 1995. – С. 143-144.
 11. Викторов И.В. Спонтанная нейральная дифференциация стволовых клеток в культуре обонятельного эпителия человека / И.В. Викторов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. № 4. С. 183–1888.
 12. Возможности использования гипоксического прекондиционирования для профилактики постстрессовых депрессивных эпизодов / Е. А. Рыбникова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2007. – Т. 107, № 7. – С. 43–48.
 13. Вотинцев, К. К. Круговорот органического вещества в озере Байкал / К. К. Вотинцев, А. И. Мещерякова, Г. И. Поповская. – Новосибирск: Наука, 1975. – 190 с.
 14. Грачев, М. М. О современном состоянии экологической системы озера Байкал / М. М. Грачев. – Новосибирск: СО РАН, 2002. – 156 с.
 15. Гурова, Л. А. Питание и пищевые взаимоотношения пелагических рыб и нерпы Байкала / Л. А. Гурова, В. Д. Пастухов. – Новосибирск: Наука, 1974. – 185 с.
 16. Девицина, Г. В. Взаимодействие хемосенсорных систем и пищевое поведение рыб / Г. В. Девицина, Е. А. Марусов // Успехи современной биологии. – 2007. – Т. 127, № 4. – С. 327–395.
 17. Девицина, Г. В. Цитоархитектоника и морфометрия обонятельного анализатора рыб макро- и микросматиков / Г. В. Девицина, А. Б. эль-Саиед эль-Аттар // Вопросы ихтиологии. – 1988. – Т. 28, Вып. 5. – С. 837-845.

18. Дегенеративные изменения и нейрогенез в обонятельном эпителии рыб после длительной хемотимуляции / И. В. Клименков [и др.] // Известия ИГУ. Серия "Биология. Экология". – 2011. – Т. 4, № 3. – С. 119-125.
19. Динамика пространственного распределения и размерная структура голомянок (Comperhogidae) в прибрежной пелагиали Южного Байкала в зимний период / А. М. Мамонтов [и др.] // Труды кафедры зоологии позвоночных. Т. 2 / под ред. А. Н. Матвеева, В. П. Самусенка. – Иркутск: Иркутский университет, 2004. – С. 52-65.
20. Дмитриева, Т. М. Половые феромоны и репродуктивное поведение рыб / Т. М. Дмитриева, В. А. Остроумов. – Иркутск: Издательство университета, 1992. – 95 с.
21. Догель, А. С. Строение обонятельного органа у ганоид, костистых рыб и амфибий / А. С. Догель // Труды общества естествоиспытателей при Казанском университете. – 1886. – Т. 16, Вып. 1. – С. 3 – 82.
22. Домышева, В. М. Гидрохимия / В. М. Домышева // Байкал: природа и люди. Энциклопедический справочник. Ч. 2 / под ред. А. К. Тулохонова. – Улан-Удэ: БНЦ СО РАН, 2009. – С. 71–72.
23. Дорошенко, М. А. Гистофизиологическая характеристика обонятельного анализатора дальневосточных лососей / М. А. Дорошенко // Сенсорная физиология рыб. Апатиты. – КФ АН СССР, 1984. – С. 51-53.
24. Дорошенко, М. А. Сравнительно-морфологическое исследование обонятельного эпителия трех видов тихоокеанских лососей (*Oncorhynchus, salmonidae, salmoniformes*) / М. А. Дорошенко, Г. В. Девицина // Сенсорные системы. – 2009. – Т. 23, № 2. – С. 126-136.
25. Дорошенко, М. А. Структура поверхности органа обоняния морских костистых рыб / М. А. Дорошенко, П. А. Мотавкин // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1986. – № 10. – С. 38-47.
26. Зубин, А. А. Питание байкальских бенопелагических

- подкаменщиковых рыб (Scorpaeniformes, Cottoidei) / А. А. Зубин // Вопросы ихтиологии. – 1992. – Т. 32. Вып. 1. – С. 147–151.
27. Карлик, Я. С. Рыболовственная гидроакустика : учебно-методическое пособие / Я. С. Карлик, Ю. В. Марапулец. – Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2004. – 260 с.
28. Карнаухов, В. Н. О роли каротиноидов во внутриклеточном депонировании кислорода / В. Н. Карнаухов // ДАН СССР. – 1971. – Т. 196, № 5. – С. 1221–1224.
29. Касумян, А. О. Воздействие химических загрязнителей на пищевое поведение и чувствительность рыб к пищевым стимулам / А. О. Касумян // Вопросы ихтиологии. – 2001. – Т. 36, № 3. – С. 82–95.
30. Касумян, А. О. Обонятельная система рыб / А. О. Касумян. – Москва: МГУ, 2002. – 87 с.
31. Касумян, А. О. Хеморецепция у хронически аносмированных рыб: феномен компенсаторного развития вкусовой системы / А. О. Касумян, Е. А. Марусов // Вопросы ихтиологии. – 2007. – Т. 47, № 5. – С. 684–693.
32. Кацель, П. Л. Исследование химических сигналов, используемых желтокрылым бычком для синхронизации нереста / П. Л. Кацель, Р. Б. Валеев // Тезисы докладов четвертой конференции молодых ученых. – Иркутск, 1986. – С. 61.
33. Кацель, П. Л. О химической природе компонентов полового феромона самца бычка-желтокрылки. Ч. 2 / П. Л. Кацель, Р. Б. Валеев, В. А. Остроумов; Московский государственный университет. – Москва, 1987. – С. 46–50. – Деп. ВИНТИ 27.09.87, № 6654–В87.
34. Клименков, И. В. Морфологические перестройки обонятельных рецепторных нейронов у рыб после их периодической стимуляции сахарозой / И. В. Клименков, Н. С. Косицын // Известия ИГУ. Серия «Биология. Экология», 2008. – Т. 1, № 2. – С. 33–36.

35. Клименков, И. В. Обонятельные рецепторы животных – естественные индикаторы степени загрязненности окружающей среды / И. В. Клименков // Россия-Германия: история, культура, наука: сборник докладов международного симпозиума. – Иркутск: б. и., 1999. – С. 46-49.
36. Клименков, И. В. Обонятельный эпителий как источник аутологических стволовых, прогениторных и других малодифференцированных нейральных клеток / И. В. Клименков, Н. П. Судаков, М. В. Пастухов // Известия ИГУ. Серия "Биология. Экология". – 2014. – № 8. – С. 80-84.
37. Клименков, И. В. Общие признаки стимулзависимой дифференцировки обонятельных рецепторных нейронов и В-лимфоцитов иммунной системы / И. В. Клименков, Н. С. Косицын, М. М. Свинов // ДАН. – 2011. – Т. 436, № 2. – С. 273–275.
38. Клименков, И. В. Ультраструктурные и функциональные перестройки обонятельного эпителия черного хариуса при изменении химизма водной среды / И. В. Клименков, О. А. Ковалева // Вклад молодых биологов Сибири в решение вопросов продовольственной программы и охраны окружающей среды. – Улан-Удэ: б. и., 1984. – С. 59-60.
39. Клименков, И. В. Электронно-микроскопическая характеристика влияния токсических агентов на ультраструктурную организацию обонятельного эпителия рыб / И. В. Клименков // Тезисы второй конференции молодых ученых. – Иркутск: б. и., 1984. – С. 16.
40. Коряков, Е. А. Пелагические бычковые Байкала / Е. А. Коряков. – Москва: Наука, 1972. – 155 с.
41. Косицын, И. С. Трансформация элементов цитоскелета рецепторных клеток обонятельного анализатора у рыб на разных этапах жизненного цикла / И. С. Косицын, И. В. Клименков // ДАН. – 1994. – Т. 336, № 2. – С. 261–263.
42. Косицын, И. С. Ультраструктурные перестройки рецепторных клеток

- обонятельного анализатора рыб в разные фазы репродуктивного поведения / И. С. Косицын, И. В. Клименков, Т. М. Дмитриева // ДАН. – 1990. – Т. 311, № 3. – С. 739–742.
43. Косицын, Н. С. Микроструктура дендритов и аксодендритических связей в центральной нервной системе / Н. С. Косицын. – Москва: Наука, 1976. – 197 с.
44. Косицын, Н. С. Общность структурно-функциональных перестроек обонятельных рецепторных клеток и В-лимфоцитов иммунной системы / Н. С. Косицын, И. В. Клименков, А. В. Курылев // Морфология. – 1993. – Т. 105, № 7-8. – С. 35.
45. Косицын, Н. С. Ультраструктурные корреляты разных уровней чувствительности обонятельных хеморецепторных клеток / Н. С. Косицын, И. В. Клименков, А. В. Курылев // Морфология. – 1996. – Т. 110, № 4. – С. 60-63.
46. Кошелев, Б. В. Экология размножение рыб / Б. В. Кошелев. – Москва: Наука, 1984. – 307 с.
47. Кузнецов, Ю. А. Обоснование и разработка методов и средств промысловой биоакустики : монография / Ю. А. Кузнецов, М. Ю. Кузнецов. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2007. – 339 с.
48. Куликов, В. А. Алгоритм оценки параметров пересекающихся объектов на бинарном изображении / В. А. Куликов, Ю. П. Сапожникова // Тезисы Всероссийской конференции математическое моделирование и вычислительно-информационные технологии в междисциплинарных научных исследованиях. – Иркутск, 2011. – С. 80-82.
49. Куликов, В. А. Патент 70105 Российская Федерация. Устройство для трассировки перемещения лабораторных животных / В. А. Куликов, А. В. Куликов. – 2008. – Бюл. № 2. – 965 с.
50. Лычаков, Д. В. Исследование отолитов рыб в связи с вестибулярной и слуховой функциями / Д. В. Лычаков // Сенсорные системы. – 1994. – Т. 8, № 3-4. – С. 7-15.

51. Лычаков, Д. В. Отолитовая мембрана. Структурно-функциональная организация, эволюция, экоморфологическая пластичность и устойчивость к экстремальным воздействиям: автореферат диссертации... доктора / Д. В. Лычаков. – Санкт-Петербург, 2002.
52. Марков, А. В. Гипотеза «иммунологического тестирования» партнеров – согласованность адаптаций и смены половых предпочтений / А. В. Марков, А. М. Куликов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2006. – Т. 33, № 3. – С. 205-216.
53. Михлин, Ю. Л. РФЭС и АСМ изучение отолитов рыб озера Байкал / Ю. Л. Михлин, А. С. Романченко, Ю. П. Сапожникова // XX Всероссийская научная конференция «Рентгеновская спектроскопия и химическая связь РЭСХС-2010». – Новосибирск: Институт катализа СО РАН, 2010. – 122 с.
54. Молекулярные машины опорно-двигательных аппаратов респираторных ресничек и обонятельных жгутиков / Э. В. Бигдай [и др.] // Биофизика. – 2013. – Т. 58, Вып. 2. – С. 269-275.
55. Молекулярные машины опорно-двигательных аппаратов респираторных ресничек и обонятельных жгутиков / В. О. Самойлов [и др.] // Биофизика. – 2013. – Т. 58, Вып. 2. – С. 269-275.
56. Морфо-функциональные особенности эритроцитов природных и искусственно выращенных сиговых рыб озера Байкал / В. М. Яхненко [и др.] // Сибирский экологический журнал. – 2016. – Т. 2. – С. 256-266.
57. Москалева, Т. М. Ультроструктурная и функциональная диагностика влияния антропогенного фактора на хеморецепцию рыб / Т. М. Москалева, И. В. Клименков // Тест-системы для оценки мутагенного потенциала загрязнителей окружающей среды: тезисы всесоюзной конференции. – Иркутск: б. и., 1984. – С. 21.
58. Нейроэндокринология / [Редкол.: А. Л. Поленов (отв. ред.) и др.]. Санкт-Петербург: [б. и.], 1993. – 229 с.
59. Никольский, А. М. О соотношении формы тела рыб с быстротой

- течения воды населяемого ими бассейна / А. М. Никольский // Вестник естествознания. – 1891. – № 4. – С. 137–139.
60. Никольский, Г. В. Экология рыб / Г. В. Никольский. – Москва: Высшая школа, 1963. – 368 с.
61. Определение кальция и натрия в отолитах байкальского омуля методом рентгеноспектрального электронно-зондового микроанализа / Л. А. Павлова [и др.] // Аналитика и контроль. – 2003. – Т. 7, № 3. – С. 242–247.
62. Остроумов, В. А. Роль химических сигналов в регуляции созревания и репродуктивного поведения рыб / В. А. Остроумов // Вопросы ихтиологии. – 1997. – Т. 37, № 1. – С. 112–119.
63. Павлов, Д. С. Роль органов чувств в пищевом поведении рыб / Д. С. Павлов, А. О. Касумян // Труды Всесоюзного совещания по вопросам поведения рыб / под ред. Д. С. Павлова, А. Г. Гусара. – Москва: ИЭМЭЖ АН СССР, 1991. – С. 182–195.
64. Пащенко, Н. И. Дегенеративные и восстановительные процессы в обонятельной выстилке белого амура *Stenopharyngodon idella* (Val.) (Cyprinidae) после действия на нее детергента тритон-Х-100 / Н. И. Пащенко, А. О. Касумян // Вопросы ихтиологии. – 1984. – Т. 24, № 1. – С. 128–137.
65. Пащенко, Н. И. Исследование формирования органа обоняния в онтогенезе белого амура *Stenopharyngodon idella* с помощью сканирующей электронной микроскопии / Н. И. Пащенко, А. О. Касумян // Вопросы ихтиологии. – 2015. – Т. 55, № 6. – С. 692–712.
66. Прекондиционирование модифицирует активность митоген-активируемых протеинкиназ и транскрипционного фактора c-Jun в гиппокампе крыс вслед за тяжелой гипобарической гипоксией / М. О. Самойлов [и др.] // Нейрохимия. – 2007. – Т. 24, № 1. – С. 52–59.
67. Пяткина, Г. А. Цитохимическое выявление аденилатциклазы в обонятельной выстилке хариуса *Thymallus Arctius baicalensis*: Влияние

- промышленных стоков / Г. А. Пяткина, Т. М. Дмитриева // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1990. – Т. 26. – С. 242–245.
68. Сапожникова, Ю. П. Особенности макро- и ультраструктур сенсорного слухового аппарата *Cottoidei* озера Байкал / Ю. П. Сапожникова, И. В. Клименков, И. В. Ханаев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2003. – № 7. – С. 138-140.
69. Сапожникова, Ю. П. Особенности морфологической поляризации сенсорных элементов слухового саккулярного эпителия у байкальских рогатковидных рыб (*Cottoidei*) / Ю. П. Сапожникова, И. В. Клименков, Н. Г. Мельник // Сенсорные системы. – 2007. – Т. 21, № 2. – С. 140-146.
70. Сапожникова, Ю. П. Особенности формирования отолитов у некоторых рогатковидных рыб разных экологических групп озера Байкал / Ю. П. Сапожникова, И. В. Клименков, И. В. Ханаев // Сенсорные системы. – 2010. – Т. 24, № 1. – С. 73–86.
71. Сапожникова, Ю. П. Рост отолита байкальских рогатковидных рыб (*Cottoidei*) в связи с развитием сенсорного слухового эпителия / Ю. П. Сапожникова, И. В. Клименков, Н. Г. Мельник // Молодежь и наука Забайкалья : материалы научной конференции. – Чита: Изд-во ЗабГГПУ, 2008. – С. 97-99.
72. Сиделева, В. Г. Сейсмочувствительная система и экология байкальских подкаменщиковых рыб / В. Г. Сиделева. – Новосибирск: Наука, 1982. – 146 с.
73. Сиделёва, В. Г. Сравнительное изучение эндемичных коттоидных рыб (*Cottidae*, *Comphoridae*) в связи с приспособлением к обитанию в пелагиали озера Байкал / В. Г. Сиделева, Т. А. Козлова // Труды Зоологического института РАН. – 2010. – Т. 314, Вып. 4. – С. 74–88.
74. Скрыбин, А. Г. Биология байкальских сигов / А. Г. Скрыбин. – Москва: Наука, 1969. – 110 с.
75. Смирнов, В. В. Микроэволюция байкальского омуля: *coregonus autumnalis migratorius* (Georgi) / В. В. Смирнов, Н. С. Смирнова-Залуми,

- Л. В. Суханова. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. – 246 с.
76. Современное состояние исследований микроструктуры отолитов рыб / Е. Н. Кузнецова [и др.]. – Москва: ВНИРО, 2004. – 124 с.
77. Талиев, Д. Н. Бычки-подкаменщики Байкала (Cottoidei) / Д. Н. Талиев. – Москва: Изд-во АН СССР, 1955. – 602 с.
78. Тарасова, Е. Н. Органическое вещество вод Южного Байкала / Е. Н. Тарасова. – Новосибирск: Наука, 1975. – 148 с.
79. Угрюмов, М. В. Нейроэндокринная регуляция в онтогенезе / М. В. Угрюмов. – Москва: Наука, 1989. — 248 с.
80. Урик, Р. Д. Основы гидроакустики / Р. Д. Урик. – Ленинград: Судостроение, 1978. – 445 с.
81. Функциональные особенности цитоскелета в дендритах обонятельных рецепторных клеток у прибрежных и глубоководных рыб озера Байкал / И. В. Клименков [и др.] // Научные труды III Съезда физиологов СНГ / под ред. А. И. Григорьева [и др.]. – Москва: Медицина-Здоровье, 2011. – С. 123.
82. Хемосенсорная регуляция пищевого поведения у рыб / А. О. Касумян [и др.] // Актуальные проблемы современной ихтиологии (к 100-летию Г. В. Никольского). – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2010. – С. 305-353.
83. Черняев, Ж. А. Размножение и развитие большеголовой широколобки *Batrachocottus baicalensis* озера Байкал / Ж. А. Черняев // Вопросы ихтиологии. – 1979. – Т. 19, № 6. – С. 1053-1067.
84. Яхненко, В. М. Особенности состава и структуры клеток крови рыб пелагиали и побережья озера Байкал / В. М. Яхненко, И. В. Клименков // Известия РАН. Серия биологическая, 2009. – Т. 1. – С. 46-54.
85. 2-Methoxy-5((3,4,5-Trimethoxyphenyl)seleninyl) phenol inhibits MDM2 and induces apoptosis in breast cancer cells through a P53-independent pathway / J. Xu [et al.] // Cancer Letters. – 2016. – Vol. 383, № 1. – P. 9-17.
86. 3-Phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory

- receptor neurons / M. Spehr [et al.] // *Neuron*. – 2002. – Vol. 33, № 5. – P. 731-739.
87. A complex of ZO-1 and the BAR-domain protein TOCA-1 regulates actin assembly at the tight junction / C. M. Van Itallie [et al.] // *Molecular Biology of the Cell*. – 2015. – Vol. 26, № 15. – P. 2769-2787.
88. A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells / M. Beurg [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26, № 43. – P. 10992-11000.
89. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna / L. B. Vosshall [et al.] // *Cell*. – 1999. – Vol. 96, № 5. – P. 725-736.
90. Accumulation of Ym1/2 protein in the mouse olfactory epithelium during regeneration and aging / N. Giannetti [et al.] // *Neuroscience*. – 2004. – Vol. 123, № 4. – P. 907-917.
91. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility / L. Blanchain [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2014. – Vol. 94, № 1. – P. 235-263.
92. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment / G. T. Ankley [et al.] // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2010. – Vol. 29, № 3. – P. 730-741.
93. Age-related Changes in Cell Dynamics of the Postnatal Mouse Olfactory Neuroepithelium: Cell Proliferation, Neuronal Differentiation, and Cell Death / K. Kondo [et al.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 2010. – Vol. 518, № 11. – P. 1962-1975.
94. Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage / K. Suzukawa [et al.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 2011. – Vol. 519, № 11. – P. 2154-2174.
95. Ahuja, G. Zebrafish olfactory receptor ORA1 recognizes a putative reproductive pheromone / G. Ahuja, S. Korsching // *Communicative & Integrative Biology*. – 2014. – Vol. 7, № 5. – e970501.

96. Alarm reaction in the crucian carp is mediated by the medial bundle of the medial olfactory tract / E. H. Hamdani [et al.] // *Chemical Senses*. – 2000. – Vol. 25, № 1. – P. 103-109.
97. Alekseyenko, O. V. Sex and gonadal steroid modulation of pheromone receptor gene expression in the mouse vomeronasal organ / O. V. Alekseyenko, M. J. Baum, J. A. Cherry // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 140, № 4. – P. 1349-1357.
98. Alioto, T. S. The repertoire of olfactory C family G protein-coupled receptors in zebrafish: candidate chemosensory receptors for amino acids / T. S. Alioto, J. Ngai // *Bmc Genomics*. – 2006. – Vol. 7.
99. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene-expression / A. Chess [et al.] // *Cell*. – 1994. – Vol. 78, № 5. – P. 823-834.
100. An effect of hypoxia, normoxia and hyperoxia on the development of olfactory organ in the two age class of *Amia calva* Linnaeus, 1766 / M. Kuciel [et al.] // *Third International Congress of Respiratory Science conference, (6-10 July 2014) / At Bad Honnef. – Bonn, 2014. – P. 56-58.*
101. An electron microscopic study of human olfactory mucosa / B. M. Polyzonis [et al.] // *Journal of anatomy*. – 1979. – Vol. 128. – P. 77-83.
102. An electroolfactogram study of odor response patterns from the mouse olfactory epithelium with reference to receptor zones and odor sorptiveness / D. M. Coppola [et al.] // *Journal of Neurophysiology*. – 2013. – Vol. 109, № 8. – P. 2179-2191.
103. An epigenetic signature for monoallelic olfactory receptor expression / A. Magklara [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 145, № 4. – P. 555-570.
104. An epigenetic trap stabilizes singular olfactory receptor expression / D. B. Lyons [et al.] // *Cell*. – 2013. – Vol. 154, № 2. – P. 325-336.
105. An Expression Refinement Process Ensures Singular Odorant Receptor Gene Choice / I. Abdus-Saboor [et al.] // *Current Biology*. – 2016. – Vol. 26, № 8. – P. 1083-1090.
106. Analysis of soluble HLA class II antigenic material in patients with

- immunological diseases using monoclonal antibodies / F. K. Stevenson [et al.] // *Journal of Immunological Methods*. – 1986. – Vol. 86, № 2. – P. 187-190.
107. Anderson, J. M. Physiology and Function of the Tight Junction / J. M. Anderson, C. M. Van Itallie // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2009. – Vol. 1, № 2. – a002584.
108. Antunes, G. Mechanisms of regulation of olfactory transduction and adaptation in the olfactory cilium / G. Antunes, A. M. Sebastiao, F. M. S. de Souza // *Plos One*. – 2014. – Vol. 9, № 8.
109. Antunes, R. A. Hormonal anticipation of territorial challenges in cichlid fish / R. A. Antunes, R. F. Oliveria // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, № 37. – P. 15985-15989.
110. Apoptosis induced by prolonged exposure to odorants in cultured cells from rat olfactory epithelium / S. Brauchi [et al.] // *Brain Research*. – 2006. – Vol. 1103. – P. 114-122.
111. Arzi, A. Olfactory perception as a compass for olfactory neural maps / A. Arzi, N. Sobel // *Trends in Cognitive Sciences*. – 2011. – Vol. 15, № 11. – P. 537-545.
112. Ascl1 (Mash1) Knockout Perturbs Differentiation of Nonneuronal Cells in Olfactory Epithelium / R. C. Krolewski [et al.] // *Plos One*. – 2012. – Vol. 7, № 12. – e51737.
113. Auditory sensitivity of larval zebrafish (*Danio rerio*) measured using a behavioral prepulse inhibition assay / A. A. Bhandiwad [et al.] // *Journal of Experimental Biology*. – 2013. – Vol. 216, № 18. – P. 3504-3513.
114. Bailey, B. J. Olfactory neuroblastoma – management and prognosis / B. J. Bailey, S. Barton // *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*. – 1975. – Vol. 101, № 1. – P. 1-5.
115. Balu, D. T. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology / D. T. Balu, I. Lucki //

- Neuroscience and Biobehavioral Reviews. – 2009. – Vol. 33, № 3. – P. 232-252.
116. Bannister, L. H. The fine structure of the olfactory surface of teleostean fishes / L. H. Bannister // *Journal of Cell Science*. – 1965. – Vol. 106. – P. 333–342.
117. Baughman, J. M. Buffering mitochondrial DNA variation / J. M. Baughman, V. K. Mootha // *Nature Genetics*. – 2006. – Vol. 38, № 11. – P. 1232-1233.
118. Bayramli, X. Patterned Arrangements of Olfactory Receptor Gene Expression in Zebrafish are Established by Radial Movement of Specified Olfactory Sensory Neurons / X. Bayramli [et al.] // *Sci Rep* – 2017 – Vol 17, № 7(1) – P. 5572.
119. Bazaes, A. Odorant tuning of olfactory crypt cells from juvenile and adult rainbow trout / A. Bazaes, O. Schmachtenberg // *Journal of Experimental Biology*. – 2012. – Vol. 215, № 10. – P. 1740-1748.
120. Beauchamp, G. K. Chemical signalling in mice / G. K. Beauchamp, K. Yamazaki // *Biochemical Society Transactions*. – 2003. – Vol. 31. – P. 147-151.
121. Becker, C. G. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration / C. G. Becker, T. Becker // *Restorative Neurology and Neuroscience*. – 2008. – Vol. 26, № 2-3. – P. 71-80.
122. Behavioural and electrophysiological responses by reproductive female *Neogobius melanostomus* to odorodors released by conspecific males / A. J. Belanger [et al.] // *Journal of Fish Biology*. – 2004. – Vol. 65. – P. 933– 946.
123. Bett, N. N. Olfactory navigation during spawning migrations: a review and introduction of the Hierarchical Navigation Hypothesis / N. N. Bett, S. G. Hinch // *Biological Reviews*. – 2016. – Vol. 91, № 3. – P. 728-759.
124. Bettini, S. Cell proliferation and growth-associated protein 43 expression in the olfactory epithelium in *Poecilia reticulata* after copper

- solution exposure / S. Bettini, F. Ciani, V. Franceschini // *European Journal of Histochemistry*. – 2006. – Vol. 50, № 2. – P. 141-146.
125. Bettini, S. Quantitative analysis of crypt cell population during postnatal development of the olfactory organ of the guppy, *Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae), from birth to sexual maturity / S. Bettini, M. Lazzari, V. Franceschini // *Journal of Experimental Biology*. – 2012. – Vol. 215, № 15. – P. 2711-2715.
126. Bettini, S. Cell proliferation and growth-associated protein 43 expression in the olfactory epithelium in *Poecilia reticulata* after copper solution exposure / S. Bettini, F. Ciani, V. Franceschini // *European journal of histochemistry*. – 2006. – Vol. 50, № 2. – P. 141-146.
127. Bhandiwad, A. A. Revisiting Psychoacoustic methods for the Assessment of Fish Hearing / A. A. Bhandiwad, J. A. Sisneros // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2016. – Vol. 877. – P. 157-184.
128. Bhola, P. D. Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences / P. D. Bhola, A. Letai // *Molecular Cell*. – 2016. – Vol. 61, № 5. – P. 695-704.
129. Blood cell structure in Baikal omul (*Coregonus migratorius* Georgi) and changes under phenol exposure / V. Yakhnenko [et al.] // *Advances in Limnology*. – 2013. – Vol. 64. – P. 25-37.
130. Brain levels of arginine-vasotocin and isotocin in dominant and subordinate males of a cichlid fish / O. Almeida [et al.] // *Hormones and Behavior*. – 2012. – Vol. 61, № 2. – P. 212-217.
131. Brann, J. H. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system / J. H. Brann, S. J. Firestein // *Frontiers in Neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – 182.
132. Braubach, O. R. Distribution and functional organization of glomeruli in the olfactory bulbs of zebrafish (*Danio rerio*) / O. R. Braubach, A. Fine, R. P. Croll // *Journal of Comparative Neurology*. – 2012. – Vol. 520, № 11. – P. 2317-2339.
133. Braun, R. J. Mitochondrion-mediated cell death: dissecting yeast

- apoptosis for a better understanding of neurode-generation / R. J. Braun // *Frontiers in Oncology*. – 2012. – Vol. 2. – 182.
134. Bredesen, D. E. Neural apoptosis / D. E. Bredesen // *Annals of Neurology*. – 1995. – Vol. 38, № 6. – P. 839-851.
135. Buck, L. A novel multigene family may encode odorant receptors – A molecular-basis for odor recognition / L. Buck, R. Axel // *Cell*. – 1991. – Vol. 65, № 1. – P. 175-187.
136. Buck, L. B. Information coding in the vertebrate olfactory system / L. B. Buck // *Annual Review of Neuroscience*. – 1996. – Vol. 19. – P. 517-544.
137. Budinger, E. Anatomical connections suitable for the direct processing of neuronal information of different modalities via the rodent primary auditory cortex / E. Budinger, H. Scheich // *Hearing Research*. – 2009. – Vol. 258, № 1-2. – P. 16-27.
138. Buran, B. N. Structural variation in the inner ears of four deep-sea elopomorph fishes / B. N. Buran, X. H. Deng, A. N. Popper // *Journal of Morphology*. – 2005. – Vol. 265, № 2. – P. 215-225.
139. Burbank, K. S. Microtubule dynamic instability / K. S. Burbank, T. J. Mitchison // *Current Biology*. – 2006. – Vol. 16, № 14. – P. R516-R517.
140. Burnet, F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection / F. M. Burnet // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 1976. – Vol. 26, № 2. – P. 119-121.
141. Burton, P. R. Ultrastructural studies of microtubules and microtubule organizing centers of the vertebrate olfactory neuron / P. R. Burton // *Microscopy Research and Technique*. – 1992. – Vol. 23, № 2. – P. 142-156.
142. Calcium and ROS: A mutual interplay / A. Görlach [et al.] // *Redox Biology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 260-271.
143. Calof, A. L. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium - proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor invitro / A. L. Calof, D. Chikaraishi // *Neuron*. – 1989. – Vol. 3, № 1. – P. 115-127.

144. Cancalon, P. Regeneration of three populations of olfactory axons as a function of temperature / P. Cancalon // *Brain Research*. – 1983. Vol. 285, № 3. – P. 265-278.
145. Candolin, U. The use of multiple cues in mate choice / U. Candolin // *Biological Reviews*. – 2003. – Vol. 78, № 4. – P. 575-595.
146. Carr, V. M. The dynamics of cell death in the olfactory epithelium / V. M. Carr, A. I. Farbman // *Experimental Neurology*. – 1993. – Vol. 124, № 2. – P. 308-314.
147. Carr, V. M., Odorants as cell-type specific activators of a heat shock response in the rat olfactory mucosa / Menco B. P., Yankova M. P., Morimoto R.I., Farbman A.I. // *Journal Comp Neurol* – 2001. – Vol. 432. – P. 425-439.
148. Carraro, M. Calcium and reactive oxygen species in regulation of the mitochondrial permeability transition and of programmed cell death in yeast / M. Carraro, P. Bernardi // *Cell Calcium*. – 2016. – Vol. 60, № 2. – P. 102-107.
149. Casillas, E. The response of fish blood cells, particularly thrombocytes, to decompression / E. Casillas, L. S. Smith. B. G. D'Aoust // *Undersea Biomedical research*. – 1976. – Vol. 3, № 3. – P. 273–281.
150. Castro, A. Distribution of calretinin during development of the olfactory system in the brown trout, *Salmo trutta fario*: Comparison with other immunohistochemical markers. / A. Castro [et al.] // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2008. – Vol. 35, P. 306-316.
151. Cau, E. Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage / E. Cau, S. Casarosa, F. Guillemot // *Development*. – 2002. – Vol. 129, № 8. – P. 1871-1880.
152. Cell proliferation and apoptosis in the olfactory epithelium of the shark *Scyliorhinus canicula* / S. Ferrando [et al.] // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2010. – Vol. 40, № 4. – P. 293-300.
153. Cervi, A. L. Behavioral Measure of Frequency Detection and

- Discrimination in the Zebrafish, *Danio rerio* / A. L. Cervi, K. R. Poling, D. M. Higgs // *Zebrafish*. – 2012. – Vol. 9, № 1. – P. 1-7.
154. Chemical spying in coral reef fish larvae at recruitment / N. Roux [et al.] // *Comptes Rendus Biologies*. – 2015. – Vol. 338, № 10. – P. 701-707.
155. Chemosensory communication. A new aspect of the major histocompatibility complex and other genes in the mouse / E. A. Boyse [et al.] // *Oncodevelopmental Biology and Medicine*. – 1982. – Vol. 4, № 1-2. – P. 101-116.
156. Chen, H. Y. Conditional ablation of mature olfactory sensory neurons mediated by diphtheria toxin receptor / H. Y. Chen, K. Kohno, Q. Z. Gong // *Journal of Neurocytology*. – 2005. – Vol. 34, № 1-2. – P. 37-47.
157. Chen, Z. Membrane-proteins unique to vertebrate olfactory cilia - candidates for sensory receptor molecules / Z. Chen, D. Lancet // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. – 1984. – Vol. 81, № 6. – P. 1859-1863.
158. Clack, J. A. Gaining ground: the origin and evolution of tetrapods / J. A. Clack. – Bloomington: Indiana University Press, 2012. – P. 55-94.
159. Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes / A. Malki [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2015. – Vol. 97, № 3. – P. 533-545.
160. Comparison of the nasal olfactory organs of various species of lizardfishes (teleostei: aulopiformes: ynodontidae) additional remarks on the brain / L. Fishelson [et al.] // *International Journal of Zoology*. – 2010. – Vol. 2010. – 807913.
161. Conde, C. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites / C. Conde, A. Caceres // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2009. – Vol. 10, № 5. – P. 319-332.
162. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis / M. M. Kessels [et al.] // *European Journal of Cell Biology*. – 2011. – Vol. 90, № 11. – P. 926-933.

163. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish / A. Hansen [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – Vol. 23, № 28. – P. 9328-9339.
164. Correlation between the length of outer hair-cells and the frequency coding of the cochlea. *Auditory Physiology and Perception* / R. Pujol [et al.] ; edited by: Y. Cazals [et al.]. – New York: Permagon Press, 1992. – 684 p.
165. Corwin, J. T. Auditory hair cells: structure, function, development, and regeneration / J. T. Corwin, M. E. Warchol // *Annual Review of Neuroscience*. – 1991. – Vol. 14. – P. 301-333.
166. Cosker, K. E. Neuronal Signaling through Endocytosis / K. E. Cosker, R. A. Segal // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2014. – Vol. 6, № 2. – a020669.
167. Cowan, C. M. Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium / C. M. Cowan, A. J. Roskams // *Microscopy Research and Technique*. – 2002. – Vol. 58, № 3. – P. 204-215.
168. Cross-modal integration between odors and abstract symbols / H. S. Seo [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2010. – Vol. 478, № 3. – P. 175-178.
169. Cytochemical features of olfactory receptor cells in benthic and pelagic sculpins (Cottoidei) from Lake Baikal / I. V. Klimenkov [et al.] // *Archives of Biological Sciences*. – 2016. – Vol. 68, № 2. – P. 345-353.
170. Dahl, A. R. The effect of cytochrome P-450-dependent metabolism and other enzyme activities on olfaction / A. R. Dahl // *Molecular Neurobiology of the Olfactory System* / ed. F. L. Margolis, T. V. Gerchell. – New York: Springer, 1988. – P. 51-70.
171. Dale, T. The labyrinthine mechanoreceptor organs of the cod gadus morhua L / T. Dale // *Norwegian Journal of Zoology*. – 1976. – Vol. 24. – P. 85-128.
172. Dalton, R. P. Co-Opting the unfolded protein response to elicit olfactory receptor feedback / R. P. Dalton, D. B. Lyons, S. Lomvardas // *Cell*. – 2013. – Vol. 155, № 2. – P. 321-332.

173. De Lorenzo, A. J. Electron microscopic observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve / A. J. De Lorenzo // *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. – 1957. – Vol. 3. – P. 839-850.
174. De Lorenzo, A. J. The olfactory neuron and the blood-brain barrier / A. J. De Lorenzo // *Taste and Smell in Vertebrates* / ed. G. Wolstenholme, J. Knight. – London: Gloucester place, 1970. – P. 151–176.
175. Dematte, M. L. Olfactory discrimination: when vision matters? / M. L. Dematte, D. Sanabria, C. Spence // *Chemical senses*. – 2009. – Vol. 34, № 2. – P. 103-109.
176. Demir, E. Fruitless splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila* / E. Demir, B. J. Dickson // *Cell*. – 2005. – Vol. 121, № 5. – P. 785-794.
177. Dendritic neurosecretion phenomenon of olfactory receptor cells / I. V. Klimenkov [et al.] // *World Neurosurgery*. – 2015. – Vol. 83, № 3ю – P. 278-284.
178. Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks / S. J. Son [et al.] // *Neuron*. – 2013. – Vol. 78, № 6. – P. 1036-1049.
179. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells / M. J. Shambloott [et al.] // *Proceedings of the national academy of sciences of the Unated States of America*. – 1998. – Vol. 95, № 23. – P. 13726–13731.
180. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants / R. Moreno-Loshuertos [et al.] // *Nature Genetics*. – 2006. – Vol. 38, № 11. – P. 1261-1268.
181. Differential expression pattern of antimicrobial peptides in nasal mucosa and secretion / M. Laudien [et al.] // *Rhinology*. – 2011. – Vol. 49, № 1. – P. 107-111.
182. Dixon, D. L. Reef fishes innately distinguish predators based on

- olfactory cues associated with recent prey items rather than individual species / D. L. Dixon, M. S. Pratchett, P. L. Munday // *Animal Behaviour*. – 2012. – Vol. 84, № 1. – P. 45-51.
183. Dmitrieva, T.M. Sensorial ecology / T.M. Dmitrieva, Yu.P. Kozlov – «London Book Fair 2017», 2010. – 404 p.
184. Doherty, P. C. On the nose: shared themes for the sensory and immune self / P. C. Doherty // *Nature Immunology*. – 2003. – Vol. 4, № 11. – P. 1043-1045.
185. Doldán, M.J., Cid, P., Mantilla L. & de Miguel Villegas, E. Development of the olfactory system in turbot (*Psetta maxima* L.). / M.J. Doldán, [et al.] // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2011. – Vol. 41, 148-157.
186. Doty, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease / R. L. Doty // *Nature Reviews Neurology*. – 2012. – Vol. 8, № 6. – P. 329-339.
187. Doty, R. L. Sex differences and reproductive hormone influences on human odor perception / R. L. Doty, E. L. Cameron // *Physiology & Behavior*. – 2009. – Vol. 97, № 2. – P. 213-228.
188. Doving, K. B. Selective degeneration of neurones in the olfactory bulb following prolonged odour exposure / K. B. Doving, A. J. Pinching // *Brain research*. – 1973. – Vol. 52. – P. 115–129.
189. Doving, K. B. The alarm reaction in fishes-odorants, modulations of responses, neural pathways / K. B. Doving, S. Lastein // *International symposium on olfaction and taste* / T. E. Finger. – 2009. – C. 413-423.
190. Drazen, J. C. Development of a hyperbaric trap-respirometer for the capture and maintenance of live deep-sea organisms / J. C. Drazen, L. E. Bird, J. P. Barry // *Limnology and Oceanography-Methods*. – 2005. – Vol. 3. – P. 488-498.
191. Duchen, M. R. Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology / M. R. Duchen // *Cell Calcium*. – 2000. – Vol. 28, № 5-6. – P. 339-348.

192. Early development of the olfactory organ in sturgeons of the genus *Acipenser*: a comparative and electron microscopic study / E. Zeiske [et al.] // *Anatomy and Embryology*. – 2003. – Vol. 206, № 5. – P. 357-372.
193. Effects of exposure to seismic airgun use on hearing of three fish species / A. N. Popper [et al.] // *Journal of the Acoustical Society of America*. – 2005. – Vol. 117, № 6. – P. 3958-3971.
194. Effects of Sex Pheromones and Sexual Maturation on Locomotor Activity in Female Sea Lamprey (*Petromyzon marinus*) / E. J. Walaszczyk [et al.] // *Journal of Biological Rhythms*. – 2013. – Vol. 28, № 3. – P. 218-226.
195. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J. A. Thomson [et al.] // *Science*. – 1998. – Vol. 282, № 5391. – P. 1145-1147.
196. Enhancer interaction networks as a means for singular olfactory receptor expression / E. Markenscoff-Papadimitriou [et al.] // *Cell*. – 2014. – Vol. 159, № 3. – P. 543-557.
197. Enrichment to Odors improves olfactory discrimination in adult rats / N. Mandairon [et al.] // *Behavioral Neuroscience*. – 2006. – Vol. 120, № 1. – P. 173-179.
198. Evolution of sensory hair cells / A. Coffin [et al.] // *Evolution of the vertebrate auditory system* / G. A. Manler [et al.]. – New York: Springer-Verlag, 2004. – 415 p.
199. Experimental evaluation of imprinting and the role innate preference plays in habitat selection in a coral reef fish / D. L. Dixson [et al.] // *Oecologia*. – 2014. – Vol. 174, № 1. – P. 99-107.
200. Exposure of fish to high-intensity sonar does not induce acute pathology / A. S. Kane [et al.] // *Journal of Fish Biology*. – 2010. – Vol. 76, № 7. – P. 1825-1840.
201. Exposure to pheromones increases plasma corticosterone concentrations in a terrestrial salamander / S. N. Schubert [et al.] // *General and Comparative Endocrinology*. – 2009. – Vol. 161, № 2. – P. 271-275.

202. Expression of the tight junction protein ZO-1 in the olfactory system - presence of ZO-1 on olfactory sensory neurons and glial-cells / F. Miragall [et al.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 1994. – Vol. 341, № 4. – P. 433-448.
203. Extracellular actin in health and disease / N. P. Sudakov [et al.] // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 82, № 1. – P. 518.
204. Farbman, A. I. *Cell Biology of olfaction* / A. I. Farbman. – Cambridge: Cambridge University Press, 1992. – 282 p.
205. Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism / T. B. Reusch [et al.] // *Nature*. – 2001. – Vol. 414, № 6861. – P. 300-302.
206. Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection / P. B. Aeschlimann [et al.] // *Behavioral Ecology and Sociobiology*. – 2003. – Vol. 54, № 2. – P. 119-126.
207. Fettiplace, R. The physiology of mechano-electrical transduction channels in hearing / R. Fettiplace, K. X. Kim // *Physiological Reviews*. – 2014. – Vol. 94, № 3. – P. 951-986.
208. Finding a new form of the frayling thymallus arcticus (Thymallidae) in the basin of Lake Baikal / I. B. Knizhin [et al.] // *Journal of Ichthyology*. – 2006. – Vol. 46, № 1. – P. 34–43.
209. 5HTR3A-driven GFP labels immature olfactory sensory neurons / T. E. Finger [et al.] // *Journal of comparative neurology*. – 2017. – Vol. 525, № 7. – P. 1743-1755.
210. Firestein, S. Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a g protein mediated camp 2nd-messenger system / S. Firestein, B. Darrow, G. M. Shepherd // *Neuron*. – 1991. – Vol. 6, № 5. – P. 825-835.
211. *Fish Chemosenses* / ed. B. G. Kapoor, K. Reuter. – USA: Science Publishers, 2005. – 343 p.

212. Fisher, H. S. Alteration of the chemical environment disrupts communication in a freshwater fish / H. S. Fisher, B. B. M. Wong, G. G. Rosenthal // *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. – 2006. – Vol. 273, № 1591. – P. 1187-1193.
213. Fishy Aroma of Social Status: Urinary Chemo-Signalling of Territoriality in Male Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) / D. Martinovic-Weigelt [et al.] // *Plos One*. – 2012. – Vol. 7, № 11. – e46579.
214. Fletcher, M. L. Visualizing olfactory learning functional imaging of experience-induced olfactory bulb changes / M. L. Fletcher, M. Bendahmane // *Odor Memory and Perception*. – 2014. – P. 89-113.
215. Form and function in the unique inner ear of a teleost: The silver perch (*Bairdiella chrysoura*) / J. U. Ramcharitar [et al.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 2004. – Vol. 475, № 4. – P. 531-539.
216. Functional properties of cortical feedback projections to the olfactory bulb / F. Markopoulos [et al.] // *Neuron*. – 2012. – Vol. 76, № 6. – P. 1175-1188.
217. Gauldie, R. W. Polymorphic crystalline-structure of fish otoliths / R. W. Gauldie // *Journal of Morphology*. – 1993. – Vol. 218, № 1. – P. 1-28.
218. Gavrieli, Y. Identification of programmed cell-death insitu via specific labeling of nuclear DNA fragmentation / Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Bensasson // *Journal of Cell Biology*. – 1992. – Vol. 119, № 3. – P. 493-501.
219. Differential Bulbar and Extrabulbar Projections of Diverse Olfactory Receptor Neuron Populations in the Adult Zebrafish (*Danio rerio*) / J. A. Gayoso [et al.] // *Journal of comparative neurology*. – 2011. – Vol. 519, № 2. – P. 247-276.
220. Gemcitabine in the treatment of refractory Hodgkins's disease: Results of a multicenter phase II study / A. Santoro [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2000. – Vol. 18, № 13. – P. 2615-2619.
221. Gender-typical olfactory regulation of sexual behavior in goldfish / Y. Kawaguchi [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – 91.

222. Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice / B. M. Shykind [et al.] // *Cell*. – 2004. – Vol. 117, № 6. – P. 801-815.
223. 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 / E. V. Ignatieva [et al.] // *Frontiers in psychology*. – 2014. – Vol. 5. – 247.
224. Germanà, A. Differential distribution of S100 protein and calretinin in mechanosensory and chemosensory cells of adult zebrafish (*Danio rerio*). / A. Germanà [et al.] // *Brain Res*. – 2007. Vol. – 1162, P. 48-55.
225. Getchell, T. V. Functional-properties of vertebrate olfactory receptor neurons / T. V. Getchell // *Physiological Reviews*. – 1986. – Vol. 66, № 3. – P. 772-818.
226. Goetze, B. A long-term culture system for olfactory explants with intrinsically fluorescent cell populations / B. Goetze, H. Breer, J. Strotmann // *Chemical Senses*. – 2002. – Vol. 27, № 9. – P. 817-824.
227. Goldstein, B. J. Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells / B. J. Goldstein, J. E. Schwob // *Journal of Neuroscience*. – 1996. – Vol. 16, № 12. – P. 4005-4016.
228. Goncalves, J. T. Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior / J. T. Goncalves, S. T. Schafer, F. H. Gage // *Cell*. – 2016. – Vol. 167, № 4. – P. 897-914.
229. Gong, Q. Culture of mouse olfactory sensory neurons / Q. Gong // *Current Protocols in Neuroscience*. – 2012. – № 3.24.
230. Gottfried, J. A. The nose smells what the eye sees: crossmodal visual facilitation of human olfactory perception / J. A. Gottfried, R. J. Dolan // *Neuron*. – 2003. – Vol. 39, № 2. – P. 375-386.
231. Gratzner, H. Monoclonal antibody against 5-bromo- and 5-iodo-deoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication / H. Gratzner // *Science*. – 1982. – Vol. 218. – P. 474-475.

232. Graziadei, G. A. M. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy / G. A. M. Graziadei, P. P. C. Graziadei // *Journal of Neurocytology*. – 1979. – Vol. 8, № 2. – P. 197-213.
233. Graziadei, P. P. C. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals .I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons / P. P. C. Graziadei, G. A. Montigraziadei // *Journal of Neurocytology*. – 1979. – Vol. 8, № 1. – P. 1-18.
234. Graziadei, P. P. C. Olfactory epithelium of *necturus-maculosus* and *ambystoma-tigrinum* / P. P. C. Graziadei, G. A. Montigraziadei // *Journal of Neurocytology*. – 1976. – Vol. 5, № 1. – P. 11-32.
235. Gu, J. Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: potential roles in developmental toxicity / J. Gu [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2000. – Vol. 165, № 2. – C. 158-162.
236. Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation / C. H. Rankin [et al.] // *Neurobiology of Learning and Memory*. – 2009. – Vol. 92, № 2. – P. 135-138.
237. Hadjiolov, A. A. The nucleolus and ribosome biogenesis / A. A. Hadjiolov. – New York: Springer-Verlag, 1985. – 268 p.
238. Hair cell heterogeneity in the goldfish saccule / W. M. Saidel [et al.] // *Brain Behavior and Evolution*. – 1995. – Vol. 46, № 6. – P. 362-370.
239. Hamdani, E. H. The functional organization of the fish olfactory system / E. H. Hamdani, K. B. Doving // *Progress in Neurobiology*. – 2007. – Vol. 82, № 2. – P. 80-86.
240. Single-cell transcriptomics reveals receptor transformations during olfactory neurogenesis / N. K. Hanchate [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 350, № 6265. – P. 1251-1255.

241. Handbook of olfaction and gustation / ed. R. L. Doty. – 3rd ed. – New York: Wiley-Liss, 2015. – 1240 p.
242. Hansen, A. Chemosensory systems in fish: structural, functional and ecological aspects / A. Hansen, K. Reutter // The senses of fish: adaptation for the reception of natural stimuli / ed. G.V. Emde, J. Magdans, B. G. Kapoor. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 55–89.
243. Hansen, A. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: Development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components / A. Hansen, B. S. Zielinski // Journal of Neurocytology. – 2005. – Vol. 34, № 3-5. – P. 183-208.
244. Hansen, A. Olfactory and solitary chemosensory cells: two different chemosensory systems in the nasal cavity of the American alligator, *Alligator mississippiensis* / A. Hansen // BMC Neuroscience. – 2007. – Vol. 8. – 64.
245. Hansen, A. Phyletic distribution of crypt-type olfactory receptor neurons in fishes / A. Hansen, T. E. Finger // Brain Behavior and Evolution. – 2000. – Vol. 55, № 2. – P. 100-110.
246. Hansen, A. The peripheral olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*: an ultrastructural study / A. Hansen, E. Zeiske // Chemical Senses. – 1998. – Vol. 23, № 1. – P. 39-48.
247. Hansen, A. Ultrastructure of the olfactory epithelium in intact, axotomized, and bulbectomized goldfish, *Carassius auratus* / A. Hansen [et al.] // Microscopy Research and Technique. – 1999. – Vol. 45, № 4-5. – P. 325-338.
248. Hara, T. J. Fish physiology: sensory systems neuroscience / T. J. Hara, B. Zielinski. – San Diego: Academic Press, 2006. – Vol. 25. – 536 p.
249. Hara, T. J. Olfaction and gustation in fish - an overview / T. J. Hara // Acta Physiologica Scandinavica. – 1994. – Vol. 152, № 2. – P. 207-217.
250. Harden, M. Olfactory imprinting is correlated with changes in gene expression in the olfactory epithelia of the zebrafish / M. Harden [et al.] //

- Journal of Neurobiology. – 2006. – Vol. 66, № 13. – P. 1452-1466.
251. Hentig, J. T. Exposure to zinc sulfate results in differential effects on olfactory sensory neuron subtypes in adult zebrafish / J. T. Hentig, C. A. Byrd-Jacobs // International journal of molecular sciences. – 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1445.
252. Herring, P. J. The biology of the Deep Ocean / P. J. Herring. – Oxford: Oxford University Press, 2002. – 314 p.
253. Higgs, D. M. Age- and size-related changes in the inner ear and hearing ability of the adult zebrafish (*Danio rerio*) / D. M. Higgs [et al.] // Jaro. – 2002. – Vol. 3, № 2. – P. 174-184.
254. High-throughput mapping of the promoters of the mouse olfactory receptor genes reveals a new type of mammalian promoter and provides insight into olfactory receptor gene regulation / E. J. Clowney [et al.] // Genome Research. – 2011. – Vol. 21, № 8. – P. 1249-1259.
255. Hinds, J. W. An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium - evidence for long-lived receptors / J. W. Hinds, P. L. Hinds, N. A. McNelly // Anatomical Record. – 1984. – Vol. 210, № 2. – P. 375-383.
256. Hinz, C. Olfactory imprinting is triggered by MHC peptide ligands C. Hinz [et al.] // Scientific Reports. – 2013. – Vol. 3. – 2800.
257. Hippocampal pathology in the human neuronal ceroid-lipofuscinoses: distinct patterns of storage deposition, neurodegeneration and glial activation / J. Tyynela [et al.] // Brain Pathology. – 2004. – Vol. 14, № 4. – P. 349-357.
258. Hlushchenko, I. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity / I. Hlushchenko, M. Koskinen, P. Hotulainen // Cytoskeleton (Hoboken). – 2016. – Vol. 73, № 9. – P. 435-441.
259. Holbrook, E. H. An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium / E. H. Holbrook, E. M. Szumowski, J. E. Schwob // Journal of

- Comparative Neurology. – 1995. – Vol. 363, № 1. – P. 129-146.
260. Holl, A. Vergleichende morphologische und histologische untersuchungen am geruchsorgan der knochenfische / A. Holl // Morphol, Z. Comparative morphological and histological studies on the olfactory organs of bony fish / Z. Morphol. – Ökol: Tiere, 1965. – Vol. 54. – P. 707–782.
261. Horizontal basal cell proliferation in the olfactory epithelium of transforming growth factor-alpha transgenic mice / T. V. Getchell [et al.] // Cell and Tissue Research. – 2000. – Vol. 299, № 2. – P. 185-192.
262. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium / N. Iwai [et al.] // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26, № 5. – P. 1298-1306.
263. 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.
264. Huard, J. M. T. Cell-cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium / J. M. T. Huard, J. E. Schwob // Developmental Dynamics. – 1995. – Vol. 203, № 1. – P. 17-26.
265. Hudspeth, A. J. Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair-cells / A. J. Hudspeth // Journal of Neuroscience. – 1982. – Vol. 2, № 1. – P. 1-10.
266. Hughes, I. Mixing model systems: Using zebrafish and mouse inner ear mutants and other organ systems to unravel the mystery of otoconial development / I. Hughes [et al.] // Brain Research. – 2006. – Vol. 1091. – P. 58-74.
267. Hughes, I. Otopetrin 1 is required for otolith formation in the zebrafish *Danio rerio* / I. Hughes [et al.] // Developmental Biology. – 2004. – Vol. 276, № 2. – P. 391-402.
268. Human and rat brain lipofuscin proteome / P. Ottis [et al.] // Proteomics. – 2012. – Vol. 12, № 15-16. – P. 2445-2454.
269. Hussar, P. The glucose transporter GLUT1 and the tight junction

- protein occludin in nasal olfactory mucosa / P. Hussar [et al.] // *Chemical Senses*. – 2002. – Vol. 27, № 1. – P. 7-11.
270. Hydrostatic pressure effects on eel mitochondrial functioning and membrane fluidity / A. Vettier [et al.] // *Undersea & Hyperbaric Medicine*. – 2006. – Vol. 33, № 3. – P. 149-156.
271. Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium / V. M. Carr // *Neuroscience*. – 1991. Vol. 45. – P. 433–449.
272. Identification of human olfactory cleft mucus proteins using proteomic analysis / H. Debat [et al.] // *Journal of proteome research*. – 2007. – Vol. 6, № 5. – P. 1985-1996.
273. Iijima, T. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death / T. Iijima // *Neuroscience Research*. – 2006. – Vol. 55, № 3. – P. 234-243.
274. Im, S. Transcriptional regulatory network during development in the olfactory epithelium / S. Im, C. Moon // *Bmb Reports*. – 2015. – Vol. 48, № 11. – P. 599-608.
275. Immunohistochemical demonstration of salmon olfactory glutathione S-transferase class pi (N24) in the olfactory system of lacustrine sockeye salmon during ontogenesis and cell proliferation / S. Yanagi [et al.] // *Anatomy and Embryology*. – 2004. – Vol. 208, № 3. – P. 231-238.
276. Immunological and neurobiochemical alterations induced by repeated oral exposure of phenol in mice / G. C. Hsieh [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 1992. – Vol. 228, № 2-3. – P. 107-114.
277. Increases in intracellular calcium via activation of potentially multiple phospholipase C isozymes in mouse olfactory neurons / S. A. Szebenyi [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – 336.
278. Individual recognition through olfactory - auditory matching in lemurs / I. G. Kulahci [et al.] // *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. – 2014. – Vol. 281, № 1784. – 0071.
279. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for

- dATP and cytochrome c / X. Liu [et al.] // *Cell*. – 1996. – Vol. 86, № 1. – P. 147-157.
280. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure / T. J. Murray [et al.] // *Reproductive Toxicology*. – 2007. – Vol. 23. – P. 383–390.
281. Influence of simultaneous gustatory stimuli on orthonasal and retronasal olfaction / A. Welge-Lussen [et al.] // *Neuroscience letters*. – 2009. – Vol. 454, № 2. – P. 124-128.
282. Influence on the formation of aragonite or vaterite by otolith macromolecules / G. Falini [et al.] // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2005. – № 1. – P. 162-167.
283. Injury in aged animals robustly activates quiescent olfactory neural stem cells / J. H. Brann [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2014. – Vol. 9. – 367.
284. Intra- and inter-specific features of the composition and structure of blood cells of coregonid fishes from the East-Siberian region / V. Yakhnenko [et al.] // *Advances in Limnology*. – 2012. – Vol. 63. – P. 285-297.
285. Investigation of initial changes in the mouse olfactory epithelium following a single intravenous injection of vincristine sulphate / K. Kai [et al.] // *Toxicologic Pathology*. – 2005. – Vol. 33, № 7. – P. 750-759.
286. Iqbal, T. Rapid degeneration and regeneration of the zebrafish olfactory epithelium after Triton X-100 application / T. Iqbal, C. Byrd-Jacobs // *Chemical Senses*. – 2010. – Vol. 35, № 5. – P. 351-361.
287. Irigoien, F. Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium / F. Irigoien, J. L. Badano // *Current genomics*. – 2011. – Vol. 12, № 4. – P. 285-297.
288. Jacobs, D. W. Acoustic frequency discrimination in the goldfish / D. W. Jacobs, W. N. Tavolga // *Animal behaviour*. – 1968. – Vol. 16, № 1. – P. 67-71.

289. Jarrard, H. E. Postembryonic changes in the structure of the olfactory bulb of the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) across its life history / H. E. Jarrard // *Brain Behavior and Evolution*. – 1997. – Vol. 49, № 5. – P. 249-260.
290. Julliard, A. K. Effects of chronic low-level copper exposure on ultrastructure of the olfactory system in rainbow-trout (*oncorhynchus-mykiss*) / A. K. Julliard, D. Saucier, L. Astic // *Histology and Histopathology*. – 1993. – Vol. 8, № 4. – P. 655-672.
291. Kalmijn, A. J. Functional evolution of lateral line and inner ear sensory systems / A. J. Kalmijn // *The mechanosensory lateral line: neurobiology and evolution* / ed. S. Coombs, P. Gorner, H. Munz. – New York: Springer-Verlag, 1989. – P. 187–215.
292. Kappe neurons, a novel population of olfactory sensory neurons / G. Ahuja [et al.] // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – 4037.
293. Kasumyan, A. O. Acoustic signaling in fish / A. O. Kasumyan // *Japanese journal of ichthyology*. – 2009. – Vol. 49, № 11. – 963-1020.
294. Kasumyan, A. O. Scanning electron microscopy of development of the olfactory organ in ontogeny of grass carp *ctenopharyngodon idella* / A. O. Kasumyan, N. I. Pashchenko // *Journal of Ichthyology*. – 2015. – Vol. 55, № 6. – P. 880-899.
295. Kasumyan, A. O. Structure and function of auditory system in fish / A. O. Kasumyan // *Japanese journal of ichthyology*. – 2005. – Vol. 45, № 2. – 223-270.
296. Kasumyan, A. O. The olfactory system in fish: structure, function, and role in behavior / A. O. Kasumyan // *Japanese journal of ichthyology*. – 2004. – Vol. 44, № 2. – 180-223.
297. Kawai, T. The Role of the Terminal Nerve and GnRH in Olfactory System Neuromodulation / T. Kawai, Y. Oka, H. Eisthen // *Zoological Science*. – 2009. – Vol. 26, № 10. – P. 669-680.
298. Kazmierczak, P. Sensing sound: molecules that orchestrate

- mechanotransduction by hair cells / P. Kazmierczak, U. Muller // Trends in Neurosciences. – 2012. – Vol. 35, № 4. – P. 220-229.
299. Kennedy, M. J. Mechanisms and Function of Dendritic Exocytosis / M. J. Kennedy, M. D. Ehlers // Neuron. – 2011. – Vol. 69, № 5. – P. 856-875.
300. Kenyon, T. N. A comparative study of hearing ability in fishes: the auditory brainstem response approach / T. N. Kenyon, F. Ladich, H. Y. Yan // Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology. – 1998. – Vol. 182, № 3. – P. 307-318.
301. Khan, M. A. Effects of phenol, benzalkonium chloride, oxymetazoline, tobacco and formalin on nasal mucosa of Albino rat / M. A. Khan // Journal of Anatomical Society of India. – 2006. – Vol. 55. – P. 1-7.
302. Kin recognition in zebrafish: a 24-hour window for olfactory imprinting / G. Gerlach [et al.] // Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences. – 2008. – Vol. 275, № 1647. – P. 2165-2170.
303. Klimenkov, I.V. Rearrangement of Actin Microfilaments in the Development of Olfactory Receptor Cells in Fish / I.V. Klimenkov, N.P. Sudakov, M.V. Pastokhov, M.M. Svinov, N.S. Kositsyn // Scientific reports. – 2018. – Vol. 8, 3692.
304. Knapp, L. A. Olfactory signals and the MHC: A review and a case study in Lemur catta / L. A. Knapp, J. Robson, J. S. Waterhouse // American Journal of Primatology. – 2006. – Vol. 68, № 6. – P. 568-584.
305. Kneussel, M. Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics / M. Kneussel, W. Wagner // Nature Reviews Neuroscience. – 2013. – Vol. 14, № 4. – P. 233-247.
306. Kneussel, M. Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics / M. Kneussel, W. Wagner // Nature Reviews Immunology. – 2013. – Vol. 14, № 4. –P. 233-247.
307. Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish / T. Koide [et al.] //

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – Vol. 106, № 24. – P. 9884-9889.
308. Kurahashi, T. Ca²⁺(+)-dependent adaptive properties in the solitary olfactory receptor cell of the newt / Kurahashi T., Shibuya T. // *Brain Research*. – 1990. – Vol. 515, № 1-2. – P. 261-268.
309. Ladich, F. Fish bioacoustics / F. Ladich // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2014. – Vol. 28. – P. 121-127.
310. Ladich, F. Peripheral hearing structures in fishes: diversity and sensitivity of catfishes and cichlids / F. Ladich // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2016. – Vol. 877. – P. 321-340.
311. Lancet, D. Probability model for molecular recognition in biological receptor repertoires - significance to the olfactory system / D. Lancet, E. Sadovsky, E. Seidemann // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – Vol. 90, № 8. – P. 3715-3719.
312. Landgraf, R. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication / R. Landgraf, I. D. Neumann // *Frontiers in Neuroendocrinology*. – 2004. – Vol. 25, № 3-4. – P. 150-176.
313. Lanford, P. J. Structure and function in the saccule of the goldfish (*Carassius auratus*): a model of diversity in the non-amniote ear / P. J. Lanford, C. Platt, A. N. Popper // *Hearing Research*. – 2000. – Vol. 143, № 1-2. – P. 1-13.
314. Lecoq, J. Peripheral adaptation codes for high odor concentration in glomeruli / J. Lecoq, P. Tiret, S. Charpak // *Journal of Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29, № 10. – P. 3067-3072.
315. Lehtonen, T. K. Odour cues from suitors' nests determine mating success in a fish / T. K. Lehtonen, C. Kvarnemo // *Biology Letters*. – 2015. – Vol. 11, № 5. – 0021.
316. Lehtonen, T. K. Odour cues from suitors' nests determine mating

- success in a fish / T. K. Lehtonen, C. Kvarnemo / *Biology letters*. – 2015. – Vol. 11, № 5. – 20150021.
317. Leung, C. T. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration / C. T. Leung, P. A. Coulombe, R. R. Reed // *Nature Neuroscience*. – 2007. – Vol. 10, № 6. – P. 720-726.
318. Lewcock, J. W. A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression / J. W. Lewcock, R. R. Reed // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, № 4. – P. 1069-1074.
319. Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement / G. W. Luxton [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 329, № 5994. – P. 956-959.
320. Lingwood, D. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle / D. Lingwood, K. Simons // *Science*. – 2010. – Vol. 327, № 5961. – P. 46-50.
321. Lombarte, A. Differences in morphological features of the sacculus of the inner-ear of 2 hakes (*merluccius-capensis* and *m-paradoxus*, gadiformes) inhabits from different depth of sea / A. Lombarte, J. M. Fortune // *Journal of Morphology*. – 1992. – Vol. 214, № 1. – P. 97-107.
322. Loo, S. K. Fine structure of the olfactory epithelium in some primates / S. K. Loo // *Journal of anatomy*. – 1977. – Vol. 123, № 1. – P. 135-145.
323. Lowe, G. The spatial distributions of odorant sensitivity and odorant-induced currents in salamander olfactory receptor-cells / G. Lowe, G. H. Gold // *Journal of physiology-London*. – 1991. – Vol. 442. – P. 147-168.
324. Ludwig, M. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours / M. Ludwig, G. Leng // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2006. – Vol. 7, № 2. – P. 126-136.
325. Lychakov, D. V. Fish otolith mass asymmetry: morphometry and influence on acoustic functionality / D. V. Lychakov, Y. T. Rebane // *Hearing Research*. – 2005. – Vol. 201, № 1-2. – P. 55-69.
326. Lychakov, D. V. Otolith regularities / D. V. Lychakov, Y. T. Rebane

- // Hearing Research. – 2000. – Vol. 143, № 1-2. – P. 83-102.
327. Lysine-specific demethylase-1 (LSD1) is compartmentalized at nuclear chromocenters in early post-mitotic cells of the olfactory sensory neuronal lineage / S. Kilinc [et al.] // Molecular and cellular neuroscience. – 2016. – Vol. 74. – P. 58-70.
328. Mackay-Sim, A. Cell-dynamics in the adult-mouse olfactory epithelium - a quantitative autoradiographic study / A. Mackay-Sim, P. Kittel // Journal of Neuroscience. – 1991. – Vol. 11, № 4. – P. 979-984.
329. Mackay-Sim, A. Patient-derived stem cells: pathways to drug discovery for brain diseases / A. Mackay-Sim // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2013. – Vol. 7. – 29.
330. Mackay-Sim, A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa / A. Mackay-Sim // Archives Italiennes De Biologie. – 2010. – Vol. 148, № 2. – P. 47-58.
331. Magklara, A. Stochastic gene expression in mammals: lessons from olfaction / A. Magklara, S. Lomvardas // Trends in Cell Biology. – 2013. – Vol. 23, № 9. – P. 449-456.
332. Mair, R. G. Postnatal proliferation and maturation of olfactory-bulb neurons in the rat / R. G. Mair, R. L. Gellman, R. C. Gesteland // Neuroscience. – 1982. – Vol. 7, № 12. – P. 3105-3116.
333. Manfred, A. Histological and histometrical evidences for phenol immunotoxicity in mice / A. L. Manfred, A. Jaafari, M. T. Sheibani // Comparative Clinical Pathology. – 2012. – Vol. 23. – P. 529-534.
334. Maninova, M. Emerging role for nuclear rotation and orientation in cell migration / M. Maninová, M. P. Iwanicki, T. Vomastek // Cell Adhesion & Migration. – 2014. – Vol. 8, № 1. – P. 42-48.
335. Manipulation of olfactory tight junctions using papaverine to enhance intranasal delivery of gemcitabine to the brain /M. Krishan [et al.] // Drug Delivery. – 2014. – Vol. 21, № 1. – P. 8-16.
336. Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb /

- K. Mori [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2006. – Vol. 86, № 2. – P. 409-433.
337. Margolis, F. L. *Molecular Neurobiology of the Olfactory System: Molecular, Membranous, and Cytological Studies* / F. L. Margolis, T. V. Getchell. – New York: Springer Science & Business Media, 2013. – 398 p.
338. Marshall, N. J. Vision and sensory physiology - The lateral line systems of three deep-sea fish / N. J. Marshall // *Journal of Fish Biology*. – 1996. – Vol. 49. – P. 239-258.
339. Marusov, E. A. Chemosensory mediation of food searching in the buenos aires tetra *hyphessobrycon anisitsi* (Characidae) / E. A. Marusov, A. O. Kasumyan // *Journal of Ichthyology*. – 2016. – Vol. 56, № 3. – P. 462–466.
340. Marusov, E. A. Feeding behavior mediated by chemoreception in the bitterling *Rhodeus sericeus amarus* / E. A. Marusov, A. O. Kasumyan // *Journal of Ichthyology*. – 2010. – Vol. 50, № 11. – P. 1036-1042.
341. Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands / M. Milinski [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102, № 12. – P. 4414-4418.
342. Mattila, P. K. Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: an emerging concept in tuning receptor signaling / P. K. Mattila, F. D. Batista, B. Treanor // *Journal Cell Biology*. – 2016. – Vol. 212, № 3. – P. 267-280.
343. Mechanisms of Otoconia and Otolith Development / Y. W. Lundberg [et al.] // *Developmental Dynamics*. – 2015. – Vol. 244, № 3. – P. 239-253.
344. Meerlo, P. New neurons in the adult brain: the role of sleep and consequences of sleep loss / P. Meerlo // *Sleep Medicine Reviews*. – 2008. – Vol. 13, № 3. – P. 187-194.
345. MHC ligands and peptide motifs: first listing / H. G. Rammensee, T. Friede, S. Stefanovic // *Immunogenetics*. – 1995. – Vol. 41. – P. 178–228.

346. MHC molecules protect t-cell epitopes against proteolytic destruction / S. Mouritsen [et al.] // *Journal of Immunology*. – 1992. – Vol. 149, № 6. – P. 1987-1993.
347. MHC signaling during social communication / J. S. Ruff [et al.] // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2012. – Vol. 738. – P. 290-313.
348. MHC-dependent mate preferences in humans / C. Wedekind [et al.] // *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. – 1995. – Vol. 260, № 1359. – P. 245-249.
349. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia / K. Niizuma [et al.] // *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. – 2010. – Vol. 1802, № 1. – P. 92-99.
350. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis / E. Daugas [et al.] // *Faseb Journal*. – 2000. – Vol. 14, № 5. – P. 729-739.
351. Moffatt, C. A. Steroid hormone modulation of olfactory processing in the context of socio-sexual behaviors in rodents and humans / C. A. Moffatt // *Brain Research Reviews*. – 2003. – Vol. 43, № 2. – P. 192-206.
352. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor / S. A. Susin [et al.] // *Nature*. – 1999. – Vol. 397, № 6718. – P. 441-446.
353. Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and fila / A. Steinke [et al.] // *Histochemistry and cell biology*. – 2008. – Vol. 130, № 2. – P. 339-361.
354. Mombaerts, P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors / P. Mombaerts // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2004. – Vol. 5, № 4. – P. 263-278.
355. Mombaerts, P. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited / P. Mombaerts // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2004. – Vol. 14, № 1. – P. 31-36.
356. Monahan, K. Monoallelic expression of olfactory receptors / K. Monahan, S. Lomvardas // *Annual Review of Cell and Developmental*

- Biology. – 2015. – Vol. 31. – P. 721-740.
357. Monroe, J. D. Sensory hair cell death and regeneration in fishes / J. D. Monroe, G. Rajadinakaran, M. E. Smith // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – 131.
358. Mori, K. Molecular recognition and olfactory processing in the mammalian olfactory system / K. Mori, Y. Yoshihara // *Progress in neurobiology*. – 1995. – Vol. 45, № 6. – P. 585-619.
359. Morphological and functional research of sensory auditory epithelium of whitefish of Lake Baikal / A. A. Belous [et al.] // Abstracts 12th International symposium on the biology and management of Coregonid fishes. – Irkutsk, 2014. – P. 20.
360. Morphological and functional research of sensory auditory epithelium of whitefish of Lake Baikal / A. A. Belous [et al.] // Abstracts 12th International symposium on the biology and management of Coregonid fishes. – Irkutsk: Asprint, 2014. – 20 p.
361. Mugiya, Y. On aberrant sagittas of teleostean fishes / Y. Mugiya // *Journal of Ichthyology*. – 1972. – Vol. 19, № 1. – P. 11-14.
362. Myosin XI-i links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in Arabidopsis / K. Tamura [et al.] // *Current Biology*. – 2013. – Vol. 23, № 18. – P. 1776-1781.
363. Myosin XI-i links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in Arabidopsis / K. Tamura [et al.] // *Current Biology*. – 2013. – Vol. 23, № 18. – P. 1776-1781.
364. Nagai, M. H. Monogenic and monoallelic expression of odorant receptors / M. H. Nagai, L. M. Armelin-Correa, B. Malnic // *Molecular Pharmacology*. – 2016. – Vol. 90, № 5. – P. 633-639.
365. Nagashima, A. Enzymatic Conversion of Odorants in Nasal Mucus Affects Olfactory Glomerular Activation Patterns and Odor Perception / A. Nagashima, K. Touhara // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30, № 48. – P. 16391-16398.

366. Naguro, T. Olfactory epithelium in young-adult and aging rats as seen with high-resolution scanning electron-microscopy / T. Naguro, K. Iwashita // *Microscopy Research and Technique*. – 1992. – Vol. 23, № 1. – P. 62-75.
367. Nakamura, T. Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates / T. Nakamura // *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*. – 2000. – V. 126, № 1. – P. 17-32.
368. Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse / S. Serizawa [et al.] // *Science*. – 2003. – Vol. 302, № 5653. – P. 2088-2094.
369. Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior / P. Stockinger [et al.] // *Cell*. – 2005. – Vol. 121, № 5. – P. 795-807.
370. Neural regeneration dynamics of *Xenopus laevis* olfactory epithelium after zinc sulfate-induced damage / J. L. Frontera [et al.] // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2016. – Vol. 77. – P. 1-9.
371. Neuroendocrine Mechanisms Underlying Sensory Integration of Social Signals / L. A. O’Connell [et al.] // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2013. – Vol. 25, № 7. – P. 644-654.
372. Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease / D. Sulzer [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2008. – Vol. 106, № 1. – P. 24-36.
373. Neuropeptides as synaptic transmitters / C. Salio [et al.] // *Cell and Tissue Research*. – 2006. – Vol. 326, № 2. – P. 583-598.
374. NGF signaling in sensory neurons: Evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals / J. D. Delcroix [et al.] // *Neuron*. – 2003. – Vol. 39, № 1. – P. 69-84.
375. Nicolay, D. J. Transcriptional regulation of neurogenesis in the olfactory epithelium / D. J. Nicolay, J. R. Doucette, A. J. Nazarali // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2006. – Vol. 26, № 4-6. – P. 803-821.

376. Nicolson, T. The genetics of hearing and balance in zebrafish / T. Nicolson // *Annual Review of Genetics*, 2005. – Vol. 39. – P. 9-22.
377. Niimura, Y. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods / Y. Niimura, M. Nei // *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102, № 17. – P. 6039-6044.
378. Non-sensory cortical and subcortical connections of the primary auditory cortex in Mongolian gerbils: Bottom-up and top-down processing of neuronal information via field AI / E. Budinger [et al.] // *Brain Research*. – 2008. – Vol. 1220. – P. 2-32.
379. Nuclear aggregation of olfactory receptor genes governs their monogenic expression / E. J. Clowney [et al.] // *Cell*. – 2012. – Vol. 151, № 4. – P. 724-737.
380. Odor memory stability after reinnervation of the olfactory bulb / E. Blanco-Hernandez [et al.] // *Plos One*. – 2012. – Vol. 7, № 10.
381. 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 Biology*. – 2003. – Vol. 4, № 11. – R71.
382. Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium / C. L. Iwema [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2004. – Vol. 24, № 2. – P. 356-369.
383. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map / F. Wang [et al.] // *Cell*. – 1998. – Vol. 93, № 1. – P. 47-60.
384. Odorants as cell-type specific activators of a heat shock response in the rat olfactory mucosa / V. M. Carr [et al.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 2001. – Vol. 432, № 4. – P. 425-439.
385. Ogg, M. C. Habituation of glomerular responses in the olfactory bulb following prolonged odor stimulation reflects reduced peripheral input / M. C. Ogg, M. Bendahamane, M. L. Fletcher // *Frontiers in Molecular*

- Neuroscience. – 2015. – Vol. 8. – 53.
386. Oka, Y. Crypt Neurons Express a Single V1R-Related ora Gene / Y. Oka, L. R. Saraiva, S. I. Korsching // *Chemical Senses*. – 2012. – Vol. 37, № 3. – P. 219-227.
387. Olfaction in neurologic and neurodegenerative diseases: a literature review / M. D. Godoy [et al.] // *International Archives of Otorhinolaryngology*. – 2015. – Vol. 19, № 2. – P. 176-179
388. Olfactory bulb habituation to odor stimuli / D. Chaudhury [et al.] // *Behavioral Neuroscience*. – 2010. – Vol. 124, № 4. – P. 490-499.
389. Olfactory CNG channel desensitization by Ca²⁺/CaM via the B1b subunit affects response termination but not sensitivity to recurring stimulation / Y. Song [et al.] // *Neuron*. – 2008. – Vol. 58, № 3. – P. 374-386.
390. Olfactory receptor accessory proteins play crucial roles in receptor function and gene choice / R. Sharma [et al.] // *Elife*. – 2017. – Vol. 6.
391. Olfactory toxicity in fishes / K. B. Tierney [et al.] // *Aquatic Toxicology*. – 2010. – Vol. 96, № 1. – P. 2-26.
392. Oliveira, R. F. Mating tactics and male-male courtship in the lek-breeding cichlid *Oreochromis mossambicus* / R. F. Oliveira, V. C. Almada // *Journal of Fish Biology*. – 1998. – Vol. 52, № 6. – P. 1115-1129.
393. ORA1, a zebrafish olfactory receptor ancestral to all mammalian V1R genes, recognizes 4-hydroxyphenylacetic acid, a putative reproductive pheromone / M. Behrens [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289, № 28. – P. 19778-19788.
394. Otolith crystals (in Carapidae): Growth and habit / E. Parmentier [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2007. – Vol. 159, № 3. – P. 462-473.
395. Otolithic apparatus in Black Sea elasmobranchs / D. V. Lychakov [et al.] // *Fisheries Research*. – 2000. – Vol. 46, № 1-3. – P. 27-38.
396. Overath, P. Of volatiles and peptides: in search for MHC-dependent olfactory signals in social communication / P. Overath, T. Sturm, H. G.

- Rammensee // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2014. – Vol. 71, № 13. – P. 2429-2442.
397. Oxygen concentration profiles in sediments of two ancient lakes: Lake Baikal (Siberia, Russia) and Lake Malawi (East Africa) / P. Martin [et al.] // *Hydrobiologia*. – 1998. – Vol. 367. – P. 163-174.
398. P63 regulates olfactory stem cell self-renewal and differentiation / R. B. Fletcher [et al.] // *Neuron*. – 2011. – Vol. 72, № 5. – P. 748-759.
399. Pacary, E. Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and -independent mechanisms / E. Pacary, R. Azzarelli, F. Guillemot // *Nature Communications*. – 2013. – Vol. 4. – 1635.
400. Pacary, E. Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and -independent mechanisms / E. Pacary, R. Azzarelli, F. Guillemot // *Nature Communication*. – 2013. – Vol. 4. – 1635.
401. Pankhurst, N. W. Changes in vision and olfaction during sexual-maturation in the european eel *anguilla-anguilla* (L) / N. W. Pankhurst, J. N. Lythgoe // *Journal of Fish Biology*. – 1983. – Vol. 23, № 2. – P. 229-240.
402. Paskin, T. R. Olfactory bulb recovery following reversible deafferentation with repeated detergent application in the adult zebrafish / T. R. Paskin, T. R. Iqbal, C. A. Byrd-Jacobs // *Neuroscience*. – 2011. – Vol. 196. – P. 276-284.
403. Pendleton, C. Neurotransplantation: lux et veritas, fiction or reality? / C. Pendleton, I. Ahmed, A. Quinones-Hinojosa // *Journal of Neurosurgical Sciences*. – 2011. – Vol. 55, № 4. – P. 297-304.
404. Penn, D. J. How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences? / D. J. Penn, W. K. Potts // *Advances in Immunology*. – 1998. – Vol. 69. – P. 411-436.
405. Penn, D. J. The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes / D. J. Penn, W. K. Potts // *American Naturalist* Vol. – 1999. – Vol. 153, № 2. – P. 145-164.
406. Pifferi, S. Chapter 8. Signal transduction in vertebrate olfactory cilia /

- S. Pifferi, A. Menini, T. Kurahashi // *The neurobiology of olfaction* / ed. Menini A, editor. – Boca Raton: Taylor & Francis, 2010.
407. Platt, C. Fine structure and function of the ear / C. Platt, A. N. Popper // *Hearing and sound communication in fishes* / ed. W. N. Tavolga, A. N. Popper, R. R. Fay. – New York: Springer, 1981. – P. 3–38.
408. Platt, C. Variation in lengths of ciliary bundles on hair-cells along the macula of the sacculus in 2 species of teleost fishes / C. Platt, A. N. Popper // *Scanning Electron Microscopy*. – 1984. – Vol. 4. – P. 1915-1924.
409. Pluta, R. From brain ischemia-reperfusion injury to possible sporadic Alzheimer's disease / R. Pluta // *Current Neurovascular Research*. – 2004. – Vol. 1, № 5. – P. 441-453.
410. Popper A.N. Comparative scanning electron microscopic investigations of the sensory epithelia in the teleost sacculus and lagena// *J. Comp. Neurol.* 1981. №200. P. 357-374.
411. Popper, A. N. Auditory System Morphology / A. N. Popper // *Encyclopedia of Fish Physiology: from Genome to Environment*. – 2011. – Vol. 1-3. – P. 252-261.
412. Popper, A. N. Fish hearing, lateral lines / A. N. Popper, D. M. Higgs // *Encyclopedia of Ocean Sciences*. – London: Academic Press, 2001. – P. 922-928.
413. Popper, A. N. Hair cell heterogeneity and ultrasonic hearing: recent advances in understanding fish hearing / A. N. Popper // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. – 2000. – Vol. 355, № 1401. – P. 1277-1280.
414. Popper, A. N. Organization of the inner ear and processing of acoustic information / A. N. Popper // *Fish Neurobiology and Behavior* / ed. R. G. Northcutt, R. E. Davis. – Ann Arbor: University of Michigan Press, 1983. – P. 125–178.
415. Popper, A. N. Rethinking sound detection by fishes / A. N. Popper, R. R. Fay // *Hearing Research*. – 2011. – Vol. 273, № 1-2. – P. 25-36.

416. Popper, A. N. Scanning electron-microscopic study of the sacculus and lagena in several deep-sea fishes / A. N. Popper // *American Journal of Anatomy*. – 1980. – Vol. 157, № 2. – P. 115-136.
417. Popper, A. N. Structure-function relationships in fish otolith organs / A. N. Popper, Z. M. Lu // *Fisheries Research*. – 2000. – Vol. 46, № 1-3. – P. 15-25.
418. Popper, A. N. The morphology and evolution of the ear in actinopterygian fishes / A. N. Popper, S. Coombs // *American Zoologist*. – 1982. – Vol. 22, № 2. – P. 311-328.
419. Popper, A. N. Ultrastructure of the sacculus and lagena in a moray eel (*gymnothorax* sp) / A. N. Popper // *Journal of Morphology*. – 1979. – Vol. 161, № 3. – P. 241-256.
420. Popper, A. N. Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology / A. N. Popper, J. Ramcharitar, S. E. Campana // *Marine and Freshwater Research*. – 2005. – Vol. 56, № 5. – P. 497-504.
421. Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors / C. K. Tong [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111, № 34. – P. 12438-12443.
422. Primary Cilia on Horizontal Basal Cells Regulate Regeneration of the Olfactory Epithelium / A. M. Joiner [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2015. – Vol. 35, № 40. – P. 13761-13772.
423. Primary culture of embryonic rat olfactory receptor neurons / E. Micholt [et al.] // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. – 2012. – Vol. 48, № 10. – P. 650-659.
424. Proliferative and transcriptional identity of distinct classes of neural precursors in the mammalian olfactory epithelium / E. S. Tucker [et al.] // *Development*. – 2010. – Vol. 137, № 15. – P. 2471-2481.
425. Prolonged exposure to an odor or deodorized air alters the size of mitral cells in the olfactory bulb / D. G. Laing [et al.] // *Brain Research*. –

1985. – Vol. 336, № 1. – P. 81-87.
426. Putative odour receptors localize in cilia of olfactory receptor cells in rat and mouse: a freeze-substitution ultrastructural study / B. P. M. Menco [et al.] // *Journal of Neurocytology*. – 1997. – Vol. 26, № 10. – P. 691-706.
427. Quantitative structure-activity-activity and quantitative structure-activity investigations of human and rodent toxicity / I. Lessigiarska [et al.] // *Chemosphere*. – 2006. – Vol. 65, № 10. – P. 1878-1887.
428. Ramcharitar, J. Masked auditory thresholds in sciaenid fishes: A comparative study / J. U. Ramcharitar, A. N. Popper // *Journal of the Acoustical Society of America*. – 2004. – Vol. 116, № 3. – P. 1687-1691.
429. Rawson, N. E. Cell and molecular biology of human olfaction / N. E. Rawson, G. Gomez // *Microscopy Research and Technique*. – 2002. – Vol. 58, № 3. – P. 142-151.
430. Raymond, E. H. Behavioral responses of two deep-sea fish species to red, farred, and white light / E. H. Raymond, E. A. Widder // *Marine Ecology Progress Series*. – 2007. – Vol. 350. – P. 291-298.
431. Rebecchi, M. J. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C / M. J. Rebecchi, S. N. Pentylala // *Physiological Reviews*. – 2000. – Vol. 80, № 4. – P. 1291-1335.
432. Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice / A. Ducray [et al.] // *European journal of neuroscience*. – 2002. – Vol. 15, № 12. – P. 1907-1917.
433. Recovery of Barotrauma Injuries Resulting from Exposure to Pile Driving Sound in Two Sizes of Hybrid Striped Bass / B. M. Casper [et al.] // *Plos One*. – 2013. – Vol. 8, № 9. – e73844.
434. Redox cycling of phenol induces oxidative stress in human epidermal keratinocytes / A. A. Shvedova [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2000. – Vol. 114, № 2. – P. 354-364.
435. Reese, T. S. Olfactory cilia in the frog / T. S. Reese // *Journal of Cell Biology*. – 1965. – Vol. 25, № 2. – P. 209-230.

436. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action / P. J. Lucassen [et al.] // *European Neuropsychopharmacology*. – 2010. – Vol. 20, № 1. – P. 1-17.
437. Reisert, J. Na⁺-dependent Ca²⁺ extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells / J. Reisert, H. R. Matthews // *Journal of general physiology*. – 1998. – Vol. 112, № 5. – P. 529-535.
438. Reisert, J. Olfactory marker protein modulates the cAMP kinetics of the odour-induced response in cilia of mouse olfactory receptor neurons / J. Reisert, K. W. Yau, F. L. Margolis // *Journal of Physiology-London*. – 2007. – Vol. 585, № 3. – P. 731-740.
439. Retinoic acid regulates olfactory progenitor cell fate and differentiation / M. Paschaki [et al.] // *Neural Development* Vol. – 2013. – Vol. 8. – 13.
440. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *Journal of Cell Biology*. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
441. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *Journal of cell biology*. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
442. Ricci, A. J. Tonotopic variation in the conductance of the hair cell mechanotransducer channel / A. J. Ricci, A. C. Crawford, R. Fettiplace // *Neuron*. – 2003. – Vol. 40, № 5. – P. 983-990.
443. Roche, M. de la. Origins of the cytolytic synapse / M. de la Roche, Y. Asano, G. M. Griffiths // *Nature Reviews Immunology*. – 2016. – Vol. 16, № 7. – P. 421-432.
444. Rogers, P. H. Multipole mechanisms for directional hearing in fish / P. H. Rogers, D. G. Zedler // *Fish bioacoustics* / ed. J. F. Webb, R. R. Fay, A. N. Popper. – New York: Springer, 2008. – P. 233–252.
445. Ronnett, G. V. G proteins and olfactory signal transduction / G. V.

- Ronnett, C. Moon // *Annual Review of Physiology*. – 2002. – Vol. 64. – P. 189-222.
446. ROS-mediated PARP activity undermines mitochondrial function after permeability transition pore opening during myocardial ischemia-reperfusion / J. M. Schriever [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2013. – Vol. 2, № 2. – e000159.
447. Roux, N. Clownfish chemically recognized their sea anemone host at settlement / N. Roux, D. Lecchini // *Vie Et Milieu-Life and Environment*. – 2015. – Vol. 65, № 1. – P. 17-20.
448. Rubel, E. W. Development of the place principle - acoustic trauma / E. W. Rubel, B. M. Ryals // *Science*. – 1983. – Vol. 219, № 4584. – P. 512-514.
449. Sakmann, B. Chapter 21. Geometric parameters of pipettes and membrane patches / B. Sakmann, E. Neher // *Single-Channel Recording* / ed. B. Sakmann, E. Neher. – New York: Plenum, 1983. – P. 637-650.
450. Salem, M.A. Structure and development of the saccular sensory epithelium in relation to otolith growth in the perch *perca fluviatilis* (Telostei) / M. A. Salem, M. S. Zaghloul // *Egyptian Journal of Biology*. – 2001. – Vol. 3, № 2. – P. 1-12.
451. Sanchezfernandez, J. M. Human otoconial crystal-growth - an approach from morphological and morphometric data / J. M. Sanchezfernandes, J. M. Riverapomar, M. J. Tello // *Orl-Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties*. – 1989. – Vol. 51, № 2. – P. 108-115.
452. Saraiva, L. R. A novel olfactory receptor gene family in teleost fish / L. R. Saraiva, S. I. Korsching // *Genome Research*. – 2007. – Vol. 17, № 10. – P. 1448-1457.
453. Sato, Y. Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish / Y. Sato, N. Miyasaka, Y. Yoshihara // *Journal of Neuroscience*. – 2007. – Vol.

- 27, № 7. – P. 1606-1615.
454. Sato, Y. Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish / Y. Sato, N. Miyasaka, Y. Yoshihara // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – Vol. 25, № 20. – P. 4889-4897.
455. Saxena, A. Sox10-dependent neural crest origin of olfactory microvillous neurons in zebrafish / A. Saxena, B. N. Peng, M. E. Bronner // *Elife*. – 2013. – Vol. 2. – e00336.
456. Schmachtenberg, O. Histological and electrophysiological properties of crypt cells from the olfactory epithelium of the marine teleost *Trachurus symmetricus* / O. Schmachtenberg // *Journal of Comparative Neurology*. – 2006. – Vol. 495, № 1. – P. 113-121.
457. Schreibman, M. P. The structural and functional relationship between olfactory and reproductive systems from birth to old age in fish / M. P. Schreibman, H. Margolis-Nunno, L. Halpern-Sebold // *Chemical Signals in Vertebrates. Vol. 4. Ecology, Evolution, and Comparative Biology* / ed. by D. Duvall, D. Muller-Schwarze, R. M. Silverstein. – New York: Plenum Press, 1985. – P. 155–172.
458. Schultze, M. Uber die Endigungsweise des Geruchsnerven und der Epithelialgebilde des Nasenschleimhaut / M. Schultze // *Monatsberichte der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*. – 1856. Vol. 21. – P. 504-514.
459. Schulz-Mirbach, T. Diversity of inner ears in fishes: possible contribution towards hearing improvements and evolutionary considerations / T. Schulz-Mirbach, F. Ladich // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2016. – Vol. 877. – P. 341-391.
460. Schulz-Mirbach, T. Inner ear morphology in the Atlantic molly *Poecilia mexicana*-first detailed microanatomical study of the inner ear of a cyprinodontiform species / T. Schulz-Mirbach, M. Hess, M. Plath // *Plos One*. – 2011. – Vol. 6, № 11. – e27734.

461. Schwander, M. The cell biology of hearing / M. Schwander, B. Kachar, U. Muller // *Journal of Cell Biology*. – 2010. – Vol. 190, № 1. – P. 9-20.
462. Schwob, J. E. Neural regeneration and the peripheral olfactory system / J. E. Schwob // *Anatomical Record*. – 2002. – Vol. 269. – P. 33–49.
463. Schwob, J. E. Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion / J. E. Schwob, S. L. Youngentob, R. C. Mezza // *Journal of Comparative Neurology*. – 1995. – Vol. 359, № 1. – P. 15-37.
464. Schwob, J. E. Stem cells of the adult olfactory epithelium / J. E. Schwob, W. Jang // *Neural Development and Stem Cells* / ed. by M. S. Rao. – Totowa: Humana Press, 2006. – P. 219–233.
465. Scott, J. W. A functional map in rat olfactory epithelium / J. W. Scott, T. Brierly // *Chemical Senses*. – 1999. – Vol. 24, № 6. – P. 679-690.
466. Seasonal variations in olfactory sensory neurons fish sensitivity to sex pheromones explained? / E. H. Hamdani [et al.] // *Chemical Senses*. – 2008. – Vol. 33, № 2. – P. 119-123.
467. Segovia, S. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex-differences in reproductive behaviors / S. Segovia, A. Guillaumon // *Brain Research Reviews*. – 1993. – Vol. 18, № 1. – P. 51-74.
468. Seifert, M. Human memory B cells / M. Seifert, R. Kuppers // *Leukemia*. – 2016. – Vol. 30, № 12. – P. 2283-2292.
469. Sensational placodes: neurogenesis in the otic and olfactory systems / E. C. Maier [et al.] // *Developmental Biology*. – 2014. – Vol. 389, № 1. – P. 50-67.
470. Seo, H. S. Auditory-olfactory Integration: congruent or Pleasant Sounds amplify odor pleasantness / H. S. Seo, T. Hummel // *Chemical Senses*. – 2011. – Vol. 36, № 3. – P. 301-309.
471. Serizawa, S. U. One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system / S. U. Serizawa, K. Miyamichi, H. Sakano // *Trends in Genetics*. –

2004. – Vol. 20, № 12. – P. 648-653.
472. Shihabuddin, L. S. Neural stem cell transplantation as a therapeutic approach for treating lysosomal storage diseases / L. S. Shihabuddin, S. H. Cheng // *Neurotherapeutics*. – 2011. – Vol. 8, № 4. – P. 659-667.
473. Shirao, T. Actin filaments and microtubules in dendritic spines / T. Shirao, C. Gonzalez-Billault // *Journal of Neurochemistry*. – 2013. – Vol. 126, № 2. – P. 155-164.
474. Shirao, T. Actin filaments and microtubules in dendritic spines / T. Shirao, C. Gonzalez-Billault // *Journal of Neurochemistry*. – 2013. – Vol. 126, № 2. – P. 155-164.
475. Shykind, B. M. Regulation of odorant receptors: one allele at a time / B. M. Shykind // *Human Molecular Genetics*. – 2005. – Vol. 14. – P. R33-R39.
476. Sideleva, V. G. The endemic fishes of Lake Baikal / V. G. Sideleva. – Leiden: Backhuys Publishers, 2003. – 270 p.
477. Silencing of odorant receptor genes by G protein beta gamma signaling ensures the expression of one odorant receptor per olfactory sensory neuron / T. Ferreira [et al.] // *Neuron*. – 2014. – Vol. 81, № 4. – P. 847-859.
478. Simon, B. Effects of long-term exposure to hydrostatic-pressure per se (101 ATA) on eel metabolism / B. Simon, P. Sebert, L. Barthelemy // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 1989. – Vol. 67, № 10. – P. 1247-1251.
479. Singh, P. B. Class-I transplantation antigens in solution in body-fluids and in the urine - individuality signals to the environment / P. B. Singh, R. E. Brown, B. Roser // *Journal of Experimental Medicine*. – 1988. – Vol. 168, № 1. – P. 195-211.
480. Singh, P. B. MHC antigens in urine as olfactory recognition cues / P. B. Singh, R. E. Brown, B. Roser // *Nature*. – 1987. – Vol. 327, № 6118. – P. 161-164.

481. Smith, C. G. Changes in the olfactory mucosa and the olfactory nerves following intranasal treatment with one percent zinc sulphate / C. G. Smith // Canadian Medical Journal. – 1938. – Vol. 39. – P. 138–140.
482. Smith, M. E. Structural and functional effects of acoustic exposure in goldfish: evidence for tonotopy in the teleost saccule / M. E. Smith [et al.] // BMC Neuroscience. – 2011. – Vol. 12, № 19. – P. 1-16.
483. Stacey, N. E. Hormonally derived sex pheromones in fishes / N. E. Stacey // Hormones and Reproduction of Vertebrates. Vol. 1 / ed. D. O. Norris, K. H. Lopez. – New York: Academic Press, 2011. – P. 169–192.
484. Stacey, N. E. Hormones as sex pheromones in fish: widespread distribution among freshwater species / N. E. Stacey, J. R. Cardweel // Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish / ed. F. W. Goetz, P. Thomas. – Austin: University of Texas, 1995. – P. 244–248.
485. Stacey, N. E. Reproductive pheromones / N. E. Stacey, P. W. Sorensen // Fish Physiology. Vol. 24. Behaviour and Physiology of Fish / K. A. Sloman, R. W. Wilson, S. Balshine. – San Diego: Elsevier, 2006. – P. 359–412.
486. Starcevic, S. L. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferase-pi in rainbow-trout olfactory receptor neurons / S. L. Starcevic, B. S. Zielinski // Neuroscience Letters. – 1995. – Vol. 183, № 3. – P. 175-178.
487. Starkov, A. A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling / A. A. Starkov // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 1147. – P. 37-52.
488. Starr, D. A. Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus / D. A. Starr // Molecular Biosystems. – 2007. – Vol. 3, № 9. – P. 583-589.

489. Starr, D. A. Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus / D. A. Starr // *Molecular Biosystems*. – 2007. – Vol. 3, № 9. – P. 583-589.
490. Stereocilia Membrane Deformation: Implications for the Gating Spring and Mechanotransduction Channel / R. J. Powers [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 102, № 2. – P. 201-210.
491. Stevenson, R. J. The effect of appropriate and inappropriate stimulus color on odor discrimination / R. J. Stevenson, M. Oaten // *Perception & Psychophysics*. – 2008. – Vol. 70, № 4. – P. 640-646.
492. Strassmaier, M. The hair cell's transduction channel / M. Strassmaier, P. G. Gillespie // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2002. – Vol. 12, № 4. – P. 380-386.
493. Structural and functional effects of acoustic exposure in goldfish: evidence for tonotopy in the teleost saccule / M. E. Smith [et al.] // *BMC Neuroscience*. – 2011. – Vol. 12, № 19. – P. 1-16.
494. Study of the Olfactory Epithelium in the Developing Sturgeon. Characterization of the Crypt Cells / S. Camacho [et al.] // *Chemical Senses*. – 2010. – Vol. 35, № 2. – P. 147-156.
495. Survival of bundleless hair cells and subsequent bundle replacement in the bullfrog's saccule / J. E. Gale [et al.] // *Journal of Neurobiology*. – 2002. – Vol. 50, № 2. – P. 81-92.
496. Sweeting, R. M. Crystalline otoliths in teleosts: comparisons between hatchery and wild coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in the Strait of Georgia / R. M. Sweeting, R. J. Beamish, C. M. Neville // *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. – 2004. – Vol. 14, № 3. – P. 361-369.
497. Synergistic action of nectins and cadherins generates the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium / S. Katsunuma [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 2016. – Vol. 212, № 5. – P. 561-575.
498. Tactical release of a sexually-selected pheromone in a swordtail fish / G. G. Rosenthal [et al.] // *Plos One*. – 2011. – Vol. 6, № 2. – e16994.

499. Takano, K. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization / K. Takano, K. Toyooka, S. Suetsugu // *Embo Journal*. – 2008. – Vol. 27, № 21. – P. 2817-2828.
500. Tan, L. Z. Olfactory sensory neurons transiently express multiple olfactory receptors during development / L. Z. Tan, Q. Li, X. S. Xie // *Molecular Systems Biology*. – 2015. – Vol. 11, № 12. – 844.
501. Test-systems for biomonitoring based on enzyme membrane-bound complexes. I. study of mixed function oxygenases in liver microsomes of endemic fish species from Baikal lake / Y. P. Kozlov [et al.] // *Biologicheskie nauki*. – 1983. – Vol. 1. – P. 20–24.
502. The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain / K. L. Double [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – Vol. 65, № 11. – P. 1669-1682.
503. The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest / H. Katoh [et al.] // *Molecular Brain*. – 2011. – Vol. 4. – 34.
504. The dynamics of precursor cells in the olfactory epithelium of juvenile and adult guinea pigs / Y. Higuchi [et al.] // *European archives of oto-rhino-laryngology*. – 2005. – Vol. 262, № 1. – P. 64-68.
505. The effect of vaterite deposition on sound reception, otolith morphology, and inner ear sensory epithelia in hatchery-reared Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) / D. S. Oxman [et al.] // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 2007. – Vol. 64, № 11. – P. 1469-1478.
506. The elusive crypt olfactory receptor neuron: evidence for its stimulation by amino acids and camp pathway agonists / A. Vielma [et al.] // *Journal of Experimental Biology*. – 2008. – Vol. 211, № 15. – P. 2417-2422.
507. The immunological synapse / S. K. Bromley [et al.] // *Annual Review of Immunology*. – 2001. – Vol. 19. – P. 375-396.
508. The morphological change of supporting cells in the olfactory

- epithelium after bulbectomy / N. Makino [et al.] // *Chemical Senses*. – 2009. – Vol. 34, № 2. – P. 171-179.
509. The nature of selection on the major histocompatibility complex / V. Apanius [et al.] // *Critical Reviews in Immunology*. – 1997. – Vol. 17, № 2. – P. 179-224.
510. The olfactory organ modulates gonadotropin-releasing hormone types and nest-building behavior in the tilapia *Oreochromis niloticus* / H. Uchida [et al.] // *Journal of Neurobiology*. – 2005. – Vol. 65, № 1. – P. 1-11.
511. The polarization of inner ear ciliary bundles from a scorpaeniform fish / J. M. Lovell [et al.] // *Journal of Fish Biology*. – 2005. – Vol. 66, № 3. – P. 836-846.
512. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis / R. M. Kluck [et al.] // *Science*. – 1997. – Vol. 275, № 5303. – P. 1132-1136.
513. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton / A. S. Fanning [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273, № 45. – P. 29745-29753.
514. Thomas, L. *The lives of a cell: notes of a biology watcher* / L. Thomas. – Bantam: Bantam Books, 1974. – P. 88-89.
515. Thommesen, G. Specificity and distribution of receptor-cells in the olfactory mucosa of char (*salmo-alpinus* L) / G. Thommesen // *Acta Physiologica Scandinavica*. – 1982. – Vol. 115, № 1. – P. 47-56.
516. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity / S. Tonegawa // *Nature*. – 1983. – Vol. 302, № 5909. – P. 575-581.
517. Topographic organization of sensory projections to the olfactory-bulb / R. Vassar [et al.] // *Cell*. – 1994. – Vol. 79, № 6. – P. 981-991.
518. Tsai, L. A critical period defined by axon-targeting mechanisms in the murine olfactory bulb / L. Tsai, G. Barnea // *Science*. – 2014. – Vol. 344, № 6180. – P. 197-200.

519. Two classes of outer hair cells along the tonotopic axis of the cochlea / J. Engel [et al.] // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 143, № 3. – P. 837-849.
520. Tyagun, M. L. Otolith shape analysis to discriminate among morpho-ecological groups of Baikal omul (*Coregonus migratorius* Georgi) / M. L. Tyagun, P. N. Anoshko, M. G. Voronov // *Advances in Limnology*. – 2013. – Vol. 64. – P. 109-118.
521. Understanding otolith biomineralization processes: new insights into microscale spatial distribution of organic and mineral fractions from Raman microspectrometry / A. Jolivet [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2008. – Vol. 392, № 3. – P. 551-560.
522. Urbanska, M. Developmental Plasticity of the Dendritic Compartment: Focus on the Cytoskeleton / M. Urbanska, L. Swiech, J. Jaworski // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2012. – Vol. 970. – P. 265-284.
523. Variability in the role of the gasbladder in fish audition / H. Y. Yan [et al.] // *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology*. – 2000. – Vol. 186, № 5. – P. 435-445.
524. Vasconcelos, R. O. Development of Structure and Sensitivity of the Fish Inner Ear / R. O. Vasconcelos, P. W. Alderks, J. A. Sisneros // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2016. – Vol. 877. – P. 291-318.
525. Vasopressin and oxytocin content in cerebrospinal-fluid and in various brain-areas after administration of histamine and pentylenetetrazol / W. B. J. Mens [et al.] // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 1983. – Vol. 19, № 4. – P. 587-591.
526. Vassalli, A. Homeodomain binding motifs modulate the probability of odorant receptor gene choice in transgenic mice / A. Vassalli, P. Feinstein, P. Mombaerts // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2011. – Vol. 46, № 2. – P. 381-396.
527. Wagner, H. J. Sensory brain areas in three families of deep-sea fish

- (slickheads, eels and grenadiers): comparison of mesopelagic and demersal species / H. J. Wagner // *Marine Biology*. – 2002. – Vol. 141, № 5. – P. 807-817.
528. Wahlberg, M. Hearing in fish and their reactions to sounds from offshore wind farms / M. Wahlberg, H. Westerberg // *Marine Ecology Progress Series*. – 2005. – Vol. 288. – P. 295-309.
529. Waring, C. P. Milt and endocrine responses of mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L) parr to water-borne testosterone, 17,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulfate, and the urines from adult female and male salmon / C. P. Waring, A. Moore, A. P. Scott // *General and Comparative Endocrinology*. – 1996. – Vol. 103, № 2. – P. 142-149.
530. Watchler, F. Structural changes in nucleoli during inhibition of protein- and RNA-biosynthesis / F. Watchler, W. Poop, H. G. Schwarzacher // *Cell and tissue research*. – 1987. – Vol. 247, № 3. – P. 583-589.
531. Weeg, M. S. Frequency response properties of lateral line superficial neuromasts in a vocal fish, with evidence for acoustic sensitivity / M. S. Weeg, A. H. Bass // *Journal of Neurophysiology*. – 2002. – Vol. 88, № 3. – P. 1252-1262.
532. Wei, H. Q. Calretinin is expressed in the intermediate cells during olfactory receptor neuron development / H. Q. Wei, M. F. Lang, X. J. Jiang // *Neuroscience letters*. – 2013. – Vol. 542. – P. 42-46.
533. Wesson, D. W. Smelling Sounds: Olfactory-Auditory Sensory Convergence in the Olfactory Tubercle / D. W. Wesson, D. A. Wilson // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30, № 8. – P. 3013-3021.
534. Westerman, R. Regeneration of olfactory paths in carp (*Cyprinus carpio* L.) / R. Westerman, R. V. Baumgarten // *Experientia*. – 1964. – Vol. 20, № 9. – P. 519-520.
535. Weth, F. Nested expression domains for odorant receptors in zebrafish olfactory epithelium / F. Weth, W. Nadler, S. Korsching // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996.

- Vol. 93, № 23. – P. 13321-13326.
536. What can otolith examination tell us about the level of perturbations of Salmonid fish from the Kerguelen Islands? / F. Morat [et al.] // *Ecology of Freshwater Fish*. – 2008. – Vol. 17, № 4. – P. 617-627.
537. Wilson, D. A. Neurobiology of a simple memory / D. A. Wilson, C. Linster // *Journal of Neurophysiology*. – 2008. – Vol. 100, № 1. – P. 2-7.
538. Xue, J. B. Hair bundle heights in the utricle: Differences between macular locations and hair cell types / J. B. Xue, E. H. Peterson // *Journal of Neurophysiology*. – 2006. – Vol. 95, № 1. – P. 171-186.
539. Yakhnenko, V. Response of olfactory receptors and blood cells of Lake Baikal fish to phenol exposure / V. Yakhnenko, I. Klimenkov, N. Pasukhova // *Environmental biotechnology*. – 2010. – Vol. 6, № 2. P. 66-73.
540. Yakhnenko, V. Ultrastructural changes in blood cells in the hematopoietic organs of Lake Baikal fish exposed to phenol / V. Yakhnenko, I. Klimenkov, A. Belyshenko // *Environmental Biotechnology*. – 2014. – Vol. 10, № 2. – 7379.
541. Yamamoto, M. Comparative morphology of fish olfactory epithelium. Perciformes, Beryciformes, Scorpaeniformes and Pleuronectiformes / M. Yamamoto, K. Ueda // *Journal of the Faculty of Science University of Tokyo Section. 4. Zoology*. – 1979. – Vol. 14. – P. 273-297.
542. Yamazaki, K. Genetic basis for MHC-dependent mate choice / K. Yamazaki, G. K. Beauchamp // *Advances in genetics*. – 2007. – Vol. 59. – P. 129-145.
543. Yoshihara, Y. Molecular genetic dissection of the zebrafish olfactory system / Y. Yoshihara // *Results and problems in cell differentiation*. – 2009. Vol. 47. – P. 97-120.
544. Zamzami, N. Apoptosis - condensed matter in cell death / N. Zamzami, G. Kroemer // *Nature*. – 1999. – Vol. 401, № 6749. – P. 127-128.
545. Zebrafish crypt neurons project to a single, identified mediodorsal glomerulus / G. Ahuja [et al.] // *Scientific Reports*. – 2013. – Vol. 3. – 2063.

546. Zhang, W. L. Gonadotropin-releasing hormone modulates voltage-activated sodium current and odor responses in *Necturus maculosus* olfactory sensory neurons / W. L. Zhang, R. J. Delay // *Journal of Neuroscience Research*. – 2007. – Vol. 85, № 8. – P. 1656-1667.
547. Zhao, C. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis / C. Zhao, W. Deng, F. H. Gage // *Cell*. – 2008. – Vol. 132. – P. 645-660.
548. Zufall, F. The cellular and molecular basis of odor adaptation / F. Zufall, T. Leinders-Zufall // *Chemical Senses*. – 2000. – Vol. 25, № 4. – P. 473-481.