

## ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ГИПОКСИИ НА ОБОНЯТЕЛЬНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Безгачева Е.А.<sup>1</sup>, Бигдай Е.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова

ул. Академика Лебедева 6, г. Санкт-Петербург, 94044, РФ

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

Литовская ул., 2, г. Санкт-Петербург, 194100, РФ

Поступила в редакцию 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0611

**Аннотация.** Данная статья посвящена изучению влияния кратковременной гипоксии на обонятельную чувствительность крысы и человека. Влияние кратковременной гипоксии на обонятельную чувствительность человека исследовали посредством выявления порогов обнаружения *n*-бутанола. Было показано, что при уменьшении содержания кислорода во вдыхаемой газовой смеси обонятельная чувствительность снижалась. Как известно, пороги обнаружения одорантов характеризуют функциональное состояние рецепторных клеток. Можно предположить, ослабление их чувствительности может обуславливаться недостатком энергоснабжения процесса обонятельного восприятия в условиях гипоксии. Для проверки этого предположения методом прижизненной люминесцентной микроскопии исследовалось клеточное дыхание обонятельных сенсорных нейронов крыс при стимуляции *n*-бутанолом на модели ротеноновой тканевой гипоксии. Реакцию клеточного дыхания обонятельных сенсорных нейронов оценивали по изменению интенсивности собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН) по методу Б. Чанса. Анализ полученных результатов показал, что в условиях нормоксии стимуляция обонятельных нейронов пахучим раздражителем вызывала повышение интенсивности флуоресценции НАДН, что свидетельствует о накоплении восстановленной формы пиридиннуклеотидов в митохондриях, а, следовательно, об активации клеточного дыхания под действием одорантов. При гипоксии, вызванной ротеноном, повышения интенсивности флуоресценции НАДН под действием *n*-бутанола либо не регистрировалось, либо амплитуда реакции снижалась вдвое. Это означает, что восстановления НАДН под действием одоранта либо совсем не происходило, либо эта реакция на запах была значительно ниже, чем в контроле, что указывает на ослабление клеточного дыхания при гипоксии. Это приводит к уменьшению синтеза АТФ, влияющего на эффективность процесса обонятельной трансдукции и чувствительность обонятельных сенсорных нейронов. Следовательно, на основе полученных результатов можно сделать вывод, что ослабление обонятельной чувствительности у млекопитающих и человека при гипоксии может быть обусловлено ослаблением клеточного дыхания в обонятельных сенсорных нейронах.

**Ключевые слова:** обонятельная чувствительность, обонятельный эпителий, кратковременная гипоксия, одоранты, обонятельные сенсорные нейроны.

Обоняние играет важную роль в жизни человека и животных. Оно информирует о присутствии в окружающей среде полезных и вредных химических соединений, выполняет пищевую, охранительную, ориентировочную функции. В экстремальных условиях обоняние может предупредить об опасностях, поэтому сохранение обонятельной функции необходимо для безопасности и выживания. Обоняние страдает при различных заболеваниях, которые сопровождаются развитием долговременной гипоксии головного мозга [1-7]. Однако исследований влияния кратковременной гипоксии на обонятельную чувствительность недостаточно.

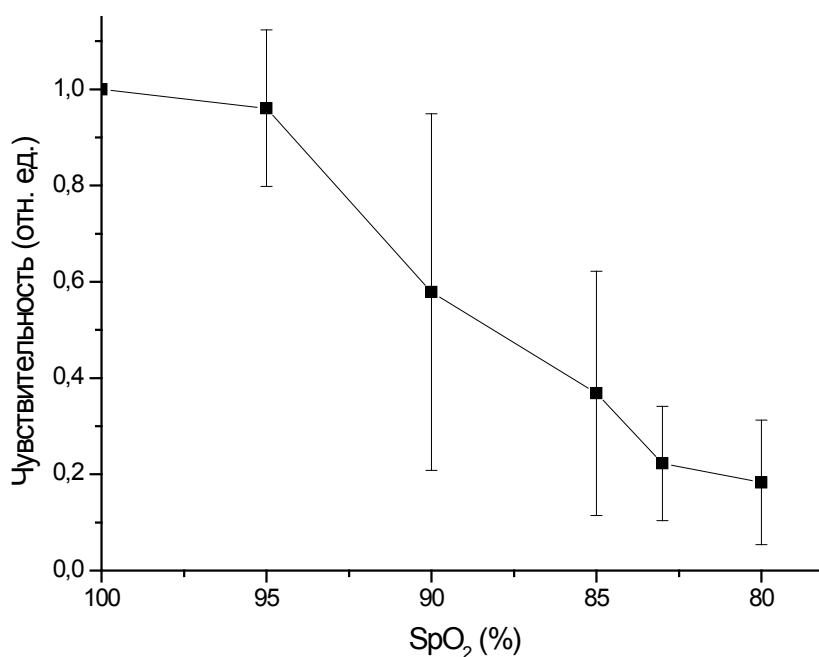
Известно, что обонятельная чувствительность определяется порогом обнаружения одорантов. Повышение ольфакторных порогов свидетельствует об ослаблении остроты обоняния и характеризует ухудшение функции периферического отдела обонятельного анализатора [8].

Поэтому одной из целей настоящей работы являлось исследование влияния кратковременной гипоксии на остроту обоняния у человека.

Исследования проводились в хорошо проветриваемом помещении под контролем врача на 20 добровольцах мужского пола в возрасте 18-20 лет без ЛОР-заболеваний, не устойчивых к гипоксии. Всем участникам испытания запрещалось использовать парфюмерные средства, за 45 минут до начала исследования принимать пищу, курить и пить любую ароматизированную жидкость.

Оценку обонятельного порога проводили с использованием *n*-бутанола [9-11]. Его разбавляли в дистиллированной воде, начиная с концентрации 1 М с каждым последующим трехкратным разведением. Пороговой концентрацией считался одорант с минимальной концентрацией, которую смог обнаружить испытуемый в трех предъявлениях.

Затем исследования повторяли при дыхании гипоксической газовой смесью с концентрацией O<sub>2</sub> 10,5%, которую создавали с помощью дыхательного тренажера «Эверест-2» (ООО «фирма КЛИМБИ», Россия). Время, в течение которого подавался воздух с пониженным содержанием O<sub>2</sub> до предъявления пробирки, определялось



**Рисунок 1.** Зависимость чувствительности обонятельного анализатора к н-бутанолу от уровня сатурации у добровольцев (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение,  $n=17$ )

уровнем кислородного насыщения гемоглобина (SpO<sub>2</sub>), для чего использовали цифровой портативный пульсоксиметр 9843 Nonin (США). Если время падения уровня сатурации до 90% не превышало 5 минут, испытуемого относили к группе не устойчивых к гипоксии, в противном случае участник был отнесен к группе с высокой устойчивостью к гипоксии и не участвовал в исследовании. Состояние гипоксии у испытуемых наступало при SpO<sub>2</sub>=90%. С этого момента начинали этап определения порогов обнаружения обонятельного стимула. Испытание продолжали не более 15 минут.

Как показал анализ полученных результатов, пороги обнаружения обонятельного стимула без индуцирования острой гипоксии отличались у разных испытуемых. Эти различия, вероятно, можно объяснить индивидуальными особенностями восприятия запахов у добровольцев. Поэтому при обработке данных чувствительность при 100% насыщении гемоглобина кислородом (т.е. при SpO<sub>2</sub> = 100%) для всех испытуемых приравнивалась к единице. Нормированные и усредненные результаты изменения обонятельной чувствительности в зависимости от уровня сатурации представлены на рисунке 1.

При дыхании гипоксической газовой смесью обонятельный порог возрастал у 85% испытуемых. При этом в 40% случаях он выявлялся при увеличении пороговой концентрации н-бутанола в 3 раза, ( $n=8$ ), в 40% случаев – в 9 раз ( $n=8$ ) и в 5% ( $n=1$ ) – примерно на 2 порядка. Это свидетельствует о том, что при индуцировании кратковременной гипоксии обонятельная чувствительность снижается, а, следовательно, ухудшается функциональное состояние рецепторного аппарата обонятельного анализатора человека ( $p \leq 0,01$ ).

Перед нами встал вопрос - какой механизм лежит в основе снижения обонятельной чувствительности при уменьшении кислорода во вдыхаемом воздухе.

Можно предположить, что именно рецепторные, а не центральные нейроны в первую очередь будут реагировать на гипоксию, поскольку они подвергаются непосредственному влиянию окружающей среды, минуя кровообращение. Кислород поступает к обонятельным клеткам выстилки, а затем и в митохондрии из обонятельной слизи [12]. Энергообеспечение механизмов обонятельной трансдукции, связанных с обонятельным восприятием, сопряжено с окислительным фосфорилированием, происходящим в митохондриях. Поэтому недостаточное снабжение кислородом, поступающим из обонятельной слизи в условиях гипоксии, возможно, обуславливает ослабление функционального состояния митохондрий обонятельных клеток и снижение клеточного дыхания. Мы предположили, что при острой гипоксии ослабевает синтез макроэргов, что обуславливает нарушение механизмов обонятельной трансдукции, ухудшение функционального состояния обонятельных клеток, чем, вероятно, можно объяснить ослабление обонятельной чувствительности. Поэтому целью нашего исследования стала проверка данной гипотезы на ротеноновой модели гипоксии, где в качестве объекта использовалась обонятельная выстилка крысы.

Исследование проводили на 17 крысах-самцах линии Вистар массой 200-250 г без ЛОР-заболеваний, так как при этом погибает большинство обонятельных клеток. Эксперименты вели в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) по уходу и использованию лабораторных животных. Применение наркоза для проведения исследований на обонятельном эпителии не рекомендуется, поскольку он нарушает функциональное состояние рецепторных обонятельных нейронов. Поэтому животных декапетировали после цервикальной дислокации. Затем готовили препарат обонятельного эпителия. Для этого снимали с головы кожу, удаляли нижнюю челюсть, и отсекали верхние резцы. Далее производили сагиттальный разрез головы строго по

срединной линии, и аккуратно извлекали обонятельную выстилку животного. Готовый препарат закрепляли в специально сконструированном фиксирующем устройстве. Это устройство располагали под объективом микроскопа. Чтобы избежать высыхания препарата, его орошали раствором Рингера для теплокровных следующего состава (в мМ): NaCl – 125,0, KCl – 2,5, MgCl<sub>2</sub> – 1,0, CaCl<sub>2</sub> – 2,5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,3, HEPES – 20,0, D-глюкоза – 15,0 (pH 7,4) при комнатной температуре. Для стимуляции использовали воздушную подачу увлажненных паров n-бутанола в течение 5 секунд. Пахучий стимул направляли в область обонятельного эпителия, в которой регистрировали митохондриальное дыхание.

Для изучения изменений митохондриального дыхания рецепторных клеток обонятельного нейроэпителия в наших экспериментах регистрировали интенсивность собственной флуоресценции восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН) по методу Б. Чанса [13] в модификации В.Н. Карнаухова [14]. Данный метод основан на том, что собственная флуоресценция живых клеток в диапазоне 455-480 нм, возбужденная ультрафиолетовым излучением ( $\lambda = 365$  нм), определяется главным образом свечением восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН). При окислении они теряют способность флуоресцировать. Поскольку в нервной ткани вклад митохондриального пула НАДН в суммарную флуоресценцию в 50 раз больше цитоплазматического [15], а обонятельные клетки являются нейронами, то вероятно можно утверждать, что регистрируемое синее свечение обеспечивается в основном митохондриальным НАДН. Интенсивность собственной флуоресценции НАДН в обонятельных клетках измеряли на установке для флуориметрического анализа, изготовленной на основе люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-38. Если в ответ на стимуляцию одорантом собственная люминесценция НАДН повышалась, это свидетельствовало об активации клеточного дыхания. Пониженная скорость дыхания указывает на снижение способности синтеза АТФ [16].

Так как создать контролируемые условия гипоксии в камере на поверхности препарата при микроскопическом исследовании методически очень сложно (из-за таких факторов, как метаболическая активность клеток, проницаемость для O<sub>2</sub> как омывающей среды, так и полимерных составляющих системы и т.п.), для создания гипоксии в рецепторных клетках обонятельной выстилки мы использовали ротенон (с = 5 мкМ). Он ингибирует клеточное дыхание на начальном этапе переноса электронов по дыхательной цепи, поэтому относится к классу веществ, имитирующих гипоксию в различных тканях [17].

Флуоресценцию НАДН в данной области препарата сначала регистрировали во время стимуляции n-бутанолом. Затем подвергали рецепторный орган обоняния 5-минутному воздействию ротенона, после чего его стимулировали одорантом в той же области препарата. Таким образом, мы сравнивали реакцию периферических обонятельных нейронов на пахучий стимул в условиях нормо- и гипоксии в одной и той же зоне эпителия.

Для оценки достоверности различий параметров реакции НАДН до и после стимуляции применяли парный или независимый двухвыборочный t-тест ( $p = 0,05$ ). Амплитуду реакций уровня флуоресценции НАДН на одорант оценивали по отношению изменения флуоресценции в ответ на подачу стимула ( $\Delta R$ ) к уровню флуоресценции до воздействия одоранта ( $R_0$ ). А для оценки реакции митохондриального дыхания обонятельных клеток на одорант при гипоксии, мы регистрировали изменение интенсивности собственной флуоресценции НАДН в ответ на действие n-бутанола без гипоксии и при ней.

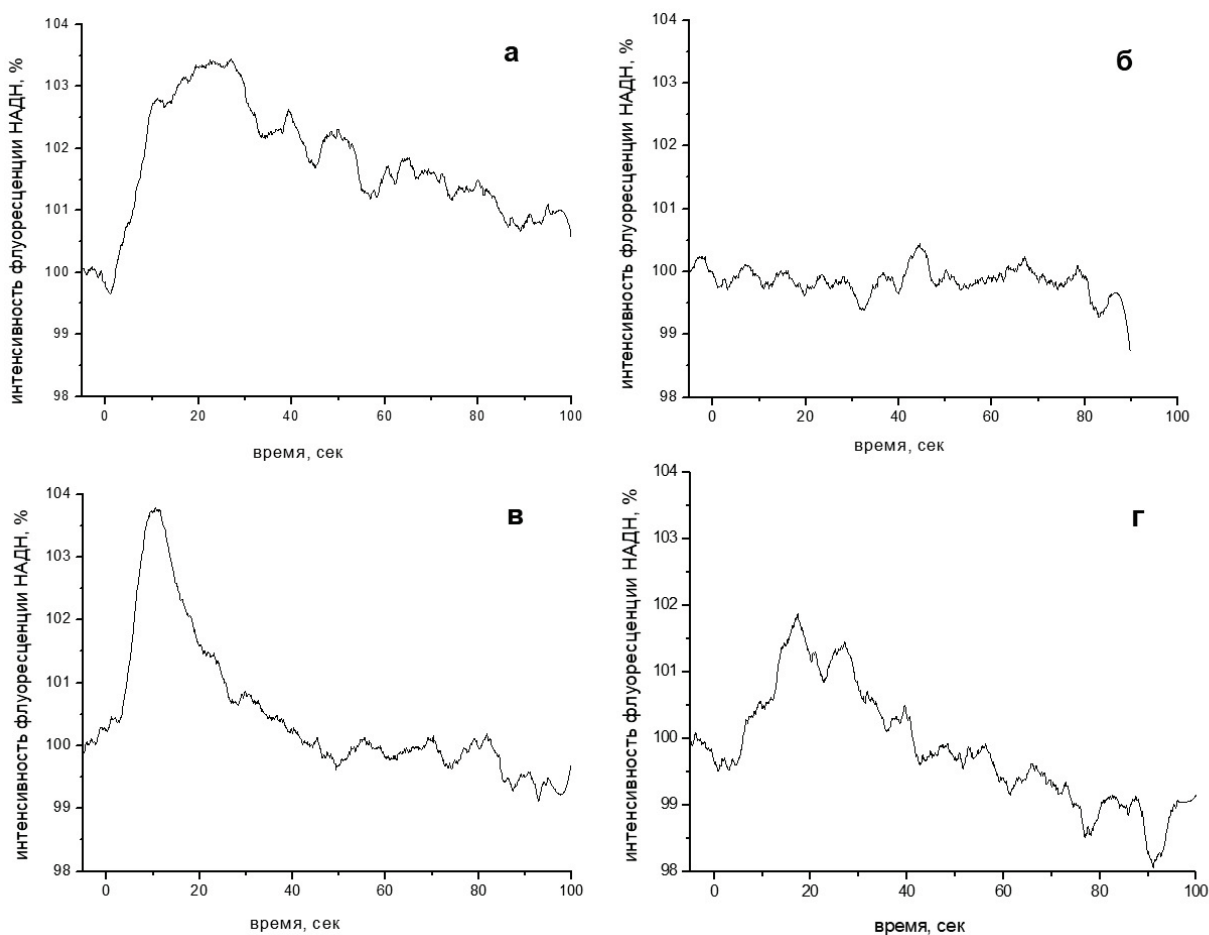
Следует отметить, что из 217 тестируемых областей эпителия только в 99 была получена реакция на стимуляцию n-бутанолом. Такая избирательная чувствительность к одоранту объясняется, вероятно, тем, что в зонах, не реагирующих на раздражитель, не оказалось рецепторных клеток, обонятельные жгутики которых экспрессируют рецепторы на n-бутанол и может свидетельствовать о том, что из всего состава клеток, содержащихся в обонятельном нейроэпителии, реакция на стимул присуща именно рецепторным клеткам.

Результаты эксперимента показали, что в реагирующих на стимул эпителиальных зонах интенсивность флуоресценции НАДН под действием одоранта достоверно увеличивалась (рис. 2а, в), что подтверждалось при нескольких последовательных стимуляциях в одной и той же области. В среднем амплитуда флуоресценции НАДН составляла  $3,1 \pm 0,6\%$  (за 100% был выбран первоначальный уровень флуоресценции). Усиление синего свечения связано с увеличением содержания восстановленных форм пиридиннуклеотидов. Накопление НАДН в митохондриях свидетельствует об активации митохондриального дыхания в обонятельных клетках, инициируемое пахучим стимулом. Эти наблюдения согласуются с исследованиями, проведенными на лягушках [18].

Таким образом, в условиях нормоксии стимуляция обонятельных нейронов пахучим раздражителем вызывала накопление восстановленной формы пиридиннуклеотидов в митохондриях, свидетельствуя об активации клеточного дыхания в активированных нейронах.

Однако необходимо отметить, что обонятельные нейроны нуждаются в достаточном энергоснабжении даже в условиях «покоя», когда на них не оказывается воздействия одорантами. Это связано с тем, что в отсутствие обонятельного раздражителя в обонятельных жгутиках, обеспечивающих процесс ольфакторного восприятия, открыты циклонуклеотид-зависимые каналы, для чего необходимо присутствие в цитозоле цАМФ, синтезируемого из АТФ. Показано, что в условиях «покоя» концентрация цАМФ достигает 300 мкМ, что требует высокого спроса на энергию [19].

Стимуляция запахом вызывает еще более высокие энергетические потребности в обонятельных рецепторных нейронах, которые удовлетворяются посредством активации митохондриального дыхания, инициируемой пахучим стимулом, показанной в наших опытах. Таким образом, действие одоранта инициирует активацию клеточного дыхания, а, следовательно, синтез АТФ, необходимый для обеспечения механизмов обонятельной трансдукции и механической функции обонятельных жгутиков.



**Рисунок 2.** Изменение интенсивности собственной флуоресценции НАДН в обонятельных нейронах крысы в двух разных зонах при стимуляции н-бутанолом до (а, в) и после (б, г) воздействия ротеноном (5мкМ), а, б – в одной зоне; в, г – в другой

В экспериментах с использованием ротенона, т.е. при моделировании гипоксии в нейронах обонятельной выстилки, было обнаружено, что в 10 экспериментах из 13 интенсивность собственной флуоресценции НАДН либо достоверно не изменялась в ответ на одорант (рис. 2 а, в), либо (в 3 оставшихся экспериментах) величина реакции снижалась в два раза по сравнению с результатами обонятельной реакции до ингибирования в растворе ротенона (рис. 2 б, г). Это свидетельствует о том, что в условиях гипоксии, вызванной ротеноном, содержание НАДН либо двукратно сокращалось, либо его концентрация не увеличивалась, указывая на ослабление клеточного дыхания при гипоксии. Поэтому, вероятно, ослабление клеточного дыхания при гипоксии, может обуславливать либо значительное снижение обонятельной чувствительности, либо полную потерю восприятия запаха в обонятельных сенсорных нейронах, чувствительных к гипоксии, поскольку чувствительность обонятельных нейронов регулируется внутриклеточными сигнальными системами, потребляющими АТФ, концентрация которого зависит от активности митохондриального дыхания и падает при гипоксии.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что ослабление обонятельной чувствительности, обнаруженное у человека при кратковременной гипоксии, обусловлено снижением клеточного дыхания в клетках обонятельного эпителия.

#### **Список литературы / References:**

1. Son G. et al. Olfactory neuropathology in Alzheimer's disease: A sign of ongoing neurodegeneration. *BMB reports*, 2021, vol. 54, no. 6, p. 295, doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.6.055.
2. Hawkes C. Olfaction in neurodegenerative disorder. *Taste and Smell*, 2006, vol. 63, pp. 133-151.
3. Hawkes C.H., Shephard B.C. Selective anosmia in Parkinson's disease? *The Lancet*, 1993, vol. 341, no. 8842, pp. 435-436.
4. Peers C., Pearson H.A., Boyle J.P. Hypoxia and Alzheimer's disease. *Essays in biochemistry*, 2007, vol. 43, pp. 153-164.
5. Chen G.J. et al. Transient hypoxia causes Alzheimer-type molecular and biochemical abnormalities in cortical neurons: potential strategies for neuroprotection. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2003, vol. 5, no. 3, pp. 209-228.
6. Zhang X., Le W. Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, 2010, vol. 223, no. 2, pp. 299-303.

7. Saramago I., Franceschi A.M. Olfactory dysfunction in neurodegenerative disease. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 2021, vol. 30, no. 3, pp. 167-172, doi: 10.1097/RMR.0000000000000271.
8. Turetsky B.I., Moberg P.J. An odor-specific threshold deficit implicates abnormal intracellular cyclic AMP signaling in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 2009, vol. 166, no. 2, pp. 226-233.
9. Ruffini R. et al. Adaptation of olfactory threshold at high altitude. *Neurotransmitter Interactions and Cognitive Function*, Springer, Cham, 2014, pp. 19-22.
10. Hummel T. et al. "Sniffin' sticks": olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chemical senses*, 1997, vol. 22, no. 1, pp. 39-52.
11. Cain W.S., Rabin M.D. Comparability of two tests of olfactory functioning. *Chemical Senses*, 1989, vol. 14, no. 4, pp. 479-485.
12. Бигдай Е.В. и др. Изменение напряжения кислорода в обонятельном эпителии крысы при воздействии одорантов. *Биофизика*, 2019, № 4, с. 772-777 [Bigdai E.V. et al. The change in oxygen tension in the olfactory epithelium of the rat when exposed to odorants. *Biophysics*, 2019, no. 4, pp. 772-777 (In Russ.)].
13. Chance B., Connelly C.M. A method for the estimation of the increase in concentration of adenosine diphosphate in muscle sarcosomes following a contraction. *Nature*, 1957, vol. 179, no. 4572, pp. 1235-1237.
14. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. Наука, 1978 [Karnaukhov V.N. *Luminescent spectral analysis of a cell*. Science, 1978 (In Russ.)].
15. Doane M.J. *J. Gen. Physiol.*, 1967, vol. 50, 2603 p.
16. Divakaruni A.S. et al. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods in enzymology*, Academic Press, 2014, vol. 547, pp. 309-354.
17. Archer S., Michelakis E. The mechanism (s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O<sub>2</sub> sensors, and controversies. *Physiology*, 2002, vol. 17, no. 4, pp. 131-137.
18. Бигдай Е.В. и др. Влияние одорантов на митохондриальное дыхание обонятельных клеток. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*, 2004, т. 11, № 1, с. 29 [Bigdai E.V. et al. The effect of odorants on mitochondrial respiration of olfactory cells. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2004, vol. 11, no. 1, p. 29 (In Russ.)].
19. Yu C.R. et al. Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*, 2004, vol. 42, no. 4, pp. 553-566.

## POSSIBLE MECHANISM OF INFLUENCE OF SHORT-TERM HYPOXIA ON OLFACTORY SENSITIVITY

Bezgacheva E.A.<sup>1</sup>, Bigdaj E.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The Kirov Military Medical Academy. S.M. Kirov  
*Akademika Lebedeva str. 6, St. Petersburg, 94044, Russia*

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State Pediatric Medical University  
*Litovskaya St., 2, Saint-Petersburg, 194100, Russia*

Received 18.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0611

**Abstract.** The article is focused on the effect of short-term hypoxia on the olfactory sensitivity. The effect of short-term hypoxia on the olfactory sensitivity in human and rats were studied by determination thresholds for n-butanol. We have shown that reduced oxygen partial pressure leads to reduction of olfactory sensitivity. As known, odorant detection thresholds characterize the functional state of receptor cells. It can be assumed that the weakening of their sensitivity may be caused by a lack of energy supply to the olfactory perception process in hypoxia. To test this hypothesis, we stimulated rat olfactory sensory neurons with n-butanol in rotenone model. The reaction of cellular respiration of olfactory sensory neurons was evaluated by changing the intensity of intrinsic fluorescence of reduced pyridine nucleotides (NADH) according to the B. Chance method. Analysis of the results showed that under normoxia, stimulation of olfactory neurons by odorant caused an increase in the intensity of NADH fluorescence, which indicates the accumulation of the reduced form of pyridine nucleotides in mitochondria, and, consequently, the activation of cellular respiration due to exposure to odorant. In hypoxia caused by rotenone, an increase in the induced change of fluorescence of NADH was either not registered or the amplitude of the reaction was halved. This means that the recovery of NADH due to the odorant either did not occur at all, or this reaction to the smell was significantly lower than with normoxia, which indicates a weakening of cellular respiration during hypoxia. This is the reason for the decrease in ATP synthesis, which affects the efficiency of the olfactory transduction process and the sensitivity of olfactory sensory neurons. Therefore, based on our results, it can be concluded that the weakening of olfactory sensitivity in rats and humans with hypoxia may be due to a weakening of cellular respiration in olfactory sensory neurons.

**Key words:** olfactory sensitivity, olfactory epithelium, short-term hypoxia, odorants, olfactory sensory neuron.