



Н. К. Блинова, к.б.н., доцент

Технологический институт Восточноукраинского национального университета имени Владимира Даля,
Северодонецк, Украина

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ТРАВЯНОЙ КРЕВЕТКИ К ПИЩЕВЫМ АТТРАКТАНТАМ

Электрофизиологическим методом исследована чувствительность хеморецепторов антеннул травяной креветки *Pandalus kessleri* к 5 азотсодержащим органическим веществам – аминам и пиридинам в концентрациях от 10^{-9} до 10^{-5} М. Пороговая концентрация аминов и пиридинов составила 10^{-7} М. Максимальные реакции обонятельных рецепторов вызывали растворы с молярной концентрацией 10^{-5} - 10^{-6} . Ответы хеморецепторов практически на все предъявляемые концентрации аминов и пиридинов были ниже, чем на естественный пищевой раздражитель.

Ключевые слова: травяная креветка, хеморецепция, антеннулы, обонятельные рецепторы, пищевой раздражитель, амины, пиридины.

Информацию о химическом окружении, наличии пищевых объектов морские животные получают благодаря хеморецепции. Хеморецепторы покрывают практически всё тело десятиногих ракообразных, но максимально они сосредоточены на антеннах, антеннулах, ротовых придатках и конечностях. В осуществлении пищевых реакций хеморецепторам различных придатков отводится различная функциональная роль. Рецепторы антеннул из-за низких порогов чувствительности к химическим веществам считают дистантными (обонятельными), рецепторы ротовых придатков и ног – высокопороговыми, контактными (вкусовыми) [4, 13]. Поэтому при формировании пищевого поведения обонятельные рецепторы важны во время поиска пищи, а вкусовые рецепторы на более поздних этапах – при осознании и захвате пищевых частиц [8, 12]. Среди химических раздражителей, вызывающих пищевые рефлексы, у ракообразных достаточно хорошо изучены такие вещества как аминокислоты, и в меньшей степени, амины и их производные [9, 13].

Органами обоняния у десятиногих ракообразных являются антеннулы, с расположенными на них специализированными чувствительными щетинками – эстетасками. К настоящему времени имеются довольно обширные сведения по морфологии эстетасков многих видов декапод [10, 14]. Описаны и особенности строения обонятельных рецепторов травяной креветки *Pandalus kessleri* [1].

Целью настоящей работы явилось исследование функциональных особенностей обонятельных рецепторов травяной креветки по чувствительности к пяти азотсодержащим веществам: аминам и пиридинам.

Материал и методы. Объект исследования – травяная креветка *Pandalus kessleri* Czerniavski, 1878 (Decapoda, Pandalidae). Исследования проводили на половозрелых особях *P. kessleri* размером 100 – 140 мм, обитающих в заливе Петра Великого Японского моря. Животных отлавливали и содержали в аквариумах при температуре около 20°C.

Чувствительность обонятельных рецепторов к пищевым раздражителям изучали элек-

трофизиологическим методом. Суммарную электрическую активность регистрировали от нерва антеннулы. Для этого использовали внеклеточное униполярное отведение хлорсеребряными макроэлектродами с диаметром около 100 мкм. Животных крепили в ванночке с проточной морской водой вентральной стороной вниз. Одну из антеннул фиксировали неподвижно на горизонтальном препаровальном столике. Средняя часть наружного жгута антеннулы с эстетасками омывалась исследуемым раствором. Антеннулярный нерв, освобождённый от мышечной ткани, набрасывали на крючкообразный рабочий электрод. Индифферентный электрод крепился рядом. Сигналы поступали на усилитель биопотенциалов УБП 2-03 с коэффициентом усиления $1,6 \times 10^4$, и далее на самописец Н-2030.

В качестве пищевых раздражителей использовали пиридин, пиперидин, метиламин, триметиламин, дифениламин в концентрациях от 1×10^{-9} до 1×10^{-5} М. Контрольным раствором служила вода из аквариума, в котором находилось несколько особей терпуга четырехлинейного. Терпуг является потенциальным пищевым объектом травяной креветки, а вода, содержащая метаболиты и феромоны терпуга, представляет собой естественный пищевой раздражитель с явно выраженным аттрактивным свойством.

Регистрация суммарной электрической активности производилась в течение 2 мин. Интервал между стимуляциями также составлял 2 мин. После каждой стимуляции жгут антеннулы с эстетасками отмывали очищенной от механических примесей морской водой. Результат оценивали по разности между импульсной активностью в реакции на раздражитель (Ир) и фоновой активностью (Иф).

Всего исследовано 25 животных. Статистическую обработку данных проводили по методу двухфакторного дисперсионного анализа с применением F-критерия Фишера [2].

Результаты. Суммарную электрическую активность нерва антеннулы травяной

креветки регистрировали после стимуляции хеморецепторов наружного жгута испытуемыми растворами азотсодержащих органических веществ (рис. 1).

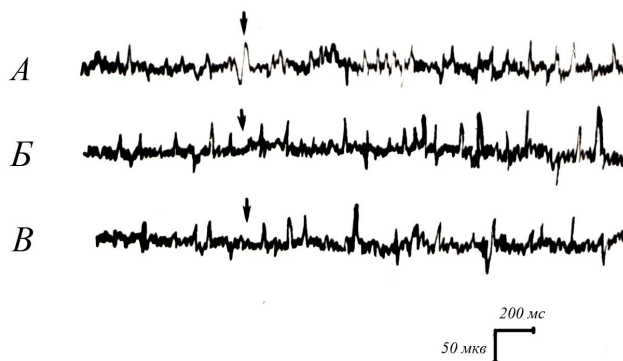


Рис. 1 Электрофизиологические ответы обонятельных рецепторов травяной креветки на контрольный раствор (А), пиридин 10^{-5} М (Б) и дифениламин 10^{-5} М (В)

Fig. 1 Electrophysiological responses of olfactory receptors grass shrimp on the control solution (A), pyridine 10^{-5} (B) and diphenylamine 10^{-5} (B)

Фоновая частота импульсной активности рецепторов составляла от 0.5 до 35 имп/с. Амплитуда 20 – 40 мкВ. При стимуляции рецепторов частота импульсации увеличивалась до 100 имп/с, амплитуда до 80 мкВ. Латентные периоды и длительность реакции обонятельных рецепторов специально не изучались, однако можно сказать, что антеннулярный нерв составляют аксоны сенсорных нейронов, реагирующих и по фазному, и по тоническому типу. Продолжительность реакции на пищевой раздражитель составляла 30 с. Связь между предъявляемыми тестируемыми веществами и характером импульсации не обнаружена. Величину ответа оценивали только по разности между импульсной активностью в реакции на раздражитель (Ир) и фоновой активностью (Иф). Амплитуда суммарной импульсной активности (Ир – Иф) после подачи контрольного раствора составляла в среднем 21 мкВ.

При раздражении эстетасков наружного жгута антеннулы растворами исследуемых аминов и пиридинов наблюдали различные по

интенсивности ответы (рис. 2).

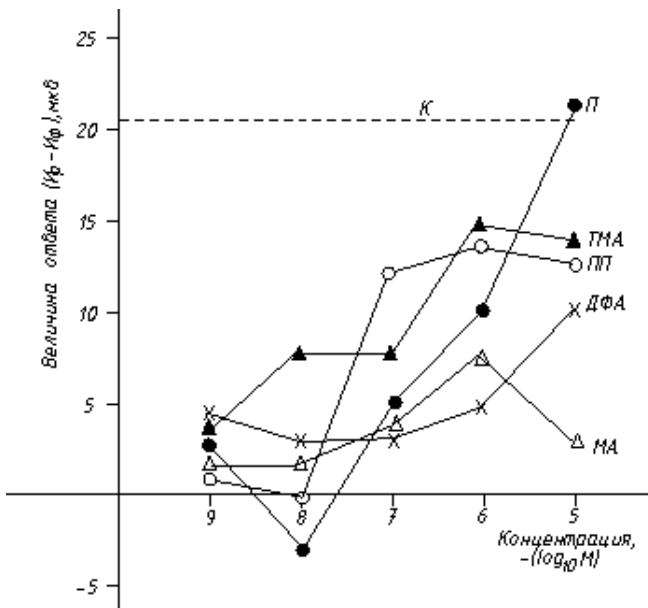


Рис. 2 Изменение величины электрофизиологического ответа хеморецепторов антеннулы травяной креветки на растворы аминов и пиридинов. Обозначения: МА – метиламин, ДФА – дифениламин, ТМА – триметиламин, П – пиридин, ПП – пиперидин ($P < 0.05$)

Fig. 2 Change the value of the electrophysiological response of chemoreceptors antennula grass shrimp on the solutions of amines and pyridines: МА – methylamine, DPA – diphenylamine, TMA – trimethylamine, P – pyridine, PP – piperidine (Note: $P < 0.05$)

Амплитуда импульсной активности в основном возрастала с увеличением концентрации тестируемых веществ. Воздействие растворами с минимальной концентрацией 10^{-9} М, 10^{-8} М незначительно изменяло амплитуду электрической импульсации нерва антеннулы по сравнению с фоном: разность ($I_p - I_f$) не превышала 5 мкВ. Пороговая концентрация аминов и пиридинов составила 10^{-7} М. Величина ответа на триметиламин возрастала каждый раз ступенчато при повышении концентрации на один порядок, достигнув пика в точке, соответствующей 10^{-6} М. Для остальных веществ такую строгую зависимость не удалось зарегистрировать. При подаче растворов в концентрации 10^{-8} М наблюдали снижение амплитуды импульсной активности, которая в случае с пиридином и пиперидином была даже ниже фоновой активности ($I_p < I_f$) на 2 – 3 Морський екологічний журнал, № 4, Т. VIII, 2009

мкВ. Различие между концентрациями по результатам дисперсионного анализа статистически значимо ($P \leq 0.05$). Максимальная амплитуда импульсации для пиперидина и метиламина также как и для триметиламина, отмечена при концентрации 10^{-6} М. Растворы этих веществ в концентрации 10^{-5} М приводили к снижению ответа. Пиридин и дифениламин в концентрации 10^{-5} М инициировали самую высокую импульсацию ответов.

Благодаря электрофизиологическим исследованиям, получены сведения о чувствительности хеморецепторов антеннул травяной креветки к аминам и пиридинам. Указанные вещества, так же как и аминокислоты, несут информацию о потенциальных пищевых объектах ракообразных [7]. Пороговые концентрации изученных аминов и пиридинов для обонятельных рецепторов *Pandalus kessleri* составили 10^{-7} М, лишь для триметиламина эта концентрация была равна 10^{-8} М. При воздействии тестируемых веществ в данных концентрациях амплитуда суммарной импульсной активности нерва начинала превышать уровень спонтанной активности. Наибольшую активность обонятельных рецепторов вызвал пиридин в концентрации 10^{-5} М: разность ($I_p - I_f$) составила при этом 23.2 мкВ, что свидетельствует о его высокой стимулирующей способности. По интенсивности ответа исследованные вещества можно расположить в следующий ряд: пиридин 10^{-5} М > триметиламин 10^{-6} М > пиперидин 10^{-5} М > дифениламин 10^{-5} М > метиламин 10^{-6} М. Концентрации аминов и пиридинов 10^{-6} М, 10^{-5} М оказались наиболее эффективными для обонятельных рецепторов креветки. Молярные концентрации растворов 10^{-9} М, 10^{-8} М лишь незначительно изменяли электрическую активность нерва; отклонение амплитуды импульсации ограничивались единицами микровольт. Согласно данным эксперимента, чёткая прямолинейная зависимость «концентрация – величина ответа» не наблюдалась. Кривые зависимости для метиламина, триметиламина, пиперидина достигают пиковой точки и снижаются. Внешний вид

полученных кривых напоминает колоколовидную форму.

Следует отметить, что реакция хеморецепторов антеннул травяной креветки на все концентрации аминов и пиридинов (за исключением раствора пиридина 10^{-5} М) была ниже, чем на естественный пищевой раздражитель.

Обсуждение. Как известно, хеморецепторные структуры ракообразных характеризуются широким диапазоном чувствительности к различным химическим веществам, высокой скоростью ответа (иногда несколько миллисекунд), и узкой специфичностью отдельных рецепторов. Хемосенсорные клетки с широким спектром реакции имеют низкую степень специфичности, и наоборот [3]. Например, хеморецепторы с широким спектром ответов на аминокислоты могут не реагировать на амины или пиридины, которые являются стимулирующими для других рецепторов [5]. Такая специфичность обонятельных рецепторов обусловлена, возможно, наличием большого числа нейронов, иннервирующих эстетаск и огромным количеством сенсорных единиц, образующих сложные рецептивные поля. У травяной креветки эстетаск иннервируют около ста сенсорных нейронов [1].

Суммарная электрическая активность хемочувствительных нейронов при стимуляции антенн, антеннул, ротовых придатков и конечностей ракообразных описана многими исследователями [3, 15]. На антеннулах омара *Panulirus japonicus* зарегистрированы тонические и фазические типы реакций хеморецепторов на адекватные раздражители [15]. Латентные периоды реакции хемочувствительных нейронов тонического типа составляют от 15 до 300 мс: максимум частоты достигается через 2 – 3 с после нанесения стимула и может сохраняться очень долго – до 20 с [16]. Латентные периоды реакций рецепторов фазического типа составляют от 10 до 60 мс при длительности реакции 1 – 3 с. При стимуляции обонятельных рецепторов травяной креветки контрольным раствором («настой» терпуга как естественный пищевой раздражитель) реакция

в некоторых случаях длилась до 30 с, что, видимо, обусловлено ответами нейронов тонического типа. Обычно у ракообразных нейроны, реагирующие на химические раздражители, по тоническому типу преобладают над нейронами, реагирующими по фазическому типу [15, 16]. Фазный компонент частоты в ответе антеннулярных хеморецепторов инициируется высокими концентрациями стимула (для аминокислот более 10^{-4} М), низкие концентрации веществ (менее 10^{-4} М для аминокислот) инициируют тонический ответ [3].

Пороговые концентрации изученных аминов и пиридинов для обонятельных рецепторов *Pandalus kessleri* составили 10^{-7} М – 10^{-8} М. Это говорит о достаточно высокой чувствительности к исследуемым веществам. Для хеморецепторов антеннул омара *Homarus americanus* электрофизиологическим методом показано, что пороговые концентрации для ряда аминокислот и аминов (глицин, таурин, гидрокси-L-пролин) оказались близкими по значению 10^{-6} М – 10^{-7} М [13]. Изучена реакция ходильных ног омара к L-глутамату, L-пролину, L-аспартату, L-аргинину, L-ланину, таурину, бетаину [7]. Пороги для этих веществ находились в пределах 3.5×10^{-6} М – 3.5×10^{-14} М.

Небольшие изменения электрофизиологического ответа травяной креветки на растворы аминов и пиридинов 10^{-9} М, 10^{-8} М (исключая триметиламин 10^{-8} М) можно объяснить тем, что указанные концентрации могут постоянно находиться в морской воде и означать для животных фоновый уровень. В естественной среде хеморецепторы адаптированы к фоновым уровням веществ и отвечают только на концентрации, превышающие их [7].

Оптимальными значениями концентраций аминов и пиридинов при исследовании чувствительности хеморецепторов антеннул травяной креветки оказались концентрации 10^{-6} М, 10^{-5} М. Ряд предпочтительности веществ для обонятельных рецепторов имеет вид: пиридин 10^{-5} М > триметиламин 10^{-6} М > пиперидин 10^{-5} М > дифениламин 10^{-5} М > метиламин 10^{-6} М. Согласно данным литературы, Морський екологічний журнал, № 4, Т. VIII, 2009

концентрационные оптимумы азотсодержащих веществ как хемостимуляторов определены в большей степени для хеморецепторов ходильных ног ракообразных. На ходильных ножках двух видов ракообразных (*Orconectes limosus* и *Austropotamobius torrentium*) обнаружены хеморецепторы, чувствительные к аналогам пиридина, но не реагирующие на аминокислоты и амины [5]. Среди 79 аналогов и близких пиридину веществ для хеморецепторов ног наиболее значимыми оказались такие как 3-ацетил-пиридин и никотинамид в концентрациях от 10^{-6} М до 4×10^{-4} М [11]. Традиционно хеморецепторы ходильных ног десятиногих ракообразных характеризуют как менее чувствительные, однако, исходя из представленных выше данных, можно отметить, что пороговые и оптимальные концентрации раздражителей соответствуют тем же порядкам, что и для антеннулярных рецепторов.

Согласно данным эксперимента, чёткая прямолинейная зависимость «концентрация – величина ответа» не наблюдалась. Кривые зависимости для метиламина, триметиламина, пиперидина достигают пиковой точки и снижаются. Внешний вид полученных кривых напоминает колоколовидную форму. Такую же форму имела графическая зависимость интенсивности пищевой реакции креветки *Palaemonetes pugio* от концентрации смесей аминокислот и бетаина [6]. При изучении ответов антеннулярных хеморецепторов пяти видов десятиногих ракообразных на L-глутаминовую кислоту, таурин и γ -аминомаслянную кислоту в концентрациях от 10^{-13} М до 10^{-2} М было определено, что интенсивность ответа увели-

чивалась в линейной зависимости от логарифма концентрации стимула [9].

Реакции обонятельных рецепторов травяной креветки практически на все амины и пиридины, за исключением раствора пиридина 10^{-5} М, была ниже, чем на естественный пищевой раздражитель. Это согласуется с данными [12] о наибольшей привлекательности для омара *Homarus americanus* естественных экстрактов и настоев пищевых объектов, в сравнении с отдельными аминами и аминокислотами.

Следует отметить, что окончательно вопрос об адекватности того или иного стимула может быть определён при условии, если каждое из тестируемых веществ электрофизиологическим методом будет запускать цепочку пищевых рефлексов животных.

Выводы. Исследованные нами амины и пиридины по интенсивности электрофизиологического ответа, по степени аттрактивности для травяной креветки *Pandalus kessleri* можно расположить в следующий ряд: пиридин 10^{-5} М > триметиламин 10^{-6} М > пиперидин 10^{-6} М > дифениламин 10^{-5} М > метиламин 10^{-6} М. Реакции хеморецепторов на все концентрации аминов и пиридинов (за исключением раствора пиридина 10^{-5} М) были ниже, чем на естественный пищевой раздражитель. Полученные результаты дополняют физиолого-экологические аспекты жизнедеятельности травяной креветки *Pandalus kessleri* и могут иметь практическое значение, так как данный вид является промышленным и перспективным для марикультуры.

1. Блинова Н. К. Морфологические особенности обонятельной системы травяной креветки *Pandalus kessleri* (Decapoda, Pandalidae) // Вестн. зоол. – 2008. – 42, №1. – С. 57 - 62.
2. Маркова Е. В., Лисенков А. Н. Планирование эксперимента в условиях неоднородности. – М: Наука, 1973. – 219с.
3. Ache B. W. Chemoreception and thermoreception // Biology of Crustacea. – New York: Acad. Press. – 1982. – 3. – P. 396 – 398.
4. Atema J. Functional separation of smell and taste in fish and crustacea (Proc. VI International Symposium in Olfaction and Taste, Paris, 1977) – London: Inform. Retrieval, 1977. – P. 165 – 174.
5. Bauer U., Hatt H. Demonstration of three different types of chemosensitive units in the crayfish claw using computerized evaluation // Neurosci Lett. – 1980. – 17. – P. 209 – 214.

6. Carr W. E. S., Gurin S. Chemoreception in the shrimp *Palaemonetes pugio* // Biol. Bull. – 1975. – **148**, №3. – P. 380 – 392.
7. Derby C. D., Atema J. Chemosensitivity of walking legs of the lobsters *Homarus americanus*: neurophysiological response spectrum thresholds // J. Exp. Biol. – 1982. – **98**. – P. 303 – 315.
8. Derby C. D., Steullet P., Horner A. J., Cate H. S. The sensory basis of feeding behavior in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus* // Mar. Freshwater Res. – 2001. – **52**. – P. 1339 – 1350
9. Fuzesseri Z. M., Childress J. J. Comparative chemosensitivity to amino acids and their role in the feeding activity of bathypelagic and littoral Crustaceans // Biol. Bull. – 1975. – **149**. – P. 522 – 538.
10. Ghiradella H., Case J. F., Cronshaw J. Fine structure of the aesthetasc hairs of *Pagurus hirsutiussculus* Dana // Protoplasma. – 1968. – **66**, №1-2. – P. 1 – 20.
11. Hatt H., Schmiedel-Jakob I. Electrophysiological studies of pyridine-sensitive units on the crayfish walking leg. 1. Characteristics of stimulatory molecules // J. Comp. Physiol. – 1984. – **154**. – P. 855 – 863.
12. McLeese D. W. Olfactory response of lobsters *Homarus americanus* to solution from basic species and to seawater extracts and chemical fraction of fish muscles and effects of antennule ablation // Mar. Behav. Physiol. – 1974. – **2**, №3. – P. 239 – 249.
13. Shephard P. Chemoreception in the antennule of the lobsters *Homarus americanus* // Mar. Behav. Physiol. – 1974. – **2**, №3. – P. 261 – 273.
14. Steullet P., Cate H. S., Michel W. C., Derby C. D. Functional units of a compound nose: aesthetasc sensilla house similar populations of olfactory receptor neurons on the crustacean antennule // J. Comp. Neurol. – 2000. – **418**. – P. 270 – 280.
15. Tazaki K., Shigenega Y., Chemoreception in the antenna of the lobster *Panulirus japonicus* // Comp. Biochem. Physiol. – 1974. – **47**, № 1. – P. 195 – 199.
16. Wyse G. A. receptor organization and function in *Limulus chelae* // Physiologie. – 1971. – **73**. – P. 249 – 273.

Поступила 02 февраля 2009 г.
После доработки 15 октября 2009 г.

Чутливість нюхових рецепторів трав'яної креветки до харчових атрактантів. Н. К. Блинова. Електрофізіологічним методом досліджена чутливість хеморецепторів антенул трав'яної креветки до 5 органічних речовин, що містять азот – амінів та піридинів у концентраціях від 10^{-9} до 10^{-5} М. Порогова концентрація амінів та піридинів складала 10^{-7} М. Максимальні реакції нюхових рецепторів викликали розчини з молярною концентрацією 10^{-5} - 10^{-6} . Відповіді хеморецепторів практично на всі пред'явлені концентрації амінів та піридинів були нижче, ніж на природний харчовий подразник.

Ключові слова: трав'яна креветка, хеморецепція, антенули, нюхові рецептори, харчовий подразник, аміни, піридини

Sensitivity of olfactory receptors in the grass shrimp for feeding attractants. N. K. Blinova. Sensitivity of antennular chemoreceptors of the grass shrimp for 5 nitric containing organic matters – amines and pyridines at concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-5} M has been studied by electrophysiological method. The threshold concentration for amines and pyridines was 10^{-7} M. The maximum response of olfactory receptors was solutions to the molar concentration 10^{-5} - 10^{-6} . Responses of chemoreceptors for all of tested concentrations for amines and pyridines were lower than for natural food stimulus.

Key words: grass shrimp, chemoreception, antennules, olfactory receptors, feeding irritant, amines, pyridines