

На правах рукописи

КОРНИЕНКО

Михаил Сергеевич

**Структурно-функциональная характеристика ионоцитов
жабр и почки некоторых видов рыб
при изменении солености окружающей среды**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток - 2008

Работа выполнена в Институте биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Максимович Александр Александрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Вараксин Анатолий Алексеевич
кандидат биологических наук, доцент
Рыбалкина Светлана Михайловна

Ведущая организация: Институт эволюционной физиологии и биохимии
имени И.М. Сеченова РАН

Защита состоится «27» марта 2008 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета Д.005.008.01 при Институте биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: (4232) 310-905, факс: (4232) 310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17). Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «___» февраля 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Работа посвящена проблеме морфогенеза клеток в процессе адаптации животных к изменению условий окружающей среды. Костистые рыбы – это самая многочисленная в систематическом плане и самая разнообразная в экологическом отношении группа среди позвоночных животных. Они населяют как пресные, так и морские водоемы. Некоторые эвригалинные виды в своем жизненном цикле в ходе миграций из рек в море несколько раз сталкиваются с изменением солености среды обитания. При этом успех адаптации зависит от способности рыб перестраивать свой водно-солевой обмен с гипоосмотического типа регуляции на гиперосмотический тип или обратно. Клеточные и молекулярные механизмы, обеспечивающие смену типа осморегуляции рыб, до сих пор остаются до конца неясными.

Существует довольно большое число работ, посвященных данной проблеме, однако в мировой практике такие исследования выполнены лишь на небольшом числе модельных объектов, таких как виды родов *Salmo*, *Oncorhynchus*, *Tilapia*. Вместе с тем, единичные работы, осуществленные на других видах, зачастую сопровождаются интересными результатами и выводами.

В заливе Петра Великого Японского моря обитает большое число эвригалинных видов рыб. Чтобы проследить изменения в осморегулирующей системе, происходящие при смене типа осморегуляции, как у проходных рыб, так и у эвригалинных, были выбраны три вида рыб: дальневосточная красноперка, восьмилнейный терпуг и рыба-игла. Рыба-игла была включена в этот список как интересный объект, у которого постоянство ионного состава необходимо обеспечивать не только в организме, но и внутри выводковой сумки, где находятся икринки с развивающимися эмбрионами.

Цель работы – исследование структурно-функциональных механизмов адаптации эвригалинных видов рыб к воде различной солености. Задачи исследования:

- изучить особенности ультраструктурного строения хлоридных клеток жаберного эпителия у дальневосточной красноперки, восьмилнейного терпуга и рыбы-иглы;

- выявить особенности ультраструктурного строения клеток почечных канальцев у дальневосточной красноперки и рыбы-иглы;

- проследить структурно-функциональные изменения клеток жаберного эпителия и почечных канальцев при изменении солености окружающей среды.

Научная новизна. Впервые выполнены исследования изменений, происходящих в ионоцитах (хлоридных клетках жаберного эпителия и клетках почечных канальцев) при изменении солености окружающей среды у видов *Tribolodon brandti* (сем. Cyprinidae), *Hexagrammos octogrammus* (сем. Hexagrammidae) и *Syngnathus acusimilis* (сем. Syngnathidae). Изучены механизмы осморегуляции дальневосточной красноперки в ходе нерестовых, зимовальных и нагульных миграций. Впервые показано, что высокая степень эвригалинности некоторых видов рыб прибрежно-эстуарного комплекса обусловлена постоянным наличием на протяжении всего жизненного цикла в их жаберном эпителии ионоцитов пресноводного и морского типа.

Практическое значение. Результаты проведенного исследования расширяют представления о механизмах адаптации костистых рыб к изменению солености окружающей среды. Результаты работы могут быть использованы в рыбоводстве для разработки рекомендаций по определению оптимальных сроков перевода выращиваемой молодежи эвригалинных рыб в морскую воду, а также в курсах лекций по гистологии, цитологии и физиологии животных для студентов биологических специальностей ВУЗов.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на конференции молодых ученых Научно-образовательного центра ДВГУ «Морская биота» (Владивосток, 2002), на I Съезде физиологов стран СНГ (Сочи, 2005), на ежегодных научных конференциях Института биологии моря в 2006 и 2007 годах, на заседаниях семинара по морфологии, физиологии и биохимии Института биологии моря и семинара Лаборатории физиологии ИБМ. Работа была выполнена при поддержке гранта ДВО РАН (2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 работы, в том числе 2 статьи в журналах из списка рекомендуемого ВАК; одна статья принята в печать.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 114 страницах и состоит из введения, четырех основных глав, списка литературы, включающего 135 названий (из них 127 иностранных авторов), и 69 рисунков (схемы и электронно-микроскопические фотографии).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Соленость внутренней среды рыб составляет примерно одну треть от солености морской воды. Поэтому в морской воде происходит диффузия ионов в организм, а в пресной, наоборот, из организма во внешнюю среду. Чтобы компенсировать эти явления, в морской воде рыбам необходимо выделять ионы, а в пресной – адсорбировать. Если у высших позвоночных основным осморегулирующим органом являются почки, то у рыб осморегулирующие функции выполняют почки, кишечник и жабры, причем ведущая роль в осморегуляции принадлежит именно жабрам (Evans, 1993).

Хлоридные клетки – это один из наиболее хорошо исследованных типов клеток жаберного эпителия рыб, именно они отвечают за обмен ионов (Pisam, Rambourg, 1991; Jurss, Bastrop, 1995; Perry, 1997; Evans et al., 1999). У рыб адаптированных к морской воде в жаберном эпителии присутствуют хлоридные

клетки морского типа и вспомогательные клетки. Эти два типа клеток формируют многоклеточные комплексы в эпителии филамента. У рыб, адаптированных к пресной воде, различают два типа собственно хлоридных клеток, это α -хлоридные клетки (бледно-окрашенные удлиненные клетки, расположенные у основания ламеллы в близком контакте с кровеносными капиллярами) и β -хлоридные клетки (более темные, яйцевидной формы клетки, расположенные в межламеллярной области эпителия филаментов). Вспомогательные клетки у рыб, адаптированных к пресной воде, отсутствуют.

У эвригалинных видов и мигрирующих видов, обитающих преимущественно в пресной воде, при переносе в морскую воду α -хлоридные клетки трансформируются в морские хлоридные клетки, появляются вспомогательные клетки и начинается формирование многоклеточных комплексов. Повышается проницаемость межклеточных контактов. β -хлоридные клетки дегенерируют путем апоптоза. Зачастую эти процессы сопровождаются увеличением жаберной Na^+, K^+ -АТФ-азной активности (Sasai et al., 1998; Uchida et al., 1996, 2000; Lin, Hwang, 2004). При переносе рыб из морской воды в пресную наблюдаются обратные процессы (Katoh, Kaneko, 2003; Lima, Kültz, 2004; Fielder et al., 2007).

Почка позвоночных животных построена по единому принципу: структуры, обеспечивающие процесс ультрафильтрации, соединены с системой канальцев, обеспечивающих реабсорбцию большинства компонентов профильтрованной жидкости и секрецию ряда веществ в мочу. Почки рыбы, как и почки низших позвоночных, не приспособлены для поддержания гомеостаза (Nickman, Trump, 1969).

Материал и методы

Работа была выполнена на биологической станции «Восток» и в аквариальной Института биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН. Объектом исследования служили неполовозрелые особи дальневосточной

красноперки *Tribolodon brandti* Dybowski, 1872, взрослые особи восьмилинейного терпуга *Hexagrammos octogrammus* Pallas, 1810 и взрослые самцы рыбы-иглы *Syngnathus acusimilis* Günther, 1873 .

Дальневосточная красноперка была отловлена в конце мая ставным неводом в заливе Петра Великого Японского моря. Соленость воды в месте отлова составляла 21‰. Всего в работе было использовано 20 особей дальневосточной красноперки. Через 2 недели после адаптации к аквариальным условиям в воде соленостью 23‰, 15 рыб пересадили в пресную воду. Через 1 сутки после пересадки у 5 рыб взяли образцы тканей. Рыбы, адаптированные к аквариальным условиям, служили контролем. Оставшихся 10 рыб содержали в пресной воде в течение 70 суток. Затем 5 рыб снова пересадили в морскую воду. Через 1 сутки у них и у контрольных рыб из пресной воды взяли пробы крови и образцы тканей для электронно-микроскопических исследований. Для сравнения была взята кровь у *T. brandti*, отловленных в заливе Петра Великого и в реке Раздольная. Образцы тканей от 5 экземпляров в каждой точке эксперимента брали независимо от пола.

Терпуги *H. octogrammus* были выловлены с помощью ловушки в прибрежной зоне залива Восток на глубине около 1 м, где соленость воды в это время составляла 10‰. Для адаптации к аквариальным условиям и полносоленой морской воде 62 особи восьмилинейного терпуга выдерживали в течение 10 дней в аэрируемых бассейнах с проточной морской водой, соленость которой была 32‰. После адаптации к полносоленой морской воде две группы рыб пересадили в разбавленную морскую воду соленостью 10‰. Через трое суток адаптации к воде соленостью 10‰ вторую группу рыб перевели в воду соленостью 3‰. Третью группу подвергли прямому переносу из морской воды в пресную. Оставшиеся в морской воде 5 рыб послужили контролем.

Рыба-игла была отловлена неводом в начале июня в заливе Восток

Японского моря. Соленость воды в месте отлова составляла 28‰. После семи суток адаптации к аквариальным условиям и морской воде соленостью 32 ‰ по 5 рыб были пересажены в воду соленостью 22‰, 12‰, 5‰ и в пресную воду. *S. acusimilis* содержались в аквариумах объемом 100 л с аэрируемой и фильтруемой водой. Через 7 суток после пересадки в разведенную морскую воду по 5 рыб из каждого аквариума были использованы для взятия образцов тканей. Рыбы из морской воды служили контролем. Всего в работе было использовано 25 особей рыбы-иглы.

У всех трех видов были взяты образцы ткани жаберного эпителия, кроме того, у дальневосточной красноперки и рыбы-иглы для электронно-микроскопического исследования были взяты образцы ткани почки. Уровень натрия в сыворотке крови у *H. octogrammus* определяли через 1, 6, 12, 24 и 72 ч, у *T. brandti* только через 24 ч. У рыбы-иглы не удалось измерить концентрацию ионов в сыворотке крови из-за малого объема крови.

Для исследований, связанных со сканирующей микроскопией ткани жаберного эпителия исследуемых рыб были обезвожены путём пропускания через батарею спиртов и ацетонов, подвергнуты напылению, а затем просмотрены и сфотографированы с помощью сканирующего микроскопа Leo 430.

Для ультраструктурных исследований кусочки ткани фиксировали в охлажденном (4°C) 2%-ном растворе глутаральдегида-параформальдегида на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4) с добавлением NaCl в соответствии с соленостью среды, в которой содержался образец. После чего дофиксировали в 1%-ном растворе четырехокси осмия при той же температуре в течение 1 ч. Материал контрастировали в 2%-ном спиртовом растворе уранилацетата, дегидратировали по общепринятой методике и заливали в смесь эпон 812-аралдит.

Обзорные препараты получали путем изготовления полутонких (1 мкм) срезов с блоков, залитых для электронной микроскопии. Срезы окрашивали метиленовым синим, а затем просматривали под световым микроскопом «Olimpus» или «Polyvar».

Ультратонкие срезы, приготовленные на ультратоме «Reichert Ultracut E», после дополнительного контрастирования цитратом свинца просматривали и фотографировали на трансмиссионных электронных микроскопах «JEM-100B» и «JEM-100S».

Кровь собирали в пробирку путем каудэктомии. После свертывания крови, сыворотку отбирали пипеткой и разводили в 50 раз бидистиллированной водой. Концентрацию ионов натрия в пробах определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Nippon Gargal Ash, модель AA 855.

Результаты

В ходе проведенных экспериментов особи дальневосточной красноперки прекрасно адаптировались как к пресной, так и к морской воде и сохраняли активность на протяжении всего эксперимента.

У восьмилнейного терпуга, помещенного в воду соленостью 10‰, в течение всего срока эксперимента (72 ч) выживаемость составила 100%. К концу третьих суток эксперимента все рыбы оставались активными. Во второй группе, переведенной в воду соленостью 3‰ после предварительной успешной адаптации к воде 10‰, состояние рыб было хорошим в течение первых 6 ч. Все рыбы были подвижны и активно брали корм. Через 12 ч экспозиции состояние рыб заметно ухудшилось, но все рыбы были живы. Через 24 ч экспозиции смертность составила 38%. В третьей группе рыб, пересаженных в пресную воду сразу из морской воды (32‰), период 50% смертности составил 5 ч.

Выживаемость рыбы-иглы в воде соленостью 32‰, 22‰, 12‰ и 5‰ в течение семи суток эксперимента составила 100%. В течение всего времени рыбы оставались подвижными, оборонительные реакции были в норме, что

свидетельствует об удовлетворительном физиологическом состоянии. У рыбы-иглы, пересаженной в пресную воду, период 50% смертности составил 0.5 ч. 100% смертность морской иглы в пресной воде наблюдалась в течение одного часа.

У красноперки, адаптированной к морской воде хлоридные клетки располагались как у основания жаберных ламелл, так и в межламеллярном районе. В жаберном эпителии представлены несколько типов хлоридных клеток: светлые хлоридные клетки, темные хлоридные клетки, а также вспомогательные клетки.

Митохондрии, тубулярная система и эндоплазматический ретикулум занимают весь объем цитоплазмы хлоридных клеток, за исключением узкой апикальной зоны. Тубулярная система представлена плотной сетью микроскопических трубочек, тесно связанных между собой, с постоянным диаметром 35–40 нм. Микротрубочки примерно равной длины, соединяясь между собой, образуют сеть, состоящую из 5- и 6-гранных ячеек. В базальной и латеральных областях зрелых хлоридных клеток обнаружены многочисленные слияния трубочек тубулярной системы с плазматической мембраной клетки. Эндоплазматический ретикулум, развит гораздо меньше. Его трубочки более широкие, длинные, прямые и менее разветвленные. Аппарат Гольджи находится в околоядерной области. Апикальная мембрана клетки формирует микрогребни и микроворсинки.

Иногда в эпителии жаберных филламентов встречаются комплексы хлоридных клеток, состоящие из 2–4 клеток. В апикальной зоне клетки комплексов соединены между собой короткими высокопроницаемыми контактами, тогда как с соседними респираторными клетками хлоридные клетки соединяются плотными межклеточными контактами.

Таблица 1.

Концентрация ионов натрия в сыворотке крови у дальневосточной красноперки *Tribolodon brandti* в разных условиях обитания.

Концентрация ионов Na ⁺ , ммоль/л						
Время после пересадки	Пересадка из морской воды в пресную (аквариальная)	Пересадка из пресной воды в морскую (аквариальная)	Амурский залив	Устье р. Раздольная	р. Раздольная (перед нерестом)	р. Раздольная (после нереста)
0 ч	190 ± 6	139 ± 4	188±5	196±3	143±6	134±4
24 ч	154 ± 4	150 ± 5				

Таблица 2.

Динамика концентрации ионов натрия в сыворотке крови у восьмилнейного терпуга *Hexagrammos octogrammus* при пересадке в пресную и разбавленную морскую воду (ммоль/л)

Время экспозиции	Концентрация ионов Na ⁺ , ммоль/л			
	Морская вода	10‰	3‰	Пресная вода
0 ч	173.4 ± 1.4	173.4 ± 1.4	147.0 ± 3.9	173.4 ± 1.4
1 ч		167.0 ± 3.7	142.5 ± 4.0	148.3 ± 5.6
6 ч		157.0 ± 3.9	135.8 ± 4.6	91.0 ± 2.9
12 ч		151.5 ± 3.1	126.5 ± 7.7	
24 ч		147.3 ± 5.3	93.6 ± 2.6	
72 ч		147.0 ± 3.9		

Концентрация ионов натрия в сыворотке крови дальневосточной красноперки, адаптированной к морской воде, равнялась 190 ± 6 ммоль/л (табл. 1).

Через сутки после переноса красноперки из морской воды в пресную общее количество хлоридных клеток незначительно снизилось. Строение зрелых хлоридных клеток почти не изменилось, но они в большей степени, чем в контроле были прикрыты респираторными клетками. В верхних клеточных слоях появились апоптирующие клетки, иногда в соседстве с макрофагами. В более глубоких клеточных слоях первичного эпителия активизировались процессы пролиферации и дифференцировки клеток.

В сыворотке крови *T. brandti*, пересаженных в пресную воду, наблюдалось существенное снижение концентрации ионов Na^+ с 190 ± 6 до 154 ± 4 ммоль/л (табл. 1).

После 70 дней адаптации к пресной воде количество хлоридных клеток в эпителии жаберных филламентов дальневосточной красноперки снизилось. По сравнению с морским контролем почти в два раза уменьшился относительный объем тубулярной системы и митохондрий. Тубулярная система зрелых светлых хлоридных клеток имела вид типичный для пресноводных рыб: более тонкие, длинные и мало ветвящиеся трубочки. Количество митохондрий уменьшилось. Они стали тоньше и длиннее.

В верхнем слое первичного эпителия по-прежнему встречались крупные светлые и темные хлоридные клетки, рядом с которыми были отмечены вспомогательные клетки.

Концентрация ионов Na^+ в сыворотке крови дальневосточной красноперки, адаптированной к пресной воде, снизилась до 139 ± 4 ммоль/л, что составило 73% от морского значения (табл. 1).

Через 24 часа после переноса *T. brandti* из пресной воды в морскую, общее количество хлоридных клеток несколько увеличилось по сравнению с

пресноводным контролем. Возросло количество митохондрий, увеличился просвет трубочек тубулярной системы. В цитоплазме темных хлоридных клеток активизировался шероховатый эндоплазматический ретикулум, значительно увеличилось количество свободных рибосом. В глубоких клеточных слоях первичного эпителия появилось множество малодифференцированных клеток.

Концентрация ионов Na^+ в сыворотке крови рыб, пересаженных из пресной воды в морскую, через 24 часа увеличилась до 150 ± 5 ммоль/л (табл. 1).

В жаберном эпителии восьмилинейного терпуга *H. octogrammus* адаптированного к морской воде отмечены слизистые клетки, покровные клетки, малодифференцированные клетки, хлоридные и вспомогательные клетки. Хлоридные клетки представлены только одним, так называемым «морским», типом и образуют комплексы со вспомогательными клетками. В комплекс объединяются 1-2 крупные зрелые хлоридные клетки и 2–3 вспомогательные клетки. Клетки концентрируются в межламеллярном пространстве и у основания ламелл. Ядра хлоридных клеток правильной формы, хроматин умеренно конденсированный. По всей цитоплазме располагаются многочисленные митохондрии, с узкими, плоскими и плотно упакованными кристами, в темном матриксе митохондрий отмечены электронно-плотные гранулы. Тубулярный ретикулум формирует густую, обильно разветвленную систему, состоящую из прямых трубочек постоянного диаметра (40–50 нм), среди которых располагаются все органеллы клетки. Шероховатый эндоплазматический ретикулум развит преимущественно в околоядерной зоне. Апикальная мембрана хлоридных клеток, образующих многоклеточные комплексы, формирует короткие микроворсинки. Часть хлоридных клеток расположенных на поверхности филаментов прикрыта отростками респираторных клеток.

Концентрация ионов Na^+ в сыворотке крови восьмилинейного терпуга, адаптированного к морской воде составила 173.4 ± 1.4 ммоль/л (табл. 2).

Через 24 часа после пересадки в воду соленостью 10‰ общая топография жаберного эпителия оставалась практически такой же, как и у рыб в морской воде. У некоторых хлоридных клеток уменьшилась электронная плотность ядер. В апикальных районах хлоридных клеток появились многочисленные везикулы с электронно-плотным содержимым. На апикальной поверхности хлоридных клеток образовались складки. Количество элементов тубулярного ретикулума и митохондрий уменьшилось, снизилась и плотность митохондриального матрикса. В некоторых хлоридных клетках наблюдалось набухание тубулярного ретикулума. Канальцы становились менее разветвленными, их диаметр увеличился в несколько раз. Повсюду в цитоплазме наблюдались свободные рибосомы.

В течение первых 6 часов в сыворотке крови *H. octogrammus* наблюдалось снижение уровня ионов Na^+ . К 12 часам экспозиции концентрация ионов Na^+ стабилизировалась и в дальнейшем оставалась на постоянном уровне 85-87% по сравнению с контролем. После 72 часов содержания в воде с соленостью 10‰ среднее значение уровня Na^+ в крови восьмилнейного терпуга составило 147.0 ± 3.9 ммоль/л (табл. 2).

У рыб, проведенных 24 часа в воде соленостью 3‰ общая топография жаберного эпителия по сравнению с предыдущим периодом значительно изменилась. Активизировались слизистые клетки. Появились многочисленные картины отслаивания клеток. Тубулярная система почти всех хлоридных клеток вакуолизировалась, матрикс митохондрий плотный, размеры и форма митохондрий не изменились. Гораздо чаще, чем в предыдущей группе, встречались картины разных стадий физиологической гибели клеток.

После пересадки из морской воды в воду соленостью 3‰ в течение первых 6 часов резких изменений концентрации ионов Na^+ в крови восьмилнейного терпуга не произошло. Среднее значение уровня Na^+ снизилось на 8%. Однако в дальнейшем стабилизации уровня ионов в крови

H. octogrammus не наблюдалось. К 24 часам экспозиции уровень Na^+ достоверно снизился до 64% (93.6 ± 2.6 ммоль/л) по сравнению с контролем (табл. 2).

В жаберном эпителии рыб, содержащихся в пресной воде, через 6 часов значительно активизировались слизистые клетки. Отмечалась вакуолизация респираторных клеток. Хлоридные клетки также были угнетены.

В митохондриях хлоридных клеток видны признаки деструкции. Количество митохондрий несколько уменьшилось. В некоторых клетках видны группы лизосом и деструктурированных митохондрий. Плотность и строение тубулярной сети существенно не изменились. В цитоплазме присутствуют свободные рибосомы. Значительно чаще, чем у рыб в олигогалинной и мезогалинной воде, встречаются клетки с признаками лизиса. Наблюдаются многочисленные картины некротического разрушения клеток.

Концентрация ионов Na^+ в крови восьмилнейного терпуга значительно снизилась уже через 1 час после пересадки в пресную воду и по сравнению с контролем составила 85%. Через 6 часов уровень Na^+ упал до 52% (91.0 ± 2.9 ммоль/л) (табл. 2).

В жаберном эпителии рыбы-иглы присутствует только один тип хлоридных клеток – «морской». Эти крупные округлые клетки локализованы в межламеллярных районах филаментарного эпителия и, в меньшей степени, на ламеллах. У *S. acusimilis*, адаптированных к воде соленостью 32 ‰, 22 ‰, 12 ‰ и 5 ‰, хлоридные клетки не различались по своей ультраструктуре. Строение этих клеток было типичным для рыб, обитающих в морской воде. Контактующие между собой зрелые хлоридные клетки связаны в апикальной области высокопроницаемыми межклеточными контактами.

В цитоплазме хлоридных клеток рыбы-иглы наблюдалось множество митохондрий и хорошо развитая тубулярная система. В узкой зоне, примыкающей к клеточной мембране, тубулы настолько плотно упакованы, что

занимают практически всю цитоплазму. В базальной и латеральной части клетки тубулы сливаются с плазмолеммой.

У рыбы-иглы, также как и у дальневосточной красноперки, (адаптированной как к пресной, так и к морской воде) общее строение почки и ультраструктура клеток нефрона, в целом, одинаковы. Различаются они количеством и относительным объемом органелл, в основном митохондрий и складок базальной мембраны.

Как и большинства костистых рыб, у исследуемых видов почка гломерулярная. Вслед за капсулой Боумена следует щечный сегмент нефрона. Клетки щечного сегмента снабжены длинными ресничками, которые создают дополнительный напор жидкости в канальце. Особенностью этого отдела является большое количество секреторных клеток.

Щечный сегмент переходит в проксимальный сегмент нефрона. Клетки этого сегмента представляют собой пирамидальный эпителий со щеточной каймой и ядром, расположенным в базальной части клетки. Как и в щечном отделе, часть клеток канальца выполняет секреторную функцию. Однако в этом участке нефрона секреторных клеток меньше, чем в щечном отделе, и количество их уменьшается по направлению к концу канальца. Эпителиальные клетки проксимального канальца отличает присутствие щеточной каемки. Цитоплазма клеток мало насыщена митохондриями и лизосомами. Клетки канальца имеют трапециевидную или цилиндрическую форму. Высота клеток проксимального канальца 18–28 мкм. Клетки имеют приблизительно одинаковую по высоте щеточную кайму (3–3.5 мкм). Под щеточной каймой располагается так называемая зона эндоцитоза. Это поверхностный участок цитоплазмы, заполненный инвагинациями плазматической мембраны у основания микроворсинок.

Ядра клеток крупные, овальной формы, находятся преимущественно в базальной части клетки. В них имеется одно или два ядрышка с нечеткими контурами. Основная масса митохондрий локализована в базолатеральной области, рядом с ядром. В базальной части клетки имеется большое количество складок плазматической мембраны. Иногда эти складки образуют петли вокруг митохондрий.

Небольшой отрезок канальца, следующий непосредственно за шейным отделом, образован клетками высотой около 20 мкм со слабо развитой невысокой щеточной каймой, широкие микроворсинки которой располагаются разреженно и имеют длину порядка 1 мкм. Для таких клеток также характерна относительно небольшая зона эндоцитоза. Эти клетки сменяются наиболее высокими клетками канальца (25–28 мкм), которые отличаются густой щеточной каймой, образованной узкими, плотно расположенными микроворсинками и хорошо развитой зоной эндоцитоза. За ними следуют клетки высотой 20–25 мкм, с небольшой и часто едва различимой зоной эндоцитоза.

На поверхности цилиндрических клеток дистального канальца, высота которых также 20–25 мкм, практически нет микроворсинок. Цитоплазма этих клеток богата мелкими вакуолями с прозрачным содержимым и насыщена гранулами гликогена, что придает ей значительную электронную плотность. От основания клетки к ее свободной поверхности, вокруг ядра, обтекая его, проходят параллельные ряды складок плазматической мембраны. Как правило, в базальной области эти складки переходят в плазматическую мембрану клеток. Между складками плазматической мембраны располагаются многочисленные удлиненные митохондрии, имеющие большое количество крист и электронно-плотный матрикс, свободным остается только апикальный участок цитоплазмы.

Изменения в ультраструктуре клеток проксимальных канальцев, связанные с нахождением рыбы в опресненной воде, состояли в уменьшении

количества митохондрий и в снижении электронной плотности их матрикса. Длина большинства митохондрий уменьшилась, но их расположение в клетке практически не изменилось, наибольшая их концентрация по-прежнему наблюдается в базальной части клетки. Одновременно отмечается уменьшение длины и количества складок базальной мембраны, контактирующих с митохондриями.

Обсуждение результатов

В проведенных нами экспериментах выживаемость трех исследованных видов в воде соленостью 5 ‰ и выше в течение всего времени эксперимента составила 100%, что свидетельствует об успешной адаптации рыб к мезогалинной воде. Динамика концентрации ионов в крови восьмилнейного терпуга также подтверждает этот факт. При помещении *H. octogrammus* и *S. acusimilis* в воду меньшей солености наблюдалась гибель рыб и только дальневосточная красноперка *T. brandti* успешно адаптировалась как к морской, так и к пресной воде.

Общая морфология жаберного аппарата и ультраструктура хлоридных клеток у исследованных видов не отличались от описанных ранее. Однако если у восьмилнейного терпуга и рыбы-иглы присутствовал только один тип хлоридных клеток, что характерно для морских рыб, то у дальневосточной красноперки, адаптированной к морской воде, было обнаружено два типа хлоридных клеток, различающихся электронной плотностью цитоплазмы и морфологически схожих с α - и β -хлоридными клетками пресноводных рыб. Помимо этих двух типов хлоридных клеток присутствовали и вспомогательные клетки, которые сохранялись и у красноперок, адаптированных к пресной воде. Вероятно, именно сохранение всех клеточных типов, как в пресной, так и в морской воде, обеспечивает успех адаптации красноперок к резкому изменению солености среды.

Через сутки после переноса дальневосточной красноперки из морской воды в пресную значительных изменений в ультраструктуре хлоридных клеток не наблюдалось, это говорит о том, что ее клеткам не требуется значительной перестройки для смены типа осморегуляции. По прошествии семидесяти суток наблюдались более явные изменения ультраструктуры. Тубулярная система зрелых светлых хлоридных клеток имела вид типичный для пресноводных рыб: трубочки стали более тонкими, длинными и менее ветвящимися. Количество митохондрий уменьшилось, они также стали тоньше и длиннее. Эти изменения служат индикатором того, что при долговременной адаптации происходит замена уже имевшихся в эпителии жабр хлоридных клеток, которые при смене среды обитания рыбы только меняли свой тип осморегуляции, на новые клетки, изначально приспособленные к другому типу осморегуляции.

В наших экспериментах концентрация ионов Na^+ в крови дальневосточной красноперки, адаптированной к морской воде, соответствовала концентрации Na^+ в крови рыб, отловленных в Амурском заливе (190 ± 6 ммол/л). У рыб, проведенных 70 суток в аквариуме с пресной водой, концентрация ионов совпадала с концентрацией у рыб, отловленных в р. Раздольная, и составила 139 ± 4 ммол/л (табл.1). Через 24 часа после переноса из морской воды в пресную и наоборот у рыб наблюдалась примерно одинаковая концентрация Na^+ – 150–155 ммоль/л. Согласно литературным данным, к этому времени концентрация ионов должна стабилизироваться на постоянном уровне, в нашем эксперименте этого не произошло, следовательно, можно говорить о том, что клетки, сменившие тип осморегуляции, справляются с поддержанием ионного баланса хуже, чем клетки, изначально приспособленные к данному типу осморегуляции.

Изменения, происходящие в жаберном эпителии восьмилнейного терпуга при смене солёности окружающей среды являются скорее следствием

физиологического стресса. Уже при переносе *H. octogrammus* из морской воды в воду соленостью 10‰ в хлоридных клетках его жаберного эпителия увеличивалось число лизосом, расширялось перинуклеарное пространство и межмембранное пространство. При пересадке в воду соленостью 3‰ изменения, связанные с попыткой перехода к гиперосмотической регуляции, были наиболее выражены. Совпадение этих признаков с признаками, описанными в литературе и характеризующими адаптации к изменению солености у других эвригалинных видов, говорит об универсальности механизмов реакции на изменение солености окружающей среды в первые часы стресса. Однако эти изменения не приводят к появлению в жаберном эпителии клеток, характерных для пресноводных рыб.

В случае прямого переноса терпуга из морской воды в пресную физиологический стресс намного превышал тот, что имел место при постепенном переносе сначала в мезогалинную, а затем в олигогалинную воду. Наблюдалось большое количество гибнущих клеток.

Стабилизация концентрации ионов Na^+ в крови восьмилнейного терпуга наблюдалась только при перемещении в воду соленостью 10‰. Момент стабилизации концентрации наступил через 24 часа после пересадки, что соответствует литературным данным по другим видам рыб. При пересадке в воду меньшей солености концентрация ионов Na^+ в крови не стабилизировалась, а постепенно снижалась, и при уменьшении концентрации ионов Na^+ в два раза наблюдалась гибель рыб. Период 50% смертности при перемещении терпуга из морской воды в пресную составил 5 ч.

У рыбы-иглы при изменении солености среды обитания также не наблюдалось изменений в ультраструктуре хлоридных клеток, однако это вызвано скорее ее полной неспособностью к смене типа осморегуляции. При прямом переносе в пресную воду все рыбы гибли в течение часа. Столь малый срок 100% смертности в сравнении с восьмилнейным терпугом обусловлен,

во-первых, меньшими размерами рыбы иглы и, соответственно, меньшим объемом крови, а во-вторых, тем, что хлоридные клетки терпуга, вероятно, оказались более лабильными и, хотя и не завершили смену типа осморегуляции, все же были эффективнее в условиях пресной воды, чем неизменные хлоридные клетки рыбы-иглы.

В связи с тем, что у восьмилнейного терпуга и рыбы-иглы хлоридные клетки не в состоянии справиться с сильными изменениями солености окружающей среды, в жаберном эпителии присутствует большое количество слизистых клеток, которые активируются при изменении солености, обеспечивая жаберному эпителию дополнительную защиту на некоторый промежуток времени. У дальневосточной красноперки число слизистых клеток не столь велико.

Исследования ультраструктуры почек дальневосточной красноперки и рыбы-иглы показали, что изменения, происходящие в них при изменении солености среды, незначительны. Это в первую очередь уменьшение количества и размеров митохондрий в клетках почечных канальцев, вызванное снижением энергозатрат на реабсорбцию воды. Полученные нами результаты подтверждают литературные данные о незначительности роли почки в осморегуляции рыб.

Выводы

1. Эвригалинные виды рыб имеют различные стратегии адаптации к изменению солености воды. Активная стратегия дальневосточной красноперки *Tribolodon brandti* направлена на смену типа осморегуляции с гипоосмотического на гиперосмотический тип или наоборот. Это обеспечивает высокую степень эвригалинности рыб, позволяя им неоднократно мигрировать из моря в реки и обратно. При этом в жаберном эпителии появляются новые типы хлоридных клеток. Пассивная стратегия

физиологической адаптации у менее эвригалинных видов – восьмилинейного терпуга *Hexagrammos octogrammus* и рыбы-иглы *Syngnathus acusimilis* направлена на снижение ионной проницаемости эпителиев, при этом не происходит смены типа осморегуляции.

2. Впервые показано, что высокая степень эвригалинности дальневосточной красноперки *Tribolodon brandti* обусловлена постоянным наличием на протяжении всего жизненного цикла в их жаберном эпителии хлоридных клеток, как морского, так и пресноводного типов. В зависимости от солености окружающей среды активизируется тот или иной тип хлоридных клеток, что позволяет этому виду успешно адаптироваться к резким изменениям солености.
3. Эвригалинные виды рыб прибрежно-эстуарного комплекса восьмилинейный терпуг *Hexagrammos octogrammus* и рыба-игла *Syngnathus acusimilis* переносят длительное опреснение воды, но не способны полностью адаптироваться к пресной воде. Сохранение ионного гомеостаза у этих рыб в опресненной воде обеспечивается в первую очередь за счет снижения ионной проницаемости жаберного эпителия путем соответствующих изменений ультраструктуры хлоридных клеток морского типа и активизации слизистых клеток. Хлоридные клетки пресноводного типа у них не формируются.
4. Почечные каналцы играют второстепенную роль в осморегуляции эвригалинных рыб. Это подтверждается незначительными ультраструктурными изменениями нефронов в процессе адаптации рыб к существенным изменениям солености окружающей среды.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Серков В.М., Корниенко М.С. Структура и функция хлоридных клеток жаберного эпителия у восьмилинейного терпуга *Hexagrammos octogrammus*

Pallas (Scorpaeniformes, Hexagrammidae) при изменении солености среды // Материалы конференции студентов, аспирантов и молодых ученых НОЦ ДВГУ «Морская биота», Владивосток (1-2 октября 2002) г. Владивосток: изд-во ДВГУ. 2002. С. 36–37.

2. Серков В.М., Корниенко М.С. Динамика концентрации ионов натрия и кальция в крови у восьмилнейного терпуга *Hexagrammos octogrammus* Pallas (Scorpaeniformes, Hexagrammidae) при изменении солености среды // Вопросы ихтиологии. 2003. Т. 43, № 1. С. 134–36.

3. Серков В.М., Корниенко М.С. Структурные и функциональные особенности хлоридных клеток жаберного эпителия дальневосточной красноперки *Trybolodon brandti* (сем. Cyprinidae), адаптированных к воде различной солености // Научные труды I Съезда физиологов стран СНГ, Сочи, Дагомыс (18–23 сентября 2005 г.) М.: Медицина-здоровье 2005. С. 97.

4. Серков В.М., Корниенко М.С., Колобов В.А. Структурно-функциональная характеристика жаберного эпителия и выводковой камеры рыбы-иглы *Syngnathus acusimilis* (Syngnathidae Gasterosteiformes) при изменении солености воды // Вопросы ихтиологии. 2007. Т. 47, № 6. С. 794–798.

КОРНИЕНКО
МИХАИЛ СЕРГЕЕВИЧ

**Структурно-функциональная характеристика ионоцитов
жабр и почек некоторых видов рыб
при изменении солености окружающей среды**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук