

06
И-71

**ФИЗИОЛОГИЯ
БИОХИМИЯ
И
ТОКСИКОЛОГИЯ
ПРЕСНОВОДНЫХ
ЖИВОТНЫХ**



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД
ТРУДЫ, ВЫП. 57 (60)

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ ПРЕСНОВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ответственный редактор
Б. А. ФЛЕРОВ



ЛЕНИНГРАД
„НАУКА”
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
1990

Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. - Л.: Наука, 1990. - 144 с.

Сборник содержит оригинальные и обзорные статьи по вопросам физиологии, биохимии и токсикологии пресноводных животных. Анализируются процессы ионной регуляции, рассматриваются холинэстеразы и их роль в жизнедеятельности рыб, использование коллагена для оценки действия токсических веществ и инстинктивное поведение ручейков в условиях загрязнения среды. Одна из статей посвящена функциональной морфологии жаберного эпителия рыб.

Для гидробиологов, физиологов, водных токсикологов, студентов и аспирантов биологических факультетов вузов.

Ответственный редактор Б.А. ФЛЕРОВ

Рецензенты Б.И. КУПЕРМАН, М.И. ШАТУНОВСКИЙ

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ
ПРЕСНОВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Труды, вып. 57(60)

Утверждено к печати
Институтом биологии внутренних вод
Академии наук СССР

Редакторы издательства Т.Л. Ломакина,
Л.И. Сметанкина
Художник Л.А. Яценко
Технический редактор М.Л. Гофман
Корректоры Л.Я. Комм, К.С. Фридлянд

ИБ № 44055

Подписано к печати 30.01.90. М-18038. Формат 60x90 1/16.
Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 9.00.
Усл. кр.-от. 9.12. Уч.-изд. л. 9.65. Тираж 850. Тип. зак. № 2040.
Цена 1 р. 90 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство „Наука”.
Ленинградское отделение.
199034, Ленинград, В-34, Менделеевская лин., 1.

Ордена Трудового Красного Знамени Первая типография
издательства „Наука”.
19903, Ленинград, В-34. 9 линия, 12.

Ф 1903040100-519 494-89
055(02) - 90

© Институт биологии внутренних вод
АН СССР, 1990

366997

ПРОЦЕССЫ ИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ
И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Проблема происхождения пресноводной фауны давно привлекала внимание многих исследователей [1, 5, 32, 39, 47, 49, 53, 55, 58, 60, 61, 63, 66]. Беспозвоночные и рыбы вынуждены постоянно поддерживать во внутренней среде осмотическое давление, концентрацию минеральных веществ и рН на уровнях, значительно отличающихся от уровней этих показателей в пресной воде. Эксперименты, посвященные сравнительному изучению степени развития, особенностей функционирования систем ионо- и осморегуляции у пресноводных животных, могут представить новые доказательства для решения вопросов происхождения, эволюции пресноводной фауны и специфики эволюционных путей различных групп гидробионтов. Основные выводы относительно эволюции пресноводной фауны сформулированы на основании изучения осмотического давления, концентраций ионов натрия и хлора во внутренних жидкостях и особенностей их обмена. Однако остаются без должного внимания физиологические механизмы поддержания гомеостаза кальция, калия и магния у пресноводных животных.

Анализ физиологических возможностей и адаптивной пластичности механизмов ионной регуляции у пресноводных животных дает сведения, без которых трудно рассчитывать на корректное проведение мероприятий по акклиматизации рыб и беспозвоночных в пресных водоемах, различающихся по химическому составу воды. Знание основных показателей минерального обмена необходимо в практике рыбоводства, интенсификация которого осуществляется в основном за счет увеличения плотности посадки рыб, расхода кормов, внесения минеральных и органических удобрений, что приводит к серьезным преобразованиям химического состава воды. Наконец, сведения о точных характеристиках минерального обмена имеют важное значение при определении сроков формирования осморегулирующих систем и соответственно готовности к миграции ценных промысловых видов лососевых из пресной воды в море.

Стремительное и прогрессирующее в последние десятилетия снижение величины рН пресных вод вследствие выпадения кислых осадков, содержащих серную и азотную кислоты, поставило перед биологами различных специальностей ряд проблем, требующих срочного решения. Одна из задач – выяснение механизмов токсического действия низких рН на различные группы пресноводных животных. Очевидно, что при изучении этого вопроса необходимо учитывать влияние минерального состава воды. От успешного проведения исследований в этой области во многом зависит оценка ситуации, складывающейся в отдельных водоемах, а также прогнозирование последствий кислотного загрязнения и проведение охранных мероприятий.

Представляет глобальную проблему загрязнение окружающей среды пестицидами и аммонием. В отличие от пестицидов, избыточное накопление в водоемах аммония может иметь не только антропогенное, но и биогенное происхождение. Изучение функционирования ионообменных механизмов, локализованных в жабрах по фазе раздела организм-внешняя среда, может дать дополнительные сведения о первичных реакциях организма на токсические вещества. Основной целью исследования было установление закономерностей ионного обмена между организмом и средой у рыб и беспозвоночных в различных экологических ситуациях. Рассматривались также проблемы происхождения пресноводной фауны.

Основными объектами послужили широко распространенные пресноводные животные: 11 видов костистых рыб: семга (*Salmo salar salar* L.), форель ручьевая и радужная (*S. trutta morpha* Fario L. и *S. gairdneri* Richardson), карась обыкновенный (*Carassius carassius* L.), карп (*Cyprinus carpio* L.), плотва обыкновенная (*Rutilus rutilus* L.), окунь обыкновенный (*Perca fluviatilis* L.), колюшка девяти- и трехиглая (*Pungitius pungitius* L. и *Gasterosteus aculeatus* L.), данио рерио (*Brachydanio rerio* Hamilton), тилапия мозамбикская (*Oreochromis mossambicus* Peters); 15 видов ракообразных (Anostraca - *Streptocephalis torvicornis* Waga; Cladocera - *Daphnia magna* Straus; Conchostraca - *Eocyzicus orientalis* Dadau; Mysidacea - *Mysis relicta* Loven, *M. oculata* Fabricius; Isopoda - *Asellus aquaticus* L., *Mesidotea entomon* (L.); Amphipoda - *Gammarus lacustris* Sars, *G. zaddachi* Sexton, *Gammaracanthus lacustris* Sars, *G. loricatus ostiorum* (Sabine), *Pontoporeia affinis* Lindstrom, *P. femorata* Kröyer, *Atylus carinatus* (Fabricius); Decapoda - *Astacus leptodactylus*, Esch) и 6 видов моллюсков (*Pulmonata-Limnaea stagnalis* L., *L. pereger* Müller, *Planorbis corneus* L.; *Bivalvia* - *Margaritana margaritifera* L., *Anadonta cygnea* L., *Sphaerium suecicum* West.).

Материал собран в Рыбинском водохранилище, реках Волге, Сить и Солонице Ярославской обл., Ладожском озере, Финском и Рижском заливах Балтийского моря, озерах Дарвинского заповедника и Карельской АССР, Кандалакшском заливе Белого моря.

Изучали также действие широко распространенных в водоемах токсических веществ: хлорофоса, гексахлорана, линдана, полихлорпинена, солей аммония, фенола. Действие каждой концентрации токсических веществ испытывали не менее чем на 5 рыбах и 10-30 беспозвоночных в трех повторностях, LC_{50} определяли методом интерполяции. pH в непроточных аквариумах поддерживали автоматическим титрованием HCl или H_2SO_4 . Необходимую концентрацию аммония и pH в проточных аквариумах создавали с помощью универсального разбавляющего устройства оригинальной конструкции [8].

Необходимую концентрацию растворенного CO_2 в аквариумах (80–100 мг/л) поддерживали с помощью пропорционально разбавляющего устройства, модифицированного таким образом, что при равной скорости потока в аквариумы одновременно добавлялось одинаковое количество H_2SO_4 до значений pH 6.4–6.6 [38]. Содержание растворенного и общего CO_2 в воде определяли потенциометрическим методом с использованием электрода „Orion” 95-02. Осмотическую концентрацию гемолимфы ракообразных измеряли на криоскопе конструкции М.М. Соколовой [42], а микрообъемов жидкостей – на микрокриоскопе с электрическим охлаждением [11].

Для определения ионного обмена между организмом и внешней средой рыб и беспозвоночных на 15–30 мин помещали в аэрируемую воду различного минерального состава. Объем жидкости и время экспозиции подбирали таким образом, что изменение ионного состава не оказывало влияния на исследуемые параметры. Скорость общей потери солей (V_0) рассчитывали по изменению концентрации после экспозиции рыб в дистиллированной воде или в растворе CaCl_2 с концентрацией, равной таковой в исследуемой воде. Баланс ионного обмена (V), т. е. сумму общей потери и поглощения, определяли по отклонению концентрации анализируемого иона в воде, в которой изучали поглощение, от исходной величины. Скорость поглощения того или иного иона из воды (V_c) рассчитывали по уравнению $V_c = V + (-V_0)$.

Концентрацию Na^+ и K^+ определяли на пламенных фотометрах ПФМ-1, ПАЖ-2 и PhLAVO-4. Содержание кальция в зависимости от характера проб анализировали на PhLAVO-4 и ПАЖ-2, а также на атомном абсорбциометре ААС-1, на последнем измеряли и концентрацию Mg^{2+} . Соединение хлора и аммония изучали с использованием ионселективных электродов „Orion” (США). Интенсивность дыхания у рыб и беспозвоночных определяли при помощи оксиметра YSI (США).

Животных, используемых в эксперименте, разбивали на 2 группы и в течение 12–24 ч исследовали потребление ими кислорода. После этого подопытных животных помещали в испытываемую среду, а контрольных оставляли в обычной воде. Экспозицию подбирали таким образом, чтобы концентрация O_2 в замкнутых сосудах не снижалась более чем на 30 %.

Общее содержание двуокси углерода (PCO_2), концентрацию растворенного кислорода (PO_2), а также pH в гемолимфе ракообразных и мантийной жидкости моллюсков определяли в анаэробных условиях с помощью стеклянного микрокапиллярного электрода E 5046 с объемом образца 30 мкл и pH-метра-милливольтметра РНМ 73 pH/blood gas monitor; для определения CO_2 использовали электрод E 5036, O_2 – E 5046, pH крови – 394045. Для изучения адгезивных свойств клеток жабр рыб применяли модифицированный нами метод [43]. Содержание кальция в чешуе определяли по методу, описанному ранее в [34], а активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) (К.Ф.1.3.99.1) – по [40].

Измерения проводили одновременно на 4–8 особях. Перед опытом рыб не кормили 7–14 сут и во избежание стрессовых реакций адаптировали к условиям эксперимента, ежедневно подвергая их тем же процедурам, что и в опыте. При изучении ионного обмена контролировали величину рН и температуру воды. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием средней арифметической (M), средней квадратичной ошибки средней арифметической (m), доверительных границ средней арифметической (t_m), уровня вероятности (P).

Особенности ионной и осмотической регуляции у моллюсков, ракообразных и рыб

При изучении ионного обмена у моллюсков различного систематического положения, обитающих в водоемах с низкой минерализацией, выявился ряд общих закономерностей. Потери Na^+ и Ca^{2+} в дистиллированной воде отличаются друг от друга незначительно, а утечка K^+ примерно на порядок их меньше. Равновесие между потерей и поглощением Na^+ и Ca^{2+} наступает при достаточно низком содержании их в воде. Полученные результаты свидетельствуют о том, что представители подкласса Branchiopoda способны сорбировать соли непосредственно из воды. Кинетика поглощения Na^+ , K^+ и Ca^{2+} отражает закономерности ионного обмена, характерные для типично пресноводных животных. Особенность минерального обмена представителей этой группы заключается в том, что обмен Na^+ и Ca^{2+} происходит с большей интенсивностью, чем у высших ракообразных.

У всех исследованных видов баланс кальция сохраняется при его содержании в воде, не превышающем 100 мкмоль/л (табл. 1). Интересно, что даже у солоноватоводных эстуарных видов амфипод концентрация, при которой устанавливается баланс кальция, составляет 10–60 мкмоль/л. Например, у литорального гаммаруса эта величина такая же, как у типичного обитателя пресных вод речного рака. Такая же закономерность отмечается и для константы полунасыщения (K_m) поглощения кальция. Таким образом, прослеживается близость некоторых показателей обмена Ca^{2+} у различных пресноводных и полупресноводных беспозвоночных. Обмен K^+ и Na^+ у типично пресноводных и переходных форм существенно различается. Величина потерь Na^+ у речного рака ниже, чем у остальных ракообразных, а у амфипод – коррелирует со степенью „пресноводности“ видов. Создается впечатление, что характерной чертой бокоплавов является низкое сродство калийтранспортирующих систем. K_m для калия у них имеет значительно большие величины, чем у других исследованных животных. Возможно, что низкая концентрация калия в воде может существенно ограничивать распространение этой группы ракообразных в пресных водах.

У всех изучаемых животных, в том числе и у низших ракообразных-фильтраторов, транспортируются из воды соли. С наибольшей интенсивностью поступают в организм Ca^{2+} , и ве-

Т а б л и ц а 1

Основные характеристики ионного обмена у пресноводных и солоноватоводных (а) моллюсков и ракообразных

Вид животных	К _{тп}			С _б			V _{т.а.б.}			V _о						
	МКМОЛЬ/Л									МКМОЛЬ/(Г·Ч)						
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻				
П р е с н о в о д н ы е м о л л ю с к и																
<i>Limnaea pereger</i>	90	-	50	-	40	-	30	-	0.60	-	0.90	-	0.20	0.050	0.300	-
<i>Sphaerium suecicum</i>	35	-	60	-	25	-	25	-	0.11	-	0.60	-	0.08	0.030	0.100	-
<i>Margaritana margaritifera</i>	60	45	150	-	50	45	25	-	0.03	0.004	0.03	-	0.02	0.002	0.009	-
П р е с н о в о д н ы е р а к о о б р а з н ы е																
<i>Eocyclus orientalis</i>	80	5	150	-	80	18	100	-	9.00	1.000	18.0	-	5.00	0.900	7.000	-
<i>Streptocephalis torvicornis</i>	50	-	35	-	-	-	50	-	2.25	-	1.25	-	2.40	0.900	0.750	-
<i>Daphnia magna</i>	80	10	-	-	200	20	-	-	3.00	1.000	-	-	3.00	0.900	-	-
<i>Astacus leptodactylus</i>	80	5	30	-	100	15	10	-	0.22	0.025	0.18	0.18	0.17	0.040	0.020	0.16
<i>Gammarus lacustris</i>	100	100	45	100	100	25	60	100	2.00	0.300	0.45	1.60	1.00	0.100	0.400	0.80
<i>Gammaracanthus lacustris</i>	400	125	100	350	600	150	60	350	2.50	0.200	0.85	1.80	1.80	0.120	0.400	1.20
<i>Mysis relicta</i>	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.00	-	-	-
<i>Pontoporeia affinis</i>	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.00	-	-	-
<i>Gammaracanthus loricatus</i>	1000	100	125-150	-	1200	150	90	-	2.50	0.200	1.25	-	1.90	0.120	0.450	-
С о л о н в а т о в о д н ы е р а к о о б р а з н ы е																
<i>Gammarus zaddachi</i>	350	100	50	400	400	90	10	450	9.00	0.250	1.60	4.00	5.00	0.180	0.300	3.80
<i>Mysis oculata</i>	52000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.50	-	-	-
<i>Pontoporeia femorata</i>	6900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.00	-	-	-

П р и м е ч а н и е. V_{т.а.б.} - максимальная скорость поглощения; K_{тп} - константа полунасыщения; C_б - концентрация, при которой осуществляется ионный баланс; V_о - скорость общей потери солей.

личина их чистого поглощения значительно превосходит такую Na^+ и K^+ . По-видимому, отмеченные особенности обмена Ca^{2+} , с одной стороны, и обмена Na^+ и K^+ – с другой, являются функциональной основой различий концентрации этих ионов у ракообразных, общее содержание кальция в теле которых примерно в 10 раз больше, чем натрия [57]. Вероятно, физиологические механизмы транспорта Ca^{2+} , столь хорошо развитые у пресноводных моллюсков и ракообразных, сформировались еще в морской период жизни, поскольку способность сорбировать Ca^{2+} из морской воды и поддерживать его более высокую концентрацию в гемолимфе, чем в морской воде, широко известна [57, 62].

У высших ракообразных при повышении солености наружной среды наблюдается увеличение концентрации Na^+ и других осмотически активных веществ в гемолимфе [2, 5]. Амплитуда концентрационных изменений внутренней среды зависит от величины минерализации воды, в которой акклимируются животные. Так, при акклимации *Mesidotea entomon* к высокой и низкой солености наружной среды запуск и отключение натрийсорбирующего механизма происходит при концентрации Na^+ в гемолимфе около 350 ммоль/л. Пороговая концентрация Na^+ в гемолимфе у *Gammaracanthus lacustris*, ниже которой активизируется механизм поглощения Na^+ из воды, составляет около 250 ммоль/л. Установлено, что общая потеря солей и натрия значительно уменьшается при акклимации бокоплавов к пресной воде. Это уменьшение величины выхода солей из организма лишь частично объясняется различием градиента концентраций между внешней и внутренней средой. Основные измерения обмена Na^+ при акклимации гаммаракантусов к изменению солености заканчиваются через 24–36 ч [3–5].

Пресноводные рыбы поглощают из воды Na^+ , Ca^{2+} , K^+ и Mg^{2+} . Величина сорбции катионов в норме превышает уровень их потери. Это является основой для обеспечения поддержания гомеостаза натрия и кальция в организме рыб. Наибольшим сродством обладает система поглощения калия, наименьшим – кальция. Величины K_m K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} коррелируют со средними значениями концентраций этих катионов, характерных для большинства пресных вод со средней и низкой минерализацией [10]. Особенность обмена Ca^{2+} – существенное превышение его поглощения над потерями. Высокая эффективность и экологическая „пригнанность“ систем транспорта K^+ , Ca^{2+} в воде, бедной этими катионами, свидетельствуют, что непременно условием для успешного освоения костистыми рыбами пресных вод было развитие и совершенствование жабберных механизмов транспорта Ca^{2+} , K^+ и, возможно, Mg^{2+} .

К дефициту солей в воде рыбы адаптируются благодаря перестройке ионного обмена между организмом и внешней средой. В результате акклимации к воде с низкой минерализацией выявлены минимальные концентрации ионов, необходимые для поддержания нормального обмена этих катионов. В процессе акклимации многократно снижается потеря Na^+ и увеличивается его поглощение из воды. Аналогичные изменения происходят в обмене K^+ и Ca^{2+} [2].

Рис. 1. Участие ионного обмена в жабрах пресноводных рыб в поддержании кислотно-щелочного, ионоосмотического гомеостаза и удаления продуктов метаболизма.

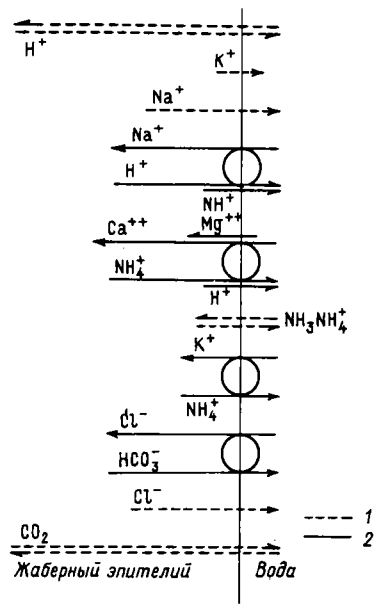
1 - ионная и молекулярная диффузии,
2 - ионообменный механизм (по: [10]).

Присутствие Ca^{2+} во внешней среде уменьшает почти в равной степени выход из организма не только Na^+ - основного внеклеточного иона, но и K^+ - внутриклеточного катиона. Ограничение проницаемости наблюдается при чрезвычайно низких концентрациях Ca^{2+} в воде Ca^{2+} (12 мкмоль/л). Показано, что Mg^{2+} угнетает поглощение из воды Ca^{2+} . При концентрации Mg^{2+} около 50 мкмоль/л наблюдается 50%-е ингибирование транспорта Ca^{2+} (табл. 2).

Полученные результаты указывают на важную роль Ca^{2+}/NH_4^+ и Na^+/H^+ ионообменных процессов в регуляции кислотно-щелочного равновесия и концентрации этих ионов в организме. Функционирование ионообменных механизмов во многом определяет устойчивость рыб к низким pH и высокому содержанию NH_4^+ во внешней среде (рис. 1).

На основании изучения ионного обмена у рыб при стрессе установлено, что отлов и лабораторный „хендлинг“ являются однотипными стрессовыми факторами, вызывающими нарушение ионного баланса между организмом и средой, в первую очередь за счет усиления диффузионной утечки Na^+ и K^+ во внешнюю среду [18]. Сходные, но более кратковременные изменения в обмене Na^+ наблюдаются и при стрессе, вызванном резкими и значительными колебаниями температуры и ионного состава воды. В начальный период стресса (менее 1 ч после начала воздействия) резко увеличивается потеря ионов, баланс Na^+ и K^+ становится отрицательным. В восстановительный период, продолжающийся максимум 2 сут, все характеристики ионного обмена постепенно стабилизируются, и катионный баланс нормализуется (рис. 2).

При сравнительном исследовании транспорта ионов у взрослых окуней и двухдневных личинок существенных различий в средстве ионтранспортирующих систем к натрию и калию не выявили. И взрослые окуни, и личинки начинают поглощать Na^+ из раствора с концентрацией 10-20, K^+ - 7-10 мкмоль/л, максимальный транспорт Na^+ и K^+ наблюдается соответственно при 300-400 и 70-100 мкмоль/л во внешней среде. Следовательно, незадолго до вы-



Скорость потери (V_0) и поглощения (V_C) катионов у караса при различном ионном составе среды (по: [23])

Концентрация, мкмоль/л	η	М±η обмен катионов, мкмоль/(100 г·ч)									
		Ca ²⁺		Na ⁺		K ⁺		Mg ²⁺			
		V_0	$V_0 + V_C$	V_0	$V_0 + V_C$	V_0	$V_0 + V_C$	V_0	$V_0 + V_C$	V_0	$V_0 + V_C$
CaCl ₂ (500), NaCl (210), KCl (55), pH 6.6-6.9	6	-0.8±0.2	15.4±0.9	-12.6±3.0	30.1±5.2	-1.8±0.3	1.2±0.2	-	-	-	-
CaCl ₂ (500), NaCl (210), KCl (55), pH 6.6-6.9 + NH ₄ Cl (500)	6	-0.9±0.2	4.6±0.8	-14.4±3.2	26.1±4.8	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂ (500), NaCl (210), KCl (55), pH 6.6-6.9 + NH ₄ Cl (1000)	6	-0.6±0.3	3.6±1.0	-16.8±2.0	26.4±3.8	-2.9±0.5	-2.1±0.5	-	-	-	-
CaCl ₂ (500), NaCl (210), KCl (55), pH 6.6-6.9 + NH ₄ Cl (2500)	6	-0.9±0.1	3.0±0.7	-21.0±2.4	28.8±3.9	-3.5±0.7	-3.7±0.4	-	-	-	-
CaCl ₂ (400), NaHCO ₃ (100), KHCO ₃ (55), pH 7.4-7.6	4	-0.9±0.1	11.4±1.0	-15.6±4.1	10.2±1.9	-2.0±0.2	1.4±0.2	-	-	-	-
CaCl ₂ (400), NaHCO ₃ (100), KHCO ₃ (55), pH 4.3-5.1	4	-0.8±0.1	11.0±1.4	-19.0±3.2	-13.1±3.7	-2.2±0.4	1.6±0.3	-	-	-	-
CaCl ₂ (400), NaHCO ₃ (100), KHCO ₃ (55) + MgCl ₂ (50), pH 6.5-7	6	-0.5±0.1	2.0±1.5	-15.1±1.0	10.4±3.0	-1.4±0.2	2.0±0.2	-0.2±0.1	-0.1±0.1	-0.2±0.1	-0.1±0.1
CaCl ₂ (400), NaHCO ₃ (100), KHCO ₃ (55) + MgCl ₂ (200), pH 6.5-7	6	-0.6±0.2	2.4±1.8	-12.9±2.1	10.8±2.3	-1.4±0.6	1.9±0.2	-0.3±0.1	-0.2±0.1	-0.3±0.1	-0.2±0.1
MgCl ₂ (200), pH 6.5-7	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.2±0.1	0.6±0.1
MgCl ₂ (200) + NH ₄ Cl (2500), pH 6.5-7	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1±0.1

П р и м е ч а н и е. η - количество исследованных рыб.

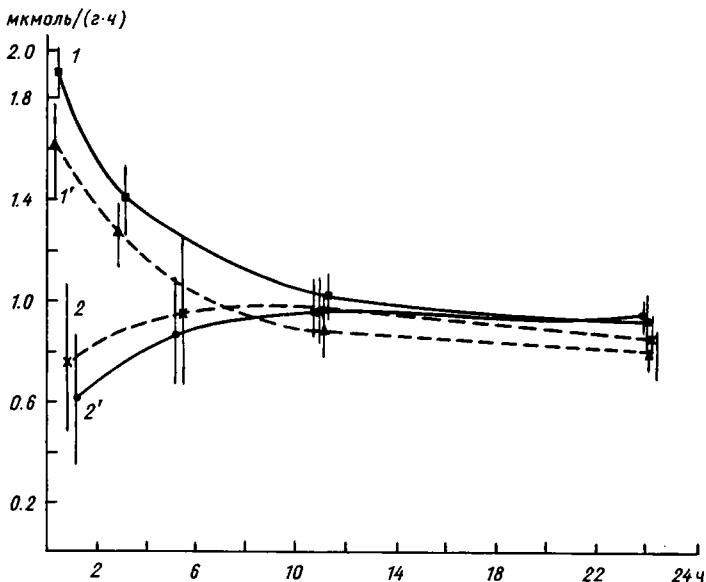


Рис. 2. Потери и поглощение натрия у карася при стрессе (по: [18]).

1 — потеря в среде с сахарозой, 1' — то же без сахарозы, 2 — поглощение в речной воде с сахарозой, 2' — то же без сахарозы.

лупления у эмбрионов формируется система ионного обмена, идентичная таковой у взрослых рыб.

На протяжении всего периода пребывания молоди семги в пресной воде осморегуляция осуществляется по гиперосмотическому типу благодаря активному поглощению Na^+ из внешней среды. Величина обмена Na^+ и Ca^{2+} между организмом и средой изменяется в процессе онтогенеза. Интенсивность обмена Na^+ уменьшается уже на первом году жизни и далее его уровень постоянен. Величина поглощения Ca^{2+} у ранних пестряток (июнь) в среднем в 2 раза выше, чем у покатников. Поглощение Na^+ и Ca^{2+} из внешней среды у разных возрастных групп семги происходит в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен и характеризуется низкими K_m для этих ионов. Так, для натрия ее величина одинакова на протяжении всего пресноводного этапа жизни молоди семги и составляет 50–60 мкмоль/л.

Влияние низких величин рН на ионную регуляцию рыб, ракообразных и моллюсков

При снижении рН среды у рыб происходит усиленная утечка не только Na^+ и Cl^- , но и K^+ и Ca^{2+} . Одновременно значительно возрастает поступление из воды в организм H^+ . Почечные компоненты потери Na^+ существенно не влияют на общую его потерю в

Влияние pH на силу сцепления клеток жаберного эпителия карася (по: [43])

pH	Количество сорванных клеток, %	Различия между опытом и контролем (P)
3.5	181.0±2.8	<0.001
4.0	165.8±1.1	<0.001
4.8	135.9±1.5	<0.001
5.8	109.7±1.2	<0.001
6.2	100.6±1.1	>0.050
7.8	102.1±1.3	>0.050
7.9*	100.0±1.4	-
10.0	146.0±1.4	<0.001

* Контроль.

кислой среде. На основании этого сделан вывод о том, что избыточная утечка солей при низких pH внешней среды обусловлена увеличением проницаемости жабр для ионов [13, 21, 28, 29].

Снижение содержания Na^+ и Cl^- в крови у рыб при закислении внешней среды связано не только с усиленной их диффузией через жабры, но и с ингибированием транспорта этих ионов. Для оценки общего токсического эффекта угнетение сорбции ионов имеет второстепенное значение, поскольку потеря Na^+ и Cl^- при сильном кислотном воздействии многократно превышает нормальную величину их поглощения. Развитие ацидоза у рыб в кислой среде, на наш взгляд, объясняется двумя причинами. Во-первых – это ингибирование Na^+/H^+ - и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменов в жабрах, приводящее к снижению pH крови. Во-вторых, что более важно, через жабры при летальных и близких к ним величинам pH поток H^+ в организм увеличивается в десятки и большее число раз и превышает суммарный выход из организма всех катионов и анионов [42].

Представляют интерес данные об исключительно низкой чувствительности к снижению величины pH проницаемости жабр для Na^+ и H^+ , транспорта Na^+ у окуня, особенно кислотно-устойчивого вида. У плотвы, карася, карпа, колюшки девяти- и трехиглой, семги и тилапии поглощение Na^+ практически прекращается в диапазоне pH 4-4.5, а у окуня незначительное угнетение транспорта Na^+ наблюдается при pH<3.5. Такая высокая устойчивость жабр окуня к повреждающему действию pH отмечается на самых ранних стадиях онтогенеза [24]. Изложенные факты позволяют полагать, что способность того или иного вида рыб переносить низкие величины pH

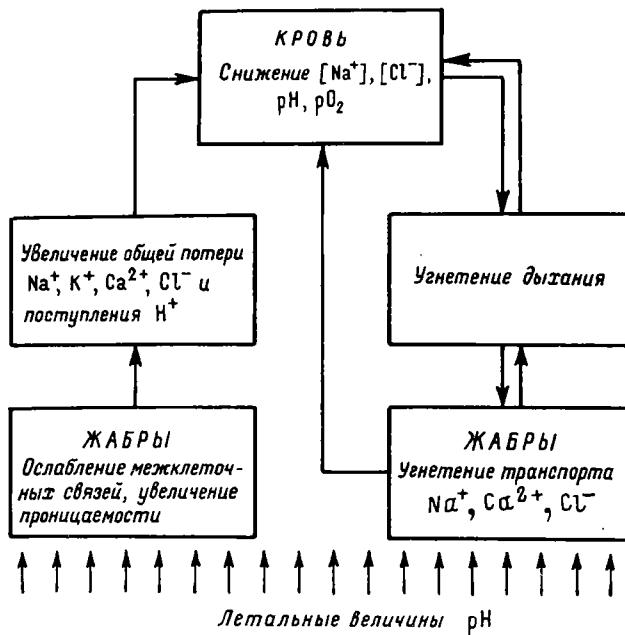


Рис. 3. Влияние низких величин рН на костистых рыб.

Объяснения в тексте.

во многом обусловлена структурно-функциональными особенностями эпителия жабр.

Проницаемость жаберного эпителия карася при низких рН находится в прямой зависимости от состояния клеточных мембран и контактов между ними. Ca^{2+} оказывает на эпителий жабр действие, противоположное H^+ . Если низкие рН внешней среды увеличивают проницаемость жабр и ослабляют силу сцепления между клетками, то кальций стабилизирует межклеточные контакты [27]. Его добавление в закисленную среду в концентрациях 20–40 мг/л или помещение рыб в нейтральную среду практически полностью нормализуют проницаемость жабр и величину межклеточных пространств. Это свидетельствует в пользу физико-химической природы влияния избыточной концентрации H^+ на клеточные мембраны и межклеточные связи. Увеличение концентрации H^+ с рН 5 в опытах *in vitro* существенно ослабляет силу сцепления клеток жаберного эпителия. Эти данные находятся в соответствии с результатами, свидетельствующими об увеличении проницаемости жабр в экспериментах *in vivo* (табл. 3).

Деструктивные изменения в жабрах рыб, обнаруживаемые при воздействии низких рН, связаны с ослаблением межклеточных контактов и носят обратимый характер.

На основании настоящего исследования и современных представлений о структурно-функциональной организации жаберного эпителия рыб предлагается обобщенная схема, объясняющая действие низких рН на жабры рыб (рис. 3).

А к к л и м а ц и я рыб к низким величинам рН воды характеризуется последовательными переходящими этапами угнетения, частичного или полного восстановления, установления на новом уровне поглощения Na^+ и Cl^- . Размах отклонения от нормы транспорта ионов через жабры и длительность процесса адаптации у разных видов рыб существенно различаются и зависят от силы воздействия.

Важная особенность процесса акклимации рыб к снижению рН воды в толерантном диапазоне – постепенное уменьшение проницаемости жабр для ионов, продолжающееся до тех пор, пока поглощение Na^+ и Cl^- не будет превышать общий уровень их потери. Динамика изменения концентрации Na^+ и Cl^- в крови у рыб при акклимации к низким рН определяется соотношением поглощения и потери этих ионов. Ингибирование транспорта Na^+ при закислении среды наблюдается уже в первые минуты после воздействия. Проницаемость для Na^+ первоначально либо увеличивается, либо не изменяется. Достоверное уменьшение величины этой функции отмечается не ранее, чем через 6–12 ч пребывания в кислой среде [44, 45].

Снижение рН воды угнетает потребление O_2 . В толерантном диапазоне изменений рН (4–8) у карася и карпа полностью восстанавливается или несколько повышается первоначальный уровень потребления O_2 . Установление нового уровня дыхания заканчивается через 5–6 сут акклимации [6]. При акклимации к рН 4,5 закисление крови у карпа продолжается в течение первых 10–12 ч и затем рН крови нормализуется. Периоду увеличения потребления O_2 при акклимации карпа к рН 4,5 соответствует возрастание концентрации гемоглобина в эритроцитах. Расчеты показывают, что увеличение содержания гемоглобина в эритроцитах – основной адаптивный механизм, способствующий нормализации транспорта O_2 в условиях длительного снижения рН воды в толерантном диапазоне.

Об увеличении метаболической активности клеток жаберного эпителия карася свидетельствует возрастание активности СДГ в жабрах рыб. Характерно, что угнетению транспорта Na^+ в жабрах карася и карпа соответствует увеличение активности СДГ, а восстановлению – ее снижение. Установление положительного баланса Na^+ у рыб при акклимации к низким рН происходит практически одновременно с нормализацией активности СДГ в жабрах. Реакцию эпителия жабр следует разделить на две стадии. Первая связана с быстрыми компенсаторными изменениями, свидетельствующими об активности клеточного метаболизма жаберного эпителия (транспорт ионов, синтез белка и РНК, окислительное фосфорилирование, внутриклеточная организация). Этот период при максимально переносимом воздействии низких величин рН заканчивается в течение 1–2 сут акклимации [35, 37, 44, 45]. На следующем этапе акклимации функциональные

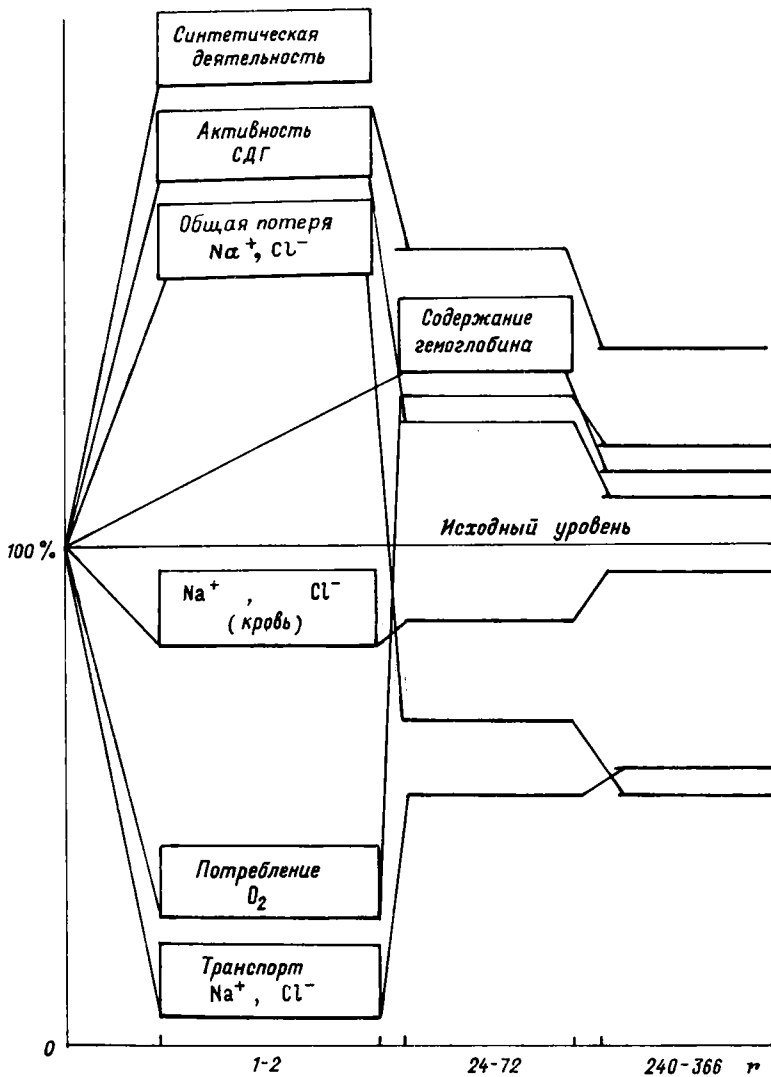


Рис. 4. Основные закономерности акклимации рыб к снижению pH внешней среды.

изменения протекают медленнее, имеют небольшую амплитуду и заканчиваются в течение 7-10 сут.

Сравнительное изучение популяций окуня, постоянно обитающего в кислых озерах в слабощелочной воде, не выявило генотипических различий в их ионной регуляции. В пользу этого вывода свидетельствует отсутствие различий в проницаемости жабр и поглощении Na^+ при снижении pH воды у окуней обеих популяций. По нашим

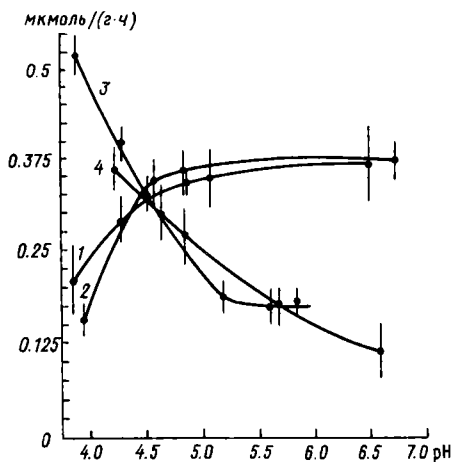


Рис. 5. Поглощение и потери Ca^{2+} (1, 3) и Na^+ (2, 4) у моллюска *Limnaea pereger* при различных значениях pH воды (по: [9]).

данным, низкая концентрация Ca^{2+} и Na^+ наряду с повышенной кислотностью служит причиной, ограничивающей существование большинства рыб в кислых водоемах [22].

В кислой среде повышенное содержание CO_2 (гиперкапния) ингибирует поглощение у рыб натрия. Увеличение содержания CO_2 в воде на фоне

низких pH влияет на ионную и кислотно-щелочную регуляцию более значительно, чем гиперкапния в нейтральной среде.

Характерная черта реакции иммунной системы карпа на закисленные воды (pH 4.5–4.7) – угнетение антимикробной активности сыворотки крови на 30–50 %, которое сохраняется на протяжении всего опыта (12 сут). Эти результаты позволяют считать иммунную систему рыб чувствительной к низким величинам pH воды [38]. Результаты проведенного исследования представлены на схеме (рис. 4).

Низкие величины pH нарушают обмен натрия между организмом и средой у ракообразных. В результате избыточной утечки Na^+ в среду у низкого уровня поглощения этого иона уменьшается концентрация Na^+ в гемолимфе. В основе остротоксического действия низких pH лежит увеличение проницаемости покровов тканей для ионов, что вызывает не только обессоливание организма, но и способствует усиленному поступлению H^+ из внешней среды и развитию ацидоза. Величины pH, при которых увеличивается проницаемость покровов, существенно различаются у разных видов ракообразных и коррелируют с межвидовыми различиями по кислотоустойчивости. Токсичность низких pH для ракообразных в значительной мере зависит от концентрации в воде Na^+ . При его содержании менее величины K_m гибель у бокоплавов наступает в пресной кислой среде быстрее, чем в солоноватой. В солоноватой воде (8–12 ‰) бокоплавов погибают при более высоких значениях pH. При акклимации высших ракообразных (*Astacus leptodactylus*, *Gammaracanthus lacustris*) к низким величинам pH снижается потеря натрия и частично восстанавливается его поглощение из внешней среды. Концентрация Na^+ в гемолимфе изменяется в процессе акклимации в большей степени, чем pH гемолимфы [7].

Низкие величины pH увеличивают выход кальция во внешнюю среду у речного рака. Предполагают, что именно эта причина ограни-

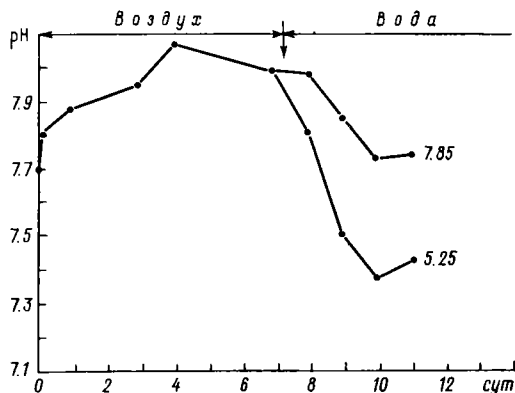
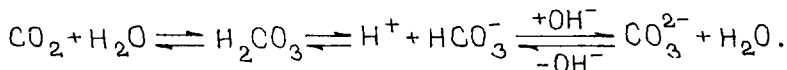


Рис. 6. Изменение pH мантийной жидкости *Margaritana margaritifera* (по: [20]).

чивает существование многих видов ракообразных в кислых водоемах с низкой минерализацией [9, 15].

У моллюсков - прудовиков *Limnaea stagnalis* и *L. peregra* - в кислой среде обмен Na^+ нарушается главным образом за счет увеличения потерь этого иона во внешнюю среду (рис. 5). Аналогичные изменения при низких pH происходят и в обмене Ca^{2+} . Полученные данные свидетельствуют о том, что дефицит последнего может иметь решающее значение для выживания брюхоногих моллюсков в кислых водоемах [9, 19].

Поддержание кислотно-щелочного гомеостаза в мантийной полости у герметизированных и открытых двустворчатых моллюсков *Margaritana margaritifera* осуществляется аналогично таковому в бикарбонатной буферной системе, схематически представленной следующим образом:



При этом CaCO_3 , входящий в состав раковины, является основным буферным резервом организма [20].

При действии закисления у двустворчатых моллюсков не наблюдается ни герметизации раковины, ни снижения интенсивности фильтрации, так как бикарбонатная буферная система обеспечивает поддержание pH мантийной жидкости в приемлемых для организма пределах (рис. 6). Адаптивная поведенческая реакция, выражающаяся в изоляции двустворчатых моллюсков от внешней среды, оказывается полезной лишь в экстремальных условиях и на протяжении очень ограниченного периода времени вследствие накопления метаболитов и повышения pH мантийной жидкости. Таким образом, в кислой среде взрослые особи *M. margaritifera* могут существовать сравнительно продолжительное время, так как потери кальция постоянно превышают его поглощение.

Достаточно продолжительная длительность экспериментов (20 сут) и применение токсикантов в концентрациях, близких к сублетальным, позволили установить различие в действии двух широко распространенных хлорорганических пестицидов – полихлорпинена (ПХП) и гексахлорана (ГХЦГ) – на функции жабр рыб. ПХП увеличивает потерю Na^+ из организма, ГХЦГ в различных концентрациях подобным действием не обладает. ПХП в отличие от ГХЦГ стимулирует потребление O_2 . Эти факты согласуются с результатами исследований ультраструктуры жабр и адгезионных свойств клеток жаберного эпителия. ПХП – ихтиоцид, особо токсичный для рыб препарат [46]. Именно поэтому его использовали для уничтожения ихтиофауны водоемов. В этой связи весьма показательно, что токсичность ПХП для рыб коррелирует с его способностью нарушать проницаемость жабр для натрия. Наличие симптомокомплекса, предшествующего изменению проницаемости при действии ПХП, свидетельствует о том, что наблюдаемый эффект носит вторичный характер и не является причиной отравления [17]. Начало увеличения уровня потери натрия у карася при отравлении ПХП зависит от концентрации токсиканта. Однако всегда после изменения скорости утечки ионов наступает гибель рыб, что дает основание считать увеличение проницаемости жабр причиной, усугубляющей действие токсиканта [24]. Обнаруженные при действии ПХП нарушения адгезивных свойств клеточных мембран, вероятно, и приводят к увеличению проницаемости жабр для ионов. ПХП оказывает на эпителий жабр действие, противоположное Ca^{2+} и сходное с влиянием низких рН (табл. 4).

Влияние ПХП на эпителий жабр в значительной мере определяется не только его концентрацией, ионным составом воды, но и длительностью воздействия [41, 46]. По нашему мнению, многообразие патологических процессов в жабрах, колебание их проницаемости, изменение в газообмене при отравлении рыб ПХП связаны не только с нарушением адгезионных свойств клеток жаберного эпителия, но и во многом определяются действием ПХП на кровоснабжение [25, 36], центральную нервную систему, проницаемость эритроцитов для воды и ионов [31].

Исследование влияния хлорофоса на брюхоногих моллюсков и медицинскую пиявку выявило значительные нарушения в водно-солевом обмене, связанные с антихолинэстеразным действием хлорофоса. Результаты опытов свидетельствуют о том, что этот токсикант вызывает у медицинской пиявки нарушение двигательной активности. На начальной стадии отравления пиявки начинают заглатывать воду. Это приводит к созданию в зобе высокого гидростатического давления, способствующего проникновению воды в кровь и усиленному мочеобразованию [26]. Затем расслабляются мышцы глотки кожно-мускульного мешка, хорошо наблюдаемого визуально. Пиявка перестает заглатывать воду и ее избыток выводится с мочой.

Т а б л и ц а 4

Зависимость количества сорванных клеток от времени инкубации в ПХП 0.01 мг/л (по: [43])

Время инкубации	Количество сорванных клеток	
	in vitro	in vivo
15 мин	107±1.1	101±1.4
30 мин	123±1.6	111±1.1
60 мин	137±1.3	123±1.6
3 ч	167±2.1	156±1.1
6 ч	-	149±1.6
12 ч	-	141±1.2
24 ч	-	139±1.3
15 сут	-	175±2.0
30 сут	-	139±1.4

Разница в устойчивости к хлорофосу у моллюсков прудовика *Limnaea stagnalis* и катушки *Planorbis corneus* объясняется различием активности и чувствительности их холинэстераз. Этот вывод хорошо согласуется с данными о большей чувствительности холинорецепторов к воздействию ингибиторов холинэстеразы у прудовиков, чем у катушки [30]. Таким образом, в основе патологических процессов водно-солевого обмена у брюхоногих моллюсков при отравлении хлорофосом лежит нарушение двигательной активности [12].

Влияние аммонийного загрязнения на минеральный обмен и кислотно-щелочную регуляцию у рыб и беспозвоночных

Токсичность общего аммония для рыб и ракообразных увеличивается при снижении pH воды и определяется в кислой среде формой NH_4^+ . Это подтверждает выводы о зависимости токсичности общего аммония не только от концентрации NH_3 , но и от величины pH и содержания NH_4^+ [48, 56, 64, 67].

У рыб ионы аммония ингибируют поглощение Ca^{2+} . Этот эффект проявляется при концентрации NH_4^+ 4,5–18 мг/л. Негативное влияние сублетальных концентраций ионизированного аммония заключается также в нарушении обмена K^+ и Na^+ [14, 15]. Изменение нормального уровня обмена катионов в жабрах рыб может привести к отклонению от оптимальных значений содержания отдельных ионов в организме и pH внутренней среды, что в конечном счете может

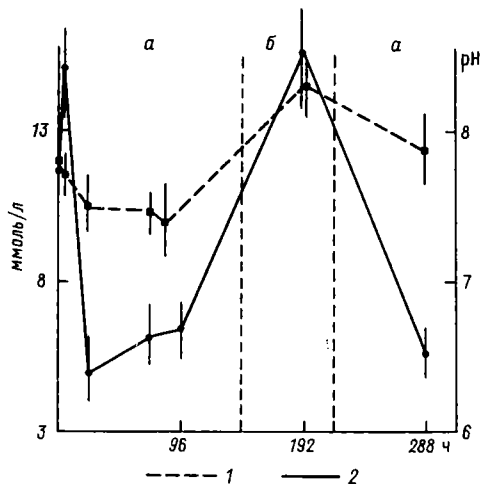


Рис. 7. pH (1) и CO_2 (2) гемолимфы *Astacus leptodactylus* в процессе акклимации к $1.25 \text{ ммоль/л } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

а - pH 6.8, б - pH 7.95.

быть причиной нарушения различных метаболических процессов, снижения жизнестойкости рыб.

При значениях $\text{pH} < 7$ влияние внешнего аммония определяется в основном ионизированной формой. Поэтому реакции рыб на увеличение концентрации общего аммония в щелочной и кислой средах могут существенно различаться.

У речного рака в щелочной среде (pH 7.95), содержащей 45 мг/л общего аммония и $1.43 \text{ мг/л } \text{NH}_3$, значительно увеличиваются pH и концентрация общего CO_2 в гемолимфе. В воде с pH 6.8 и аналогичной концентрацией общего аммония, содержащей $0.1 \text{ мг/л } \text{NH}_3$, концентрации общего CO_2 и pH в гемолимфе снижаются. Различие между величинами pH гемолимфы в этих опытах очень велико и составляет 0.74 (рис. 7).

У рыб после первоначального угнетения поглощения кальция эта функция частично нормализуется. Основные изменения в обмене кальция наблюдаются в течение первых 2 сут акклимации. Помещение рыб в чистую воду (деакклимация) вызывает значительное увеличение транспорта Ca^{2+} по сравнению с исходным уровнем. Это свидетельствует о существенных резервах транспортной функции, реализующихся при воздействии аммония на рыб (рис. 8).

Процесс акклимации речного рака характеризуется фазными изменениями поглощения и потери Na^+ , которые нормализуются через 2–7 сут и в конечном счете приводят к установлению баланса Na^+ на более низком уровне. Потребление O_2 и активность СДГ в жабрах у этого вида стабилизируются через 2 сут акклимации [16]. По-видимому, обнаруженные нами компенсаторные изменения в метаболизме рыб и ракообразных в сублетальных концентрациях аммо-

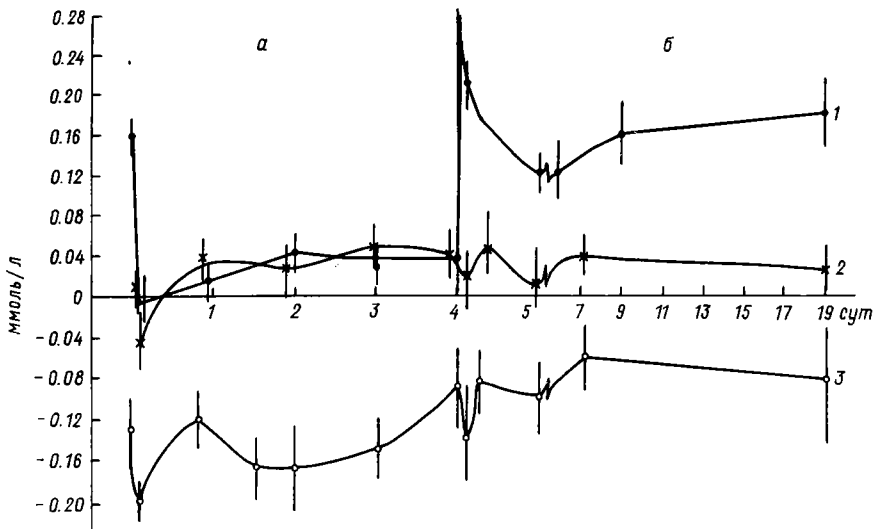


Рис. 8. Влияние аммония (2.5 ммоль/л NH_4Cl) на поглощение и потери кальция и натрия у карася.

а - акклимация, б - деакклимация. 1 - чистое поглощение кальция из CaCl_2 (400 ммоль/л), 2 - то же натрия, 3 - потери натрия в CaCl_2 (400 ммоль/л).

ния объясняют увеличение устойчивости животных к его высоким концентрациям в результате предварительной акклимации.

В отличие от ракообразных у двустворчатых моллюсков увеличение концентрации аммония в воде приводит к необратимому снижению интенсивности потребления кислорода и фильтрационной активности. Вероятно, в этой ситуации моллюски частично переходят к анаэробному типу обмена.

* * *

Проникновение в пресные воды исследованных групп животных привело к развитию у них целого ряда адаптивных систем, в первую очередь систем водно-солевого равновесия. Изложенные материалы позволяют выделить основные адаптивные механизмы водно-солевого гомеостаза, обеспечивающие успешное освоение пресных вод различными в систематическом отношении животными, судить о направленности и темпах эволюции осморегуляторных функций, а также вычленить необходимые и дополнительные приспособления.

Осмотическая концентрация гемолимфы и величина общей потери солей существенно различаются у видов, филогенетически удаленных друг от друга. Однако эти различия отсутствуют или незначительны между близкородственными пресноводными или солоноватоводными формами. У отдельных видов пресноводных ракообразных содержание

Na^+ в гемолимфе ниже и величина его общей потери выше, чем у солоноватоводных. Отличительная особенность типично пресноводных моллюсков, ракообразных (в том числе ракообразных-фильтраторов, представителей отрядов Cladocera, Anostraca, Conchostraca) и рыб – высокая степень развития натрийтранспортирующих систем, характеризующихся практически одинаковой величиной K_m . Эта константа у пресноводных видов находится в пределах концентрации натрия в воде 50–150 мкмоль/л и принципиально отличается от таковой у солоноватоводных животных. Таким образом, точка зрения о примате адаптивных изменений средства физиологических механизмов транспорта натрия и эволюции систем осморегуляции при вселении высших ракообразных из солоноватой в пресную воду [2, 50, 65] получила в настоящей работе дополнительные доказательства.

Изучение обмена Ca^{2+} и K^+ у беспозвоночных выявило недооценку роли физиологических механизмов, транспортирующих эти ионы из внешней среды, в поддержании водно-солевого гомеостаза пресноводных животных. Высокая степень развития у всех исследованных видов систем поглощения Ca^{2+} и K^+ свидетельствует о том, что потребность в этих элементах обеспечивается главным образом за счет непосредственной абсорбции их из воды. Все исследованные пресноводные животные, несмотря на принадлежность к различным таксонам, способны компенсировать неизбежные потери K^+ и Ca^{2+} за счет транспорта этих катионов из воды с низкой минерализацией.

Важная особенность ионного обмена моллюсков, ракообразных и рыб – способность регулировать уровень общей потери солей. При акклимации животных к воде низкой минерализации величина потери солей значительно снижается, что позволяет поддержать осмотический гомеостаз, несмотря на низкие величины уровня транспорта ионов из воды. У пресноводных костистых рыб уменьшение потери Na^+ и Cl^- , на наш взгляд, достигается за счет регуляции проницаемости жаберного эпителия для солей в результате качественных преобразований межклеточных соединений [24].

Освоение пресных вод было бы невозможно без развития физиологических механизмов не только водно-солевого, но и кислотно-щелочного гомеостаза. У абсолютного большинства различных в таксономическом отношении групп солоноватоводных и пресноводных животных величина pH внутренней среды находится в пределах 7.4–8 и в толерантном диапазоне фактически не зависит от концентрации H^+ во внешней среде.

Сравнительное изучение ракообразных и рыб, обладающих различной устойчивостью к низким значениям pH, позволило выяснить некоторые основные морфофункциональные адаптации, позволяющие животным переносить значительные колебания pH во внешней среде: 1) низкая проницаемость покровных тканей, в первую очередь эпителия жабр, для H^+ и солей; высокая устойчивость межклеточных соединений этих тканей к дезагрегирующему действию низких значений pH воды или наличие их защиты от непосредственного кон-

такта с кислой средой; 2) эффективное удаление кислот из организма против градиента концентраций; 3) устойчивость Na^+ -, Ca^{2+} -, Cl^- -, K^+ -транспортирующих систем эффекторных органов к низким величинам pH внешней среды; 4) способность снижать в кислой среде потери солей и проницаемость жабр для ионов.

По данным различных авторов [33, 50-52], область pH, сравнительно безопасная для типично морской фауны, обитающей при океанической солености, составляет 7.6-8.4, солоноватоводной и эстуарной - 6.5-9, пресноводной - 5-9. Возможно, приведенные данные не вполне отражают закономерности, существующие в природе. Тем не менее они позволяют подметить взаимосвязь между соленостью среды обитания и диапазоном pH воды, в котором могут существовать морские, солоноватоводные и пресноводные животные.

Проведенное исследование позволило обнаружить в жабрах рыб и беспозвоночных не только $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, H^+ -, но и $\text{Ca}^{2+}/2\text{NH}_4^+$ - и K^+/NH_4^+ -обменные процессы, одновременно обеспечивающие организм солями и удаляющими из него кислые продукты против градиента концентрации. У ракообразных распространены $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -, $\text{Ca}^{2+}/2\text{NH}_4^+$ -, у рыб - Na^+/H^+ - и $\text{Ca}^{2+}/2\text{NH}_4^+$ -обменные механизмы. По-видимому, физиологические механизмы транспорта Ca^{2+} из внешней среды играют важную роль в поддержании кислотно-щелочного гомеостаза. Этот вывод позволяет углубить и дополнить представления, основанные на концепции, объясняющей удаление кислот из организма сопряженным транспортом натрия из воды [54-56, 59, 60]. Независимо от первопричины возникновения у морских животных эффекторных систем ионной регуляции (необходимости избавлять организм от избытка кислых и щелочных продуктов метаболизма или приспособление к снижению солености) основные физиологические механизмы поддержания кислотно-щелочного гомеостаза, и в том числе низкая проницаемость для ионов эпителиальных тканей, формируются уже у фауны солоноватых вод. Это и дало возможность, на наш взгляд, многим представителям солоноватоводной фауны заселить водоемы с низким содержанием солей и концентрацией водородных ионов, в сотни и тысячи раз отличающейся от величины этого показателя в солоноватых водах. Более высокая эффективность физиологических механизмов экскреции кислот, сопряженных с поглощением катионов из воды, по сравнению с эффективностью удаления оснований обмен ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), возможно, и предопределила асимметрию устойчивости по отношению к pH морской воды многих групп солоноватоводных и пресноводных видов в сторону низких величин pH внешней среды.

Установлено, что водно-солевой обмен и процессы кислотно-щелочной регуляции моллюсков, ракообразных и рыб обладают высокой чувствительностью к изменению различных параметров внешней среды. Функциональное состояние ионного обмена может быть использовано в водной токсикологии для диагностики патологических нарушений, возникающих в результате отклонения от нормы факторов водной среды.

1. Б и р ш т е й н Я.А. Некоторые проблемы происхождения и эволюции пресноводной фауны // Успехи соврем. биологии. 1949. Т. 27, вып. 1.
2. В и н о г р а д о в Г.А. Осмотическая регуляция пресноводной амфиподы *Gammaracanthus lacustris* Sars и солоноватоводной изоподы *Mesidotea entomon* (L.) // Экология морских организмов. М., 1971.
3. В и н о г р а д о в Г.А. Изучение функционирования систем осмотической регуляции солоноватоводной изоподы *Mesidotea entomon* (L.) в процессе соленостной акклимации // Экология. 1973. № 1.
4. В и н о г р а д о в Г.А. Функционирование систем осмотической регуляции пресноводной амфиподы *Gammaracanthus lacustris* Sars в воде различной солености // Экология. 1973. № 6.
5. В и н о г р а д о в Г.А. Осмотическая регуляция некоторых ледниковых реликтовых ракообразных в связи с особенностями их экологии и происхождения // Соленостные адаптации водных организмов. Л., 1976.
6. В и н о г р а д о в Г.А. Адаптация водных животных с различными типами осморегуляции к понижению pH внешней среды // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.
7. В и н о г р а д о в Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных животных в условиях антропогенного загрязнения водоемов // Биология внутренних вод: Информ бюл. Л., 1979, № 51.
8. В и н о г р а д о в Г.А., Устройство для регуляции концентрации испытуемого вещества в растворителе. А.С. 1126936 (СССР). Заявл. 20.05.83, № 3595793/24; опубл. 30.11.84 // Свод изобрет. 1984. Вып. 44.
9. В и н о г р а д о в Г.А. Функциональные основы действия низких pH на рыб и беспозвоночных // Проблемы водной токсикологии, биотестирования и управления качеством воды: Материалы 4-го советско-американского симп. Л., 1986.
10. В и н о г р а д о в Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. Экологические и эволюционные аспекты: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Л., 1987.
11. В и н о г р а д о в Г.А., Б о б о в и ч М.А. Новая модификация микрокриоскопа и опыт ее применения для изучения осмотической регуляции беспозвоночных // Гидробиол. журн. 1970. Т. 6, № 4.
12. В и н о г р а д о в Г.А., Г д о в с к и й П.А. Исследование действия хлорофоса на водно-солевой обмен пресноводных брюхоногих моллюсков // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1976. № 32.
13. В и н о г р а д о в Г.А., Г д о в с к и й П.А., М а т е й В.Е. Закисление водоемов и его влияние на метаболизм у пресноводных животных // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.

14. В и н о г р а д о в Г.А., Д а л ь Е.С., К о м о в В.Т. Влияние солей аммония и закисления среды на метаболические процессы у пресноводных животных. Сообщение 1 // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1983. № 55.
15. В и н о г р а д о в Г.А., Д а л ь Е.С., К о м о в В.Т. Влияние солей аммония и закисления среды на метаболические процессы у пресноводных животных. Сообщение 3 // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1983. № 57.
16. В и н о г р а д о в Г.А., Д а л ь Е.С., К о м о в В.Т. Исследование основных функций жабр речного рака при воздействии солей аммония и закисления среды // Реакция гидробионтов на загрязнение. М., 1983.
17. В и н о г р а д о в Г.А., Ж а р и к о в Г.П., Ф л е р о в Б.А. Действие ПХП и гексахлорана на дыхание и осморегуляцию карасей // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.
18. В и н о г р а д о в Г.А., К л е р м а н А.К. Ионный обмен пресноводных рыб при стрессе // Вопр. ихтиологии. 1987. Т. 27, вып. 2.
19. В и н о г р а д о в Г.А., К л е р м а н А.К., К о м о в В.Т. Особенности ионного обмена пресноводных моллюсков в условиях высокой концентрации ионов водорода и низкой минерализации внешней среды // Экология. 1987. № 3.
20. В и н о г р а д о в Г.А., К л е р м а н А.К., К о м о в В.Т., Х е м и н г Т.А. Регуляция кислотно-щелочного гомеостаза мантийной жидкости у *Margaritana margaritifera* (*Eulamellibranchia*, *Margaritiferidae*) при обсыхании и закислении внешней среды // Зоол. журн. 1987. Т. 66, вып. 7.
21. В и н о г р а д о в Г.А., К о м о в В.Т. Физиологические адаптации пресноводных рыб к снижению pH и минерализации воды // Экологическая физиология и биохимия рыб: Тез. докл. У1 Всесоюз. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. Вильнюс, 1985.
22. В и н о г р а д о в Г.А., К о м о в В.Т. Особенности ионной регуляции окуня *Perca fluviatilis* L. (*Percidae*) в связи с проблемой закисления водоемов // Вопр. ихтиологии. 1985. Т. 25, вып. 1.
23. В и н о г р а д о в Г.А., К о м о в В.Т. Обмен катионов у карася *Carassius carassius* L. в средах с различным ионным составом // Физиол. журн. 1987. Т. 73, № 7.
24. В и н о г р а д о в Г.А., К о м о в В.Т., М а т е й В.Е. Функциональные основы действия низких pH на рыб и ракообразных // Физиологические и биохимические аспекты токсикологии пресноводных животных, ИБВВ АН СССР. 1984. Деп. в ВИНТИ 23.03.1984, № 1637-84 деп.
25. В и н о г р а д о в Г.А., К о м о в В.Т., М а т е й В.Е., Д а л ь Е.С. Влияние полихлорпинена на обмен натрия, ультраструктуру жабр и ферментативную активность в тканях у карася // Пресноводные гидробионты и их биология. Л., 1983.

26. Виноградов Г.А., Лапкина Л.Н. Влияние хлорофоса на осморегуляцию у медицинской пиявки // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1976. № 32.
27. Виноградов Г.А., Матей В.Е., Даль Е.С. Влияние кальция на минеральный обмен и ультраструктуру жабр у пресноводных рыб // Реакция гидробионтов на загрязнение. М., 1983.
28. Виноградов Г.А., Соколов В.А., Флерова Г.И. Потеря иона натрия и изменения рН крови у рыб, подвергнутых действию кислой среды // III Всесоюз. конф. по экологической физиологии рыб: Тез. докл. Киев, 1976. Ч. 1.
29. Виноградов Г.А., Соколов В.А., Флерова Г.И. Изучение механизма действия низких рН у пресноводных рыб // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л., 1978.
30. Вульфус Е.А., Юрченко О.П. Влияние антихолинэстеразных веществ на нейроны брюхоногих моллюсков // ДАН СССР. 1972. № 5.
31. Гдовский П.А. Исследование действия полихлорпинена на некоторых позвоночных животных: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1984.
32. Гинецинский А.Г. Физиологические механизмы водно-солевого равновесия. М.; Л., 1964.
33. Лукьяненко В.И. Токсикология рыб. М., 1967.
34. Майер Ф.П., Петти Д.Д., Козловская В.И., Флеров Б.А. Определение остаточных количеств пестицидов в рыбах Рыбинского водохранилища // Гидробиол. журн. 1981. Т. 17, вып. 5.
35. Матей В.Е. Хлоридные клетки – структурная основа ионообменных процессов в жабрах костистых рыб // Цитология. 1986. Т. 28, № 1.
36. Матей В.Е., Мальгина Н.А. Действие пестицидов на жаберный эпителий карася // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.
37. Матей В.Е., Харазова А.Д., Виноградов Г.А. Реакция хлоридных клеток жаберного эпителия колюшки на изменение рН и солености среды // Цитология. 1981. Т. 23, № 2.
38. Микряков В.Р., Виноградов Г.А., Клерман А.К., Силкина Н.И., Силкин Н.Ф. Влияние низких значений рН и углекислого газа на иммунофизиологическое состояние карпов // Физиологические и биохимические аспекты токсикологии пресноводных животных. ИБВВ АН СССР. 1984. Деп. в ВНИТИ. 26.03.1984, № 1637–84 деп.
39. Наточин Ю.В. Океан и эволюция водно-солевого гомеостаза // Природа. 1981. № 4.
40. Наточин Ю.В., Резник Л.В., Шахматова Е.И., Лаврова Е.А. Адаптивные изменения активности сукцинатдегидрогеназы при различных функциональных состояниях почки крысы // ДАН СССР. 1977. Т. 237, № 2.

41. С о к о л о в В.А., В и н о г р а д о в Г.А. Изучение адаптации рыб к различным значениям рН наружной среды // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1977. № 33.
42. С о к о л о в а М.М. Определение концентрации осмотически активных веществ в биологических жидкостях // Лаборат. дело. 1967. № 10.
43. Т а г у н о в В.Б., М а т е й В.Е., В и н о г р а д о в Г.А. Количественная оценка адгезивных свойств клеток жаберного эпителия карася при изменении химического состава внешней среды // Физиологические и биохимические аспекты токсикологии пресноводных животных. ИБВВ АН СССР. 1984. Деп. в ВИНТИ. 23.03.84. № 1637-84 деп.
44. Т у р с т о н Р.В., В и н о г р а д о в Г.А., К о м о в В.Т., М а т е й В.Е. Влияние низких значений рН, солей аммония и обессоливания на активность ферментов, обмен Na в жабрах и ультраструктуру хлоридных клеток у пресноводных рыб. Сообщение I // Биология внутренних вод: Информ. бюл. 1979. №43.
45. Т у р с т о н Р.В., В и н о г р а д о в Г.А., К о м о в В.Т., М а т е й В.Е. Влияние низких значений рН, солей аммония и обессоливания на активность ферментов, обмен Na в жабрах и ультраструктуру хлоридных клеток у пресноводных рыб. Сообщение II // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1979. № 44.
46. Ф л е р о в Б.А. Полихлорпинен и его влияние на водные организмы // Экспериментальная водная токсикология. Рига, 1973. Вып. 4.
47. Х л е б о в и ч В.В. Критическая соленость биологических процессов. Л., 1974.
48. A r m s t r o n g D.A., C h i p p e n d a l e D., K h i g h t A.W., C o l t J.E. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on shortterm survival and growth of prawn larvae, *Macrobrachium rosenbergii* // Biol. Bull. 1978. Vol. 154.
49. C r o g h a n P.C. Ionic and osmotic regulation of aquatic animals // Environmental physiology of animals. London, 1976.
50. C r o g h a n P.C., L o s k w o o d A.P.M. Ionic regulation of the Baltic and fresh-water races of the Isopod *Mesidotea (Saduria) entomon (L.)* // J. Exp. Biol. 1968. Vol. 18, N 1.
51. (Д а ж о Р.) Да ж о Р. Основы экологии. М., 1975.
52. EPA. Quality criteria for water. Washington, 1976. 20460.
53. EPA. A review of the EPA Red book: Quality criteria for water. Maryland, 1979. 20014.
54. E v a n s D.H. Ionic exchange mechande mechanism in fish gill // Comp. Biochem. Physiol. A. 1975. Vol. 51.

55. E v a n s D.H. Gill Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange systems evolved before the vertebrates entered fresh water // J. Exp Biol. 1984. Vol. 113.
56. E v a n s D.H., K o r m a n i c G.A., K r a s n y E.F.F. Mechanisms of ammonia and acid extrusion by the little skate, *Raja erinacea* // J. Exp. Zool. 1979. Vol. 208, N 2.
57. G r e e n a w a y P. Calcium balance and moulting in the crustacea // Biol. Revs. 1985. Vol. 6, N 3.
58. K r o g h A. Osmotic regulation in aquatic animals. Cambridge, 1939.
59. M a e t z J. $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, Na^+/H^+ - exchanges and NH_3 movement across the gill of *Carassius auratus* // J. Exp. Biol. 1973. Vol. 58, N 1.
60. M a e t z J., G a r s i a - R o m e u F. The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a freshwater fish, *Carassius auratus*. II. Evidence for $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ and $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanges // J. Gen. Physiol. 1964. Vol. 47.
61. M c C a l l u m A.B. Palaeochemistry of body fluids // Physiol. Revs. 1926. Vol. 6.
62. (P r o s s e r L.). П р о с с е р Л. Сравнительная физиология животных. М., 1977. Т. 1.
63. R o b e r t s o n J.D. Osmotic and ionic regulation in aquatic invertebrates // Recent advances in invertebrate physiology. Eugene, 1957.
64. R o b i n s o n - W i l s o n E.F., S e i m W.K. The lethal and sublethal effects of zirconium process effluent of Juvenile salmonids // Water Resour. Bull. 1975. Vol. 11, N 5.
65. S h a w J., S i t c l i f f e D.W. Studies an sodium balance in *Gammarus dueneri* Lilljeborg and *G. pulex* (L.) // J. Exp. Biol. 1961. Vol. 38, N 1.
66. S m i t h H.W. From fish to philosophe. Boston, 1953.
67. T a b a t a K. Toxicity of ammonia to aquatic animal with reference to the effect of pH and carbonic acid // Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lad. 1962. Vol. 34.

ИНСТИНКТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ЛИЧИНОК РУЧЕЙНИКОВ
СНАЕТОРТЕРУХ VILLOSA FABR.

Поведение личинок ручейников при строительстве или починке домиков изучали многие исследователи. Сложные и хорошо скоординированные последовательности действий рассматриваются как типичный пример видеоспецифичного, генетически запрограммированного поведения. На многих представителях подотряда цельношупиковых, строящих домики из растительных или минеральных частиц, склеенных выделениями паутинной железы, показано, что основные компоненты поведения при выборе и прикреплении частиц к домику, а также порядок следования этих компонентов очень близки у разных видов.

Так, у личинок *Potamophylax rotundipennis* при надстройке укороченного домика выделено 10 этапов. Действия личинки сводятся к нахождению, захвату песчинки, а затем для оценки ее пригодности следует „первичный тест“ и манипулирование ею. Если песчинка подходит, личинка последовательно оклеивает ее паутиной, переносит, устанавливает у кромки домика и приклеивает. После этого личинка обследует кромку. Весь этот цикл повторяется до тех пор, пока домик не будет надстроен до нужной длины [2]. У личинок *P. latipennis* в строительном процессе наблюдали 11 аналогичных этапов [13]. У другого вида — *Silo pallipes* — выделены 3 вида поведения [9], вполне соответствующие этапам поиска, манипулирования и установки, описанным В.В. Барановым с сотрудниками [2].

Личинки *Limnophilus* могут сооружать домики как из фрагментов листьев, так и из песка. При строительстве из растительных частиц в каждом цикле выделены 14 этапов (от приклеивания одного фрагмента до приклеивания другого). При использовании песчинок можно различить 12 этапов, при этом некоторые из них включены в цикл независимо от того, какой материал берется [3]. Последовательности этапов при строительстве в „нормальных“ условиях у „лиственных“ ручейников *Oligostomis reticulata* и „песчаных“ *Anabolia sp.* и *Potamophylax sp.* также оказываются очень близкими [1].

При стабильных условиях строительное поведение, как считают, довольно стереотипно. Однако некоторые авторы [2] указывают и на определенную его изменчивость, вызванную, по-видимому, случайными помехами. Например, у *P. rotundipennis* после „осмотра кромки“ домика в одних случаях следует „подклейка“, а в других — „отрезание камня“. При этом отмечается вариабельность и внутри отдельного этапа. Так, „установка песчинки“ у кромки домика состоит из раскачивания песчинки в углублении на кромке, сдвигания ее, подъемов, поворотов, опусканий в ямку и т. д. В каждом отдельном случае последовательность этих действий может быть разной.

Основными внешними факторами, определяющими последовательность этапов при строительстве, являются свойства частиц, из которых строится домик. Будет ли частица отброшена или приклеена – зависит от ее формы, массы, размера, а также фактуры ее поверхности, как это показано на личинках *P. latipennis* [13]. У личинки *Silo pallipes* эти свойства оцениваются последовательно. На первом этапе „рассматриваются“ размеры и масса, при этом личинка находит и подтягивает к себе частицы, лежащие на дне. Далее насекомое манипулирует захваченной частицей, и здесь важны только ее размеры. На третьем этапе ручейник прикладывает частицу к разным участкам на кромке домика, и в этом случае играет роль форма частицы [9].

В целом, строительное поведение личинок ручейников укладывается в классическую этологическую схему, согласно которой переход от этапа к этапу инстинктивного поведения определяется наследственной фиксированной программой и ключевыми стимулами, а его изменчивость ограничена вариациями на начальных этапах инстинктивной цепи и минимальна при выполнении ее завершающего этапа – комплекса фиксированных действий [8].

В то же время на представителях того же отряда цельнощупиковых получены совершенно иные данные, свидетельствующие о высокой пластичности строительного поведения личинок, позволяющей им решать нестандартные, не встречающиеся в природе задачи, причем без предварительного обучения. У личинок *Molanna angustata* разрушали домик на 2/3 и обнаружили, что животные, находящиеся практически в равных условиях, могут восстанавливать постройку различными способами, комбинируя свои действия в разной последовательности [7]. Например, одни личинки использовали оставшуюся часть жилища как фундамент для постройки нового, а затем уничтожали ее, другие, напротив, достраивали его до полного объема, третьи – перестраивали эту оставшуюся часть и т. д. Во всех случаях конечный результат – восстановленный домик – был качественно одинаковым у всех особей.

Пластичность поведения позволяет ручейникам использовать для строительства самый различный материал. Личинки *Phryganea cinerea* из разных природных популяций строят домики из разных органических частиц. В лабораторном эксперименте они смогли построить жилища из таких материалов, которые в природе не употреблялись, например песок. Использование разного материала требовало другой техники строительства, различных методов отбора, обработки и соединения строительных частиц [12]. Ручейники способны резко изменять свои действия также в зависимости от внешних условий. В проточной воде личинки *Neureclipsis bimaculata* сооружают ловчую сеть. Однако в лаборатории, в неподвижной воде, они строят домик из песка и растительных частиц [4].

Эта высокая лабильность поведения в нестандартных ситуациях не может быть объяснена функционированием жесткой врожденной программы или даже большого числа „запасных“ программ. В то же время трудно предположить, что существуют 2 отдельных меха-

низма – для обычного инстинктивного поведения и для решения нестандартных задач. Видимо, в реальной инстинктивной деятельности у одного и того же животного присутствуют как детерминированные последовательности действий, так и высокоизменчивые звенья, представляющие разные частные проявления работы одной и той же управляющей системы. Показано [10, 11], что даже очень простые математические модели динамических систем могут вести себя и строго детерминированно, и стохастически. Причиной внешне недетерминированных, случайных изменений в поведении таких систем является наличие в них неустойчивостей, из-за которых слабые случайные возмущения во внешней среде и внутри самой системы порождают возрастающие со временем отклонения в ее поведении [6]. Эти отклонения возможны, если внутренние и внешние параметры, определяющие поведение системы, задают его недостаточно жестко.

В качестве примера можно привести данные Я. Дембовского [7]. Межиндивидуальная изменчивость в способах восстановления домика имела место у ручейников, жилище которых было разрушено на 2/3. Если же у домика удаляли только половину длины, поведение личинки было стереотипным: они достраивали передний конец оставшейся постройки до ее полного размера. Вероятно, после значительных разрушений устраняются такие особенности домика, которые могли бы направить поведение ручейника по строго определенному пути.

Ясно, что для проявления изменчивости в строительном поведении должны отсутствовать не только внешние, но и внутренние детерминанты: другими словами – на определенных этапах поведения должна отсутствовать программа, жестко определяющая последовательность действия животного. Сформировавшееся к настоящему времени представление о запрограммированности инстинктивного поведения является очень общим, в то время как степень и характер внутреннего детерминизма может различаться на разных этапах поведения у одной и той же особи. Таким образом, можно предположить, что основой для наблюдаемой в нестандартных ситуациях изменчивости поведения, в том числе „интеллектуальной” и адаптивной, служит наличие неустойчивостей в механизме управления поведением.

Чтобы экспериментально обнаружить, запрограммировано ли наблюдаемое поведение, можно разделить его на отдельные этапы и проследить, насколько вероятность появления каждого этапа зависит от предыдущего. Если вероятность смены текущего этапа другим определенным этапом не зависит от того, что животное делало ранее, то можно, по-видимому, говорить о незапрограммированности поведения. В настоящей работе приведены результаты экспериментов, в которых использован этот подход. Объектом служили личинки ручейника *Chaetopteryx villosa* Fabr. (Limnophilidae), обитающие преимущественно на каменистом или песчано-каменистом дне в проточной воде. Свой домик длиной 14–18 мм они строят из детрита и песчинок или целиком из песчинок (в последнем возрасте). По-

стройка слегка изогнута дорсально, немного сужена к заднему концу, с уплощенной вентральной поверхностью [5].

Личинок последнего возраста собирали в ручье и содержали в течение суток в аквариуме с водой из того же ручья при температуре 20–22 °С в естественном световом режиме. Затем по одной особи помещали в стеклянные чашки Петри диаметром 9 см, заполненные профильтрованной водой из ручья, на дно насыпали слой песка. После 24 ч пребывания в чашке домики разрушали с обоих концов, оставляя 1/3, и через 1 ч начинали наблюдения за каждой личинкой в течение 1 ч. Предварительно поведение личинок разделили на 11 этапов. Во время основного эксперимента наступление каждого этапа отмечали нажатием соответствующей кнопки на регистрирующем устройстве, соединенном с самописцем, что приводило к отклонению на определенную величину пера самописца на ленте, двигающейся со скоростью 1 мм/с. Таким образом получили запись, по которой можно было оценить количество, длительность и порядок следования этапов поведения.

С 11 по 23 августа 1986 г. было проведено 40 наблюдений. Окукливание у личинок, содержащихся в лаборатории, началось 1 сентября, одновременно с личинками в ручье.

С помощью ЭВМ были получены матрицы переходов от одного этапа поведения ручейников к другому, а также матрицы переходов от заданной последовательности этапов к другим последовательностям. Для статистической обработки данных использовали критерий χ^2 .

Этапы строительного поведения

В качестве этапов были выделены как отдельные дискретные действия (например, захват или отбрасывание песчинки), так и фиксированные последовательности действий, выполняющие общую, ясно выраженную функцию. Таким образом, уже при предварительном анализе некоторые запрограммированные последовательности рассматривали как единое целое.

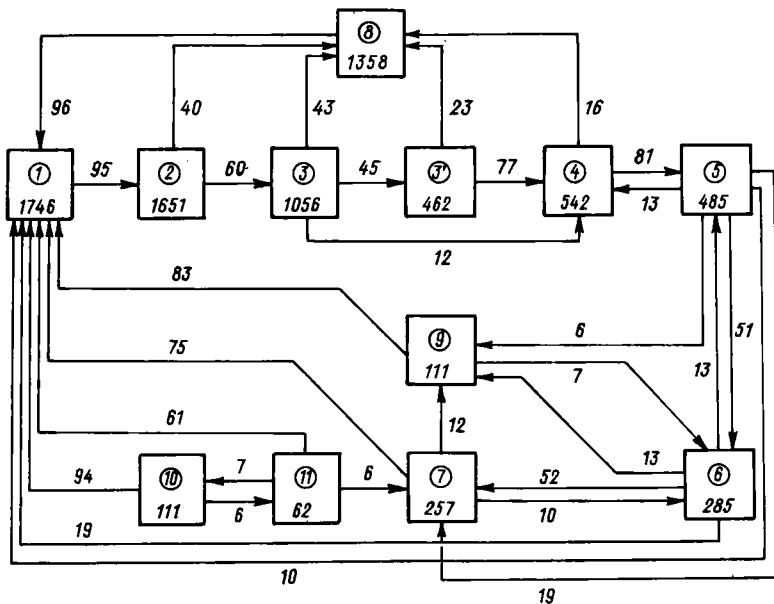
Поиск песчинки. Ручейник подгребает к себе песчинки про- или мезоторакальными ногами. Совершая эти движения, личинка чаще всего неподвижна, но может и перемещаться.

Захват. Ручейник поднимает песчинку ногами, чаще всего только передними.

Манипулирование. Личинка вращает захваченную песчинку ногами. Неоднократно отмечали, что при этом личинка водит по поверхности камня мандибулами, оставляя на ней клейкую нить. Насекомое начинает поворачиваться вокруг своей оси и переносит песчинку над кромкой домика.

Установка. Личинка приставляет песчинку к кромке домика, обычно в каком-либо углублении между уже приклеенными песчинками. Часто ручейник поворачивается в домике и последовательно меняет место установки.

Приклеивание. После того как песчинка установлена, личинка приклеивает ее к домику нитями секрета паутинных желез. Сначала-



Последовательность этапов строительного поведения личинок *Chaetopteryx villosa* Fabr.

Номера в кружках - этапы: 1 - поиск песчинки, 2 - захват, 3 и 3 - манипулирование соответственно менее и более 8 с, 4 - установка, 5 - приклеивание, 6 - укрепление, 7 - ощупывание, 8 - отбрасывание песчинки, 9 - поворот, 10 - передвижение, 11 - пауза. Цифры под кружками - число наблюдений каждого этапа. Стрелки - встречающиеся наиболее часто переходы от этапа к этапу. Цифры у стрелок - частота переходов от этапа, % от числа наблюдений.

ла - к песчинкам, расположенным ниже, а затем к находящимся слева и справа.

Укрепление домика. Время от времени ручейник оклеивает нитями домик изнутри, втянувшись в него и медленно поворачиваясь вокруг его оси.

Ощупывание. Насекомое ощупывает кромку домика передними ногами и челюстями, одновременно поворачиваясь вокруг оси. Личинка обследует то один, то другой участок кромки. Связи между ощупываемым участком и местом, где после этого устанавливается и приклеивается песчинка, выявить не удалось.

Отбрасывание песчинки. Песчинка может быть отброшена сразу после захвата, после манипулирования или реже установки. Во время приклеивания личинки иногда роняют песчинку. Отбрасывание состоит в том, что личинка раздвигает ноги, сжимающие песчинку, и в каждом отдельном случае нельзя точно определить, было ли оно случайным.

Поворот. После завершения некоторых этапов личинке приходится повернуться относительно домика, чтобы перейти к следующим. Так, если песчинка приклеивалась на верхней стороне домика, личинка должна повернуться для поиска следующей частицы. При повороте ручейник выдвигается из домика и, изгибаясь всем телом, поворачивается без помощи ног.

Передвижение. Личинка идет по песку, отталкиваясь всеми ногами и не совершая движений, связанных с поиском песчинки.

Пауза. Ручейник замирает во время выполнения какого-либо этапа, а затем возвращается к прерванной деятельности или переходит к следующему этапу. Пауза отличается от реакции потревоженных личинок, которые не только замирают, но и подгибают голову и ноги или прячутся в домик. В большинстве случаев пауза имела место между окончанием приклеивания и поиском следующей песчинки.

Ощупывание, пауза, поворот продолжались обычно несколько секунд, поиск, манипулирование, установка – от 3 до 25 с, а приклеивание и передвижение – от нескольких секунд до нескольких минут.

Этограмма

Общая схема возможных переходов от этапа к этапу построена по результатам наблюдения за 40 особями (см. рисунок). Для того чтобы сделать ее менее громоздкой, не показаны переходы, составляющие менее 5 % от общего числа переходов от данного этапа. Частоты переходов зависели не только от того, каким был текущий этап, но и от его длительности. Особенно заметно это проявлялось при манипулировании: частота отбрасывания резко снижалась, если оно продолжалось более 8 с, поэтому манипулирования, продолжавшиеся меньше и больше этого времени, выделены на этограмме в 2 разных этапа.

Полученные данные можно сжато описать следующим образом. Поведение ручейника организовано в циклы, которые могут быть законченными, если заканчиваются приклеиванием песчинки, и незаконченными – если она отбрасывается. Обязательные элементы каждого цикла – поиск и захват песчинки. Последовательность циклов представляет собой *макроуровень* поведения. Изменчивость поведения на макроуровне зависит, очевидно, от того, каким будет очередной цикл – законченным или нет. Из рисунка видно, что незаконченных циклов было гораздо больше, чем законченных (1358 и 485 соответственно). Этапы, входящие в каждый цикл, представляют собой *микроровень* поведения. Изменчивость на микроуровне состоит прежде всего в том, на каком этапе прерывается незаконченный цикл – на установке, манипулировании или сразу после захвата. В цикле могут присутствовать или отсутствовать необязательные этапы – передвижение, пауза, поворот, укрепление и ощупывание, но если они все-таки существуют, то могут выполняться в разном порядке. Например, ощупывание может происходить как до, так и после укрепления.

Соотношение детерминизма и изменчивости
в строительном поведении

Этограмма дает представление о диапазоне изменчивости поведения ручейников, но не позволяет выявить возможные причинные зависимости. Если, например, после приклеивания могут следовать несколько разных этапов, это еще не означает, что переходы от приклеивания не запрограммированы. Они могут определяться поведением, предшествующим приклеиванию. Анализ зависимостей такого рода приведен ниже.

Макроуровень. Как уже отмечалось, ручейники разных видов оценивают строительный материал по многим параметрам. При проведении наших наблюдений также было видно, что личинки проявляют избирательность. Если ручейнику попадались плоские песчинки, особенно превышающие диаметр 1.5–2 мм, то они приклеивались почти всегда. Круглые песчинки такого же и меньших размеров очень часто отбрасывались. Хотя эти наблюдения только качественные, ясно, что вероятность завершения цикла зависит от свойств песчинки.

Однако это не единственный фактор, определяющий исход цикла. Вероятность его завершения существенно снижается, если ему предшествует 2 и более незавершенных циклов (табл. 1).

Следовательно, успех или неуспех цикла частично запрограммированы результатами предшествующего поведения ручейника, и часть песчинок из-за этого отбрасывается независимо от их качества.

Т а б л и ц а 1

Зависимость завершения цикла строительного поведения от предыдущих циклов у *Ch. villosa*

Предыдущий цикл	Частота завершения следующих циклов, % от их общего числа	Число циклов	P
Завершенный	27	345	< 0.95
Незавершенный после завершения	29	272	
Два и более незавершенных	18	999	> 0.999
В том числе последний цикл заканчивается:			
длительным манипулированием или установкой	26	113	> 0.95
кратким манипулированием	17	743	

Можно предположить, что после нескольких отбрасываний неподходящих песчинок у животного формируется мотивация, заставляющая отказываться от песчинки раньше, чем она будет объективно оценена. С математической точки зрения, эта мотивация устойчива в определенных пределах и преодолевается, вероятно, только под воздействием более сильных факторов, т. е. песчинка с „особо хорошими“ качествами, лучшими, чем их качества, приемлемые для ручейников после завершеного цикла. Это предположение требует экспериментальной проверки. Однако уже ясно, что последовательность событий на макроуровне детерминирована не только свойствами строительного материала, но и внутренней программой.

На исход цикла влияет не только итог предыдущих циклов, но и то, на каком этапе отброшена песчинка в последнем из двух или нескольких незавершенных циклов (табл. 1). Если она отбрасывалась уже после краткого манипулирования (длительностью менее 8 с), то следующий цикл оказывался завершенным реже, чем в тех случаях, когда отбрасывание происходило позднее – после длительного манипулирования или установки. Логично предположить, что песчинка отбрасывается тем раньше, чем меньше она удовлетворяет насекоемое, и тем сильнее становится негативное отношение к следующей песчинке. Кроме того, исходы обоих циклов могут быть следствием состояния, создавшегося еще раньше на предыдущих циклах. Действительно, незавершенные циклы после незавершенных реже бывают длительными, чем после заверенных (табл. 2). Этот последний факт в свою очередь подтверждает, что негативное отношение к строительному материалу усиливается после отбрасывания.

Таким образом, поведение на макроуровне определяется не только прошлыми событиями на этом же уровне, но и такими, которые мы ранее отнесли к микроуровню, а именно – этапами, на которых произошло отбрасывание. Другие же события на микроуровне – присутствие или отсутствие в составе цикла передвижения, укрепления, поворота и ошупывания – не оказывали статистически значимого влияния на исход цикла (табл. 3). Пауза наблюдалась слишком редко и ее влияние на исход цикла не рассматривалось.

Как мы уже отмечали, исходя из понятия устойчивости динамической системы, поведение на микроуровне устойчиво, если текущее поведение системы связано с предыдущим поведением на этом же уровне и не зависит от случайных или вызванных возмущений. По отношению к макроуровню такими возмущениями можно считать события на микроуровне. В этом смысле макроуровень устойчив к большинству выделенных нами изменений на микроуровне, за исключением времени отбрасывания песчинки.

Микроуровень. Частота появления передвижения в текущем цикле зависит от того, передвигались ли личинки в предыдущем цикле (табл. 4). Если предыдущий цикл был завершенным, то эта частота была низкой, независимо от присутствия в нем передвижения. После незавершенных циклов картина была иной. Если передвижение в них отсутствовало, то частота его появления в последующем цикле была лишь немного, но статистически значимо выше, чем после такого

Т а б л и ц а 2

Зависимость окончания незавершенного цикла от предыдущих циклов

Предыдущий цикл	Частота отбрасывания песчинки после длительного манипулирования или установки в следующих незавершенных циклах, % от их числа	Число циклов	p
Завершенный	20	252	>0.99
Незавершенный	12	701	

Т а б л и ц а 3

Зависимость завершения цикла строительного поведения от присутствия в нем отдельных этапов

Этап поведения	Присутствие этапа в составе цикла	Частота завершения циклов, % от их числа	Число циклов	p
Передвижение	+	21	105	< 0.95
	-	21	1185	
Укрепление	+	24	216	< 0.95
	-	30	163	
Ощупывание	+	25	231	< 0.95
	-	29	147	
Поворот	+	29	91	< 0.95
	-	26	286	

же завершено цикла. Однако после незавершенных циклов с передвижением частота передвижения в следующем цикле была на порядок выше. Дополнительный анализ не выявил зависимости между частотой появления передвижения в текущем цикле и числом незавершенных циклов без передвижения, имевших место непосредственно перед ним: эта частота колебалась от 2 до 5 % ($P < 0.95$).

Эти результаты показывают, что передвижение связано с отбрасыванием песчинок, так как после приклеивания наблюдалось только 8 случаев передвижения. То, что передвижение не зависит от числа отброшенных песчинок, означает, что в его возникновении играют роль и случайные факторы. Однако, раз возникнув, тенденция к передвижению проявляет свойства устойчивого состояния, сохраняющегося в последующих циклах, если они незавершенные. Если же ручейник все же приклеивает песчинку, то он выходит из этого состояния и вероятность передвижения резко падает.

Т а б л и ц а 4

Зависимость передвижения в цикле строительства от присутствия в предыдущем цикле

Предыдущий цикл	Частота передвижения в следующих циклах, % от их числа	Число циклов
Завершенный :		
с передвижением	5	21
без передвижения	2	387
Незавершенный :		
без передвижения	5	926
с передвижением	54	81

В отличие от передвижения укрепление, поворот и он очень редко наблюдались после окончания незавершенны (менее 0,5 %), хотя их выполнение в этой ситуации не зически, чем после приклеивания песчинки. В этом смы тично запрограммированы приклеиванием. Однако частот этих этапов после завершения цикла не зависела от т нялись ли они после предыдущего завершения цикла (Это не означает, что названные этапы выполняются пос ивания уже совершенно спонтанно. Например, укрепление стимулироваться разными раздражителями, исходящими шероховатой поверхностью, зазорами между песчинками

Т а б л и ц а 5

Зависимость появления этапов поведения от их выпо в прошлом

Этап	Выполнение этапа в предыдущем завершенном цикле	Частота появления этого этапа в следующих завершенных циклах, % от их общего числа	Число циклов
Укрепление	+	57	201
	-	65	142
Ощупывание	+	65	207
	-	63	130
Поворот	+	30	86
	-	28	245

Поворот, как уже отмечалось, выполняется тогда, когда приклеивание и другие действия заканчиваются на верхней стороне домика. Однако эти действия не являются детерминированными в том смысле, что после приклеивания песчинки соответствующие причинные факторы запускают их независимо от появления тех же действий в прошлом. Такое недетерминированное включение укрепления, поворота и ощупывания в цикл строительного поведения можно рассматривать как проявление неустойчивости.

* * *

Если судить о поведении ручейников только по наблюдаемому разнообразию переходов между различными этапами строительства домика, то это поведение представляется очень изменчивым (см. рисунок). Однако реальная пластичность этого поведения гораздо меньше, так как эти переходы частично определяются предыдущими действиями ручейника и в этом смысле запрограммированы. Мы выделили в поведении ручейников макроуровень, представляющий собой последовательность циклов строительства, каждый из которых заканчивается либо приклеиванием к домику очередной песчинки (завершенный цикл), либо ее отбрасыванием (незавершенный). На микроуровне поведение состоит из отдельных этапов, входящих в цикл.

На макроуровне поведение частично запрограммировано в том смысле, что отбрасывание песчинки в нескольких циклах подряд повышает вероятность отбрасывания и в следующих циклах, несмотря на то что песчинки по условиям эксперимента должны попадаться ручейнику в случайном порядке. Последовательность циклов не зависит от присутствия ощупывания и некоторых других этапов на микроуровне, но зависит от того, на каком этапе отбрасывается песчинка в незавершенном цикле: чем раньше происходит отбрасывание, тем с большей вероятностью следующий цикл окажется незавершенным. Последовательность незавершенных циклов может прерываться, по-видимому, из-за случайного захвата ручейником особо „качественной“ песчинки. После этого вероятность завершения следующих циклов повышается. Смену завершенного этапа на незавершенный и наоборот можно рассматривать как изменчивость поведения на макроуровне. Эта изменчивость связана с тем, что поведение на макроуровне чувствительно к некоторым изменениям на микроуровне: к тому, на каком этапе отбрасывалась ранее захваченная песчинка и, в конечном счете, к качеству случайно попавшейся песчинки.

На микроуровне появление определенных этапов не запрограммировано их присутствием в предыдущем цикле и определяется, по-видимому, случайными причинами. Другие этапы, входящие в цикл, частично запрограммированы. Этап, на котором отбрасывается песчинка в незавершенном цикле, зависит от того, была ли приклеена к домику или отброшена предыдущая песчинка. Если ручейник начал передвигаться после отбрасывания очередной песчинки, то это передвижение имеет тенденцию к повторению и в последующих циклах, но прерывается, если очередной цикл завершен. В то же время пер-

вое проявление передвижения вызывается, вероятно, случайными причинами и не запрограммировано предыдущим поведением ручейника.

Перечисленные закономерности приводят к тому, что в целом строительное поведение личинок ручейников состоит из более или менее длительных стереотипных последовательностей – повторений завершенных и незавершенных циклов, а также незавершенных циклов, включающих передвижение – неожиданно сменяющих друг друга. В составе самих циклов могут происходить изменения, но далеко не все они отражаются на указанных стереотипах.

Таким образом, ручейники при строительстве домика проявляют одновременно и запрограммированность инстинктивного поведения и его изменчивость. Адаптивное значение наблюдавшейся стереотипности в поведении неясно: трудно объяснить, почему личинки отбрасывают попадающиеся песчинки, невзирая на их качество, и почему они, начав передвигаться, переходят с места на место, не обследуя песчинки, лежащие у них под ногами. Однако эти свойства поведения ручейников поддаются объяснению исходя из представлений об устойчивости и случайном поведении динамических систем. Можно предположить, что система, управляющая поведением насекомого, может находиться в одном из нескольких относительно устойчивых состояний, которым соответствуют запрограммированные стереотипы на макроуровне. В силу устойчивости возмущения, происходящие на микроуровне, в основном не оставляют следа в дальнейшем поведении. Однако некоторые из них оказывают длительное последствие и отражаются на макроуровне. Тогда система переходит в другое состояние, чем и объясняется наблюдаемая изменчивость поведения. Такой подход позволяет избежать предположений о наборе врожденных программ у ручейников. Они не существуют заранее, а по существу формируются в ходе инстинктивного поведения одной и той же управляющей системой.

Л и т е р а т у р а

1. А с л а н я н Е.М., Ф и л и м о н о в П.М. Сравнение по двигательным элементам строительного инстинкта у „песчаных” и „лиственного” ручейников // Управление поведением животных. М., 1977.
2. Б а р а н о в В.В., Б е р л о в С.П., М а т ю х и н В.Н., П о з и н Н.В. Этограмма восстановления домика личинкой ручейника *Potamophylax rotundipennis* Brauer (Trichoptera, Limnophilidae) // Вестн. Моск. ун-та. Сер. биология и почвоведение. 1973. № 5.
3. К о з л о в А.Т. Строительное поведение личинок ручейника *Limnophilus stigma* при сооружении лиственных и песчаных домиков // Зоол. журн. 1979. № 3.
4. К о з л о в А.Т., С в е ш н и к о в В.А. Поведение личинок ручейника *Neureclipsis bimaculata* L. при строительстве до-

- мика в условиях эксперимента // Управление поведением животных. М., 1977.
5. Лепнева С.А. Ручейники // Фауна СССР. М.; Л., 1966. Т. 2, вып. 2.
 6. (Crutchfield J.P., Farmer J.D., Packard N.H., Shaw R.S.) Кратчфилд Дж.П., Фармер Дж.Д., Паккард Н.Х., Шоур С. Хаос // В мире науки. 1987. № 2.
 7. (Dembowski J.) Дембовский Я. Психология животных. М., 1959.
 8. (Dewsbury D.) Дьюсбери Д. Поведение животных. М., 1981.
 9. Hansell M.H. The house building behaviour of the caddis-fly larva *Silo pallipes* Fabricius // Anim. Behav. 1968. Vol. 16, N 4.
 10. May R.M. Biological populations with nonoverlapping generations: stable points, stable cycles and chaos // Science. 1974. Vol. 186, N 4164.
 11. Olsen L.F., Degn H. Chaos in an enzyme reaction // Nature. 1977. Vol. 267, N 5607.
 12. Williams D.D., Penac B.L. Some aspects of case building in *Phryganea cinirea* Walker (Trichoptera, Phryganeidae) // Anim. Behav. 1980. Vol. 28, N 1.
 13. Zintl H. Zum problem der Wahl des Baumaterials bei der Larva von *Potamophylax latipennis* Curt (Trichoptera, Limnophilidae) // Ztschr. Tierpsychol. 1970. Bd 27, N 2.

ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Открытие холинэстераз (ХЭ) относится к 1906 г. [83]. В 1943 г. было высказано предположение о существовании двух типов ферментов, названных „истинными холинэстеразами“ и „псевдохолинэстеразами“. Согласно последней номенклатуре, они соответствуют двум группам: ацетилхолинэстеразе-ацетилхолинацетилгидролазе, К.Ф. 3.1.1.7 (АХЭ) и холинэстеразе-ацилхолинацилгидролазе, К.Ф. 3.1.1.8 (БуХЭ) [35, 71].

Основная функция АХЭ – гидролиз ацетилхолина (АХ) – медиатора холинергических синапсов нервной системы [33, 39]. Имеются также данные, свидетельствующие о непосредственном участии системы АХ-АХЭ в осуществлении нервного проведения вдоль аксона [96, 109], а также сведения, согласно которым АХ кроме медиаторной функции может выполнять в организме роль регулятора метаболизма и внутриклеточного транспорта [7, 38, 57, 58, 61, 62, 84, 102]. Функция БуХЭ в организме остается до настоящего времени невыясненной. Вероятно, этот фермент, как и АХЭ, связан с метаболизмом АХ [27, 36, 37, 39, 106], но менее специфичен, так как наряду с АХ гидролизует с высокой скоростью и другие холиновые эфиры.

АХЭ и БуХЭ существенно различаются по кинетическим свойствам и субстратной специфичности. Оптимальный субстрат для АХЭ – АХ, а для БуХЭ – бутирилхолин (БуХ). Избыток субстрата тормозит активность АХЭ, БуХЭ этим свойством не обладает, с увеличением концентрации субстрата ее активность возрастает. Избирательным субстратом для АХЭ служит ацетил- β -метилхолин (МеХ), а для БуХЭ – БуХ и бензоилхолин (БэХ), практически не гидролизующийся под действием АХЭ. Способностью угнетать активность ХЭ обладают бисчетвертичные аммониевые и фосфорорганические соединения, карбаматы.

ХЭ посвящен ряд обзоров и монографий [2, 12, 20, 33, 39, 50, 52, 95, 100]. Наиболее изучены ферменты млекопитающих и наземных насекомых. Классическим примером АХЭ считается фермент эритроцитов крови человека и быка, мозга млекопитающих и электрического органа рыб, а БуХЭ – фермент сыворотки крови человека и лошади.

Материалы по ХЭ водных животных не обобщались. Вместе с тем их изучение важно не только для накопления сведений о ХЭ как группе ферментов, но и в связи с интенсивным использованием в качестве пестицидов фосфорорганических соединений (ФОП), ингибиторов ХЭ. С возрастанием масштабов применения ФОП возникла необходимость оценки их опасности и поиска биологических индикаторов загрязнения водоемов. Таким показателем может быть угне-

тение активности ХЭ. В целях уменьшения отрицательного влияния пестицидов рассматривается также проблема синтеза препаратов селективного действия. Один из наиболее возможных путей создания высокоизбирательных препаратов – синтез по аналогии или строго обоснованное конструирование на основе биохимических данных. Показано, что избирательная токсичность ФОП может быть обусловлена различиями в структуре и свойствах АХЭ различных животных [40].

Учитывая актуальность изучения ХЭ водных животных, мы обобщили и проанализировали литературные данные и материалы собственных исследований по этому вопросу.

Беспозвоночные

Черви. Исследований, посвященных изучению свойств и идентификации ХЭ червей, крайне мало. В основном ХЭ выявлялись гистохимическими методами, позволяющими судить лишь о локализации фермента. ХЭ-ная активность найдена у червей в нервной [11, 30, 41–43, 67, 75, 76, 85] и мышечной [3, 5, 41–43, 67, 75, 85] тканях.

По имеющимся данным, идентифицировать ферменты нервной системы не представляется возможным, можно судить лишь об их некоторых свойствах. Так, у *Dugesia lugubris* и *Bdellocephala punctata* при использовании наряду с АХ других субстратов выявляется БУХЭ-ная активность. Селективные ингибиторы АХЭ и БУХЭ угнетают реакцию как с АХ, так и с БУХ. Это дает возможность предполагать, что в таких случаях АХ и БУХ гидролизуются одним ферментом, обладающим свойствами и АХЭ, и БУХЭ [41, 42]. У *Planaria doroccephala* активность фермента не угнетается высокими концентрациями АХ. Это сближает его с БУХЭ. Однако наряду с АХ фермент гидролизует MeX, что свойственно для АХЭ. Эзерин ингибирует активность данного фермента в концентрации большей, чем АХЭ мозга человека [78].

Для фермента брюшной нервной цепочки медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* характерна практически одинаковая максимальная скорость гидролиза ацетилтихолина (АТХ) и бутирилтихолина (БУТХ) (9600 и 8400 мкмоль/(г·ч) соответственно), но сродство к БУТХ выше, чем к АТХ (константа Михаэлиса (K_m) равняется $0.64 \cdot 10^{-4}$ и $1.41 \cdot 10^{-4}$ М соответственно). Эзерин ингибирует фермент в концентрации 10^{-5} М, специфические ингибиторы АХЭ (BW 284C51) и БУХЭ (мипафокс, этопропазин) снижают гидролиз обоих субстратов в одинаковой степени [99]. Не исключена возможность, что в нервной системе некоторых видов червей присутствует не один, а два фермента. При изучении скорости гидролиза АХ ферментом *Planaria torva* установлены 2 оптимума концентраций, что может быть обусловлено наличием у этого вида планарий 2 энзимов или изоэнзимов [75].

Ферменты мышц червей подробно изучены только у двух видов: у *Lumbriconereis impatiens* и *Physcosoma japonicum*. Спинные мышцы первого содержат один фермент типа АХЭ, другой — типа БуХЭ, но с пониженной чувствительностью к эзерину и некоторым фосфорорганическим ингибиторам. В мышцах ретрактора хоботка *Ph. japonicum* тоже присутствует один фермент со свойствами АХЭ, второй со свойствами БуХЭ. Оба фермента имеют некоторые различия по субстратной специфичности и по чувствительности к ингибиторам как от ХЭ млекопитающих, так и от ферментов мышц *Lumbriconereis impatiens* [3, 5].

ХЭ гомогенатов целых организмов филогенетически более молодых пиявок семейств *Hirudinidae* и *Erbobdellidae* (отр. *Arhynchobdellea*) имеют большую удельную активность, чем ферменты пиявок семейств *Glossiphonidae* и *Piscicolidae* (отр. *Rhynchobdellea*). Предпочитаемый субстрат — пропионилтиохолин (ПрТХ); БуТХ и АТХ гидролизуются менее интенсивно. Ферментативная активность не тормозится избытком субстрата [28].

Таким образом, по своим свойствам ХЭ червей весьма вариabельны и существенно отличаются от типичной АХЭ и БуХЭ млекопитающих. Активность ферментов коррелирует с типом поведения животного: у более подвижных видов она выше.

Членистоногие. Исследования, посвященные ХЭ водных членистоногих, также немногочисленны. Изучение их в значительной степени осложняется трудностями в приготовлении препаратов ферментов отдельных органов и тканей.

Показано, что фермент брюшной нервной цепочки *Homarus vulgaris* проявляет свойства АХЭ и гидролизует АХ, пропионилхолин (ПрХ), МеХ и БуХ в соотношении 100:75:66:14 соответственно [97]. У *Libinia emarginata* и *Homarus americanus* фермент нервов ходильных ног обладает более высокой специфичностью к АХ (соответственно 1.2 и 0.25 ммоль АХ-хлорида / (г.ч) [69]), чем фермент брюшной нервной цепочки *H. vulgaris* (0.185 ммоль АХ-хлорида / (г.ч) [97]). В центральном и периферическом ганглиях и нервах *Palunurus argus*, *P. guttatus* и *Homarus americanus* методом электрофореза в полиакриламидном геле выявлены 2 фермента с ХЭ-ной активностью, различающихся по электрофоретической подвижности и субстратной специфичности. Один из них гидролизует АТХ с очень высокой скоростью, а другой, более подвижный, гидролизует БуТХ и не гидролизует АТХ. Эзерин в концентрации 10^{-5} М полностью угнетает активность обоих ферментов. Диметилдихлорвинилфосфат (ДДВФ) в концентрации 10^{-6} М ингибирует фермент, гидролизующий БуТХ, а в концентрации 10^{-5} М — АТХ [93].

Гомогенаты голов *Asellus aquaticus*, целых организмов *Succinea* sp. и личинок *Chironomus plumosus* также с наибольшей скоростью гидролизуют АТХ-йодид. Гидролиз пропионилтиохолинйодида (ПрТХ-йодид) составляет 78–55 % от гидролиза АТХ-йодида в зависимости от вида животного, БуТХ-йодид в наибольшей степени расщепляется гомогенатами личинок *Ch. plumosus*. Чувствитель-

ность ферментов разных животных к одному и тому же ФОР не одинакова, однако различия не превышают 60 раз [24].

У перечисленных выше видов членистоногих в нервной системе имеется или 1 фермент со свойствами АХЭ, или 2 фермента: АХЭ и БуХЭ. Гомогенаты голов или целых организмов в основном обладают АХЭ-ной активностью, каталитическая активность к БуХ незначительна, существенных различий в чувствительности ферментов к ингибиторам не выявлено.

Моллюски. В основном исследовали ХЭ у представителей 3 классов: брюхоногих (*Gastropoda*), двустворчатых (*Bivalvia*) и головоногих (*Cephalopoda*). Согласно имеющимся сведениям, ХЭ найдены у них в нервной системе, гемолимфе, сердце и мышцах аддуктора.

У осьминогов (*Octopus sp.*, *Eledone mosshata*) фермент ганглиев близок по свойствам к АХЭ бычьих эритроцитов [13, 15]. Фермент зрительного ганглия *Octopus dofleini* также обладает сходством с АХЭ, но в меньшей степени угнетается избытком АХ и активен в отношении БзХ [87].

В нервных ганглиях брюхоногих моллюсков (*Limnaea stagnalis*, *Planorbis corneus*, *Aplisia californica*, *Anodonta cygnea*) присутствует фермент со свойствами АХЭ, но он отличается от типичной АХЭ большим сродством к БуХ [8, 9, 14, 22, 23, 49, 70, 103, 107]. Кроме того, фермент *Limnaea stagnalis* гидролизует почти с одинаковой скоростью и АХ, и ПрХ [14, 22, 107]. Фермент *Planorbis corneus* в сравнении с ферментом *Limnaea stagnalis* имеет меньшую электрофоретическую подвижность и чувствительность к ингибиторам [8, 9, 22, 49]. Для фермента зрительного ганглия кальмара *Ommastrephes sloanei-pacificus* свойственны близкие величины скоростей гидролиза АХ и БуХ. Катализируя гидролиз БуХ с высокой скоростью, фермент гидролизует MeX. По ряду кинетических параметров энзим обладает сходством как с АХЭ, так и с БуХЭ [1, 13, 21]. В зрительном ганглии кальмара *O. bartrami* идентифицированы две ХЭ. Один фермент по своим свойствам близок к АХЭ млекопитающих, для второго характерны высокий гидролиз БуХ-йодида и высокая реакционная способность по отношению к гидрофобным фосфорорганическим соединениям [47, 48].

Зрительные ганглии кальмаров (*Todarodes sagittatus*, *Stenoteuthis oualaniensis*, *Thysanoteuthis rhombus*) и каракатицы (*Sepia officinalis*) содержат 2 фермента. Один из них - типичная АХЭ, другой - разновидность БуХЭ, обладающий низкой субстратной избирательностью. Он наряду с БуХ гидролизует MeX, и его активность угнетается высокими концентрациями БуХ [15, 16]. В других органах и тканях моллюсков (гемолимфа, сердце, мышцы) также содержится 1 или 2 фермента. В большинстве случаев активность тканей обусловлена 1 ферментом, относящимся к типу АХЭ, хотя в некоторой степени при этом может иметь место гидролиз БуХ [17, 18, 74, 104]. Есть виды с высокой БуХЭ-ной активностью тканей, они имеют тоже 1 фермент; но по своим свойствам он занимает

промежуточное положение между АХЭ и БуХЭ [17-19]. Наряду с этим встречаются животные, в тканях которых присутствуют 2 фермента: типичная АХЭ и фермент со свойствами БуХЭ, обладающий меньшей избирательностью к субстратам [111].

Зависимости распределения типов ферментов между классами моллюсков не прослеживается и в сравнении с высшими позвоночными закономерностей в локализации типов ферментов в органах и тканях не выявляется. Напротив, ХЭ сердечной мышцы *Ostropus sp.* и *O. sloanei-pacificus* близки по своим свойствам или субстратной специфичности к ХЭ зрительного ганглия этих видов [17], так же как ферменты гемолимфы *Limnaea stagnalis* и *Planorbis corneus* близки к ферментам нервной системы [18]. Как и у червей, активность ферментов выше у более подвижных моллюсков.

Ферменты моллюсков существенно различаются по чувствительности к ингибиторам. Чувствительность одного фермента к разным ингибиторам, так же как разных ферментов к одному ингибитору, может варьировать от 10 до 10 000 раз, в том числе и к специфическим ингибиторам АХЭ и БуХЭ. Вероятно, эти различия обусловлены особенностями строения активной поверхности ферментов. Отличия по чувствительности к ингибиторам, кинетическим характеристикам и субстратной специфичности свидетельствуют о множественности форм ферментов и затрудняют их безоговорочное отнесение к существующим типам ХЭ.

Позвоночные

Круглоротые. ХЭ нервной ткани миноги *Petromyzon fluviatilis* по ряду кинетических характеристик (pS - и pH -оптимум, число оборотов, чувствительность к ингибиторам Гд-42 и Гд-7) близка к АХЭ мозга белых мышей, но отличается более низким уровнем активности (74 и 572 мкмоль АХ/(г·ч) соответственно), что обусловлено меньшим содержанием фермента в ткани [6]. У речной миноги *Lampetra fluviatilis* активность АХЭ мозга тоже невысока. Из отделов мозга наиболее активен средний и промежуточный мозг - 79 мкмоль АХ/(г·ч). АХЭ выявляется равномерно по всей цитоплазме очень крупных нейронов. Гистохимическая реакция с БуТХ почти полностью воспроизводит реакцию с АТХ. Сходство гистохимических картин с АТХ и БуТХ и нечувствительность реакции с БуТХ к диизопропилфторфосфату (ДФФ), ингибирующему БуХЭ в 10^{-7} М, позволяет предполагать, что гидролиз БуТХ обусловлен АХЭ [29]. У *Myxine glutinosa* АХЭ мозга гидролизует АХ и МеХ с одинаковой скоростью (40 мкл CO_2 /(100 мг ткани × 30 мин)). В плазме крови *M. glutinosa* ни АХЭ-, ни БуХЭ-ная активность не выявлены, а гомогенаты мышц гидролизуют АХ, МеХ и БзХ в соотношении 100:29:5 соответственно.

Рыбы. В мозге хрящевых и гангоидных рыб содержание АХЭ выше, чем у круглоротых, и еще более высокое у костистых рыб

Т а б л и ц а 1
Активность АХЭ мозга костистых рыб, мкмоль субстрата/(г.ч)

Вид рыбы	Условия проведения опыта			Активность фермента	Литературный источник
	температура, °С	pH	субстрат		
<i>Lagodon rhomboides</i>	22	7.0	AXI	2290±210	[66]
<i>Lepomis macrochirus</i>	25	8.2	AXBr	2790±300	[77]
<i>L. macrochirus</i>	-	7.6	AXI	1500	[82]
<i>L. gibbosus</i> *	38	-	AXC1	1450±70	[94]
<i>L. cyanellus</i>	-	8.2	AXC1	1400±240	[108]
<i>Micropterus dolomieu</i> *	38	-	AXC1	1460±40	[94]
<i>Ictalurus punctatus</i>	22	7.0	AXI	1410±50	[65]
<i>I. punctatus</i>	-	7.6	AXI	2600	[82]
<i>I. melas</i> *	38	-	AXC1	2270±50	[94]
<i>Pseudopleuronectes americanus</i> *	38	-	AXC1	1940±90	[94]
<i>Myoxocephalus scorpius</i> *	38	-	AXC1	1360±70	[94]
<i>Brevoortia tyrannus</i>	25	8.2	AXC1	1090	[110]
<i>Micropogon undulatus</i>	25	8.2	AXC1	1480	[110]
<i>Cyprinodon variegatus</i>	22	7.0	AXI	1360±170	[64]
<i>Salmo gairdneri</i>	25	7.4	AXC1	978	[105]
<i>Perca fluviatilis</i>	37	7.4	AXC1	1140±110	[34]
<i>Acerina cernua</i>	37	7.4	AXC1	850±70	[105]
<i>Rutilus rutilus</i>	37	7.4	AXC1	2960±220	[105]
<i>Cyprinus carpio</i>	25	7.5	AXBr	1420	[4]
<i>Pimephales promelas</i>	-	8.2	AXC1	1400-4200	[108]
<i>Carassius auratus</i>	-	8.2	AXC1	1400-2400	[108]
<i>C. auratus</i>	-	7.0	ATXI	880±50	[86]

* Активность фермента пересчитана по формуле: $A = \frac{\text{мкл } CO_2 \cdot 60}{22.4 \cdot 10^{-3} \cdot t \cdot P}$ [2],
где t - время инкубации, мин; P - навеска мозга, г.

(табл. 1) [29, 52]. Однако так же, как у круглоротых, наибольшей АХЭ-ной активностью у рыб обладает средний и промежуточный мозг. У низших рыб фермент равномерно распределен по всей цитоплазме очень крупных нейронов. У костистых рыб вместе с тем наблюдается концентрирование фермента в определенных синаптических областях. АХЭ хрящевых и ганглийных рыб имеет меньшую субстратную

специфичность, чем фермент костистых. Так, у скатов и осетровых в цитоплазме нервных клеток выявляется отчетливая гистохимическая реакция с БуТХ, полностью воспроизводящая реакцию с АТХ. Гомогенаты мозга этих рыб гидролизуют БуХ лишь в 2 раза медленнее, чем АХ, в то время как гомогенаты мозга костистых рыб гидролизуют БуХ совсем незначительно [29]. MeX по сравнению с АХ активнее разрушается ферментом хрящевых рыб (*Scyliorhinus canicula*, *Squalus acanthias*, *Raja radiata*), чем костистых (*Gadus callarias*, *Labrus bergylta*) [52].

Фермент мозга костистых рыб по своим свойствам сходен с АХЭ млекопитающих. Так, гомогенатами мозга *Cyprinus carpio* с наибольшей скоростью гидролизуется АХ, MeX – значительно хуже. Скорость гидролиза для MeX в 3,4 раза ниже, а для K_m – на порядок выше, чем для АХ. Гидролиз обоих субстратов тормозится их избытком. БуХЭ-ная активность очень низкая. ХЭ-ная активность гомогенатов мозга карпа тормозится эзеринном и фосфорорганическими ингибиторами. Эзерин ингибирует фермент в концентрации 10^6 М. Взаимодействие фермента с фосфорорганическими ингибиторами зависит от их строения. В наибольшей степени фермент чувствителен к Гд-42 – избирательному ингибитору АХЭ эритроцитов. Бимолекулярная константа скорости ингибирования (K_{II}) с ГТ-106 – избирательным ингибитором БуХЭ – на 2 порядка ниже, чем для БуХЭ сыворотки крови лошади, и близка к K_{II} для эритроцитарной АХЭ. Активность каталитического центра АХЭ карпа составляет 326 000 моль/мин, что сближает ее с АХЭ эритроцитов быка. Максимальная активность фермента отмечается при pH 8.1 и незначительно меняется в интервале pH 7.5–8.5 [4]. Фермент мозга морской рыбы *Cumatogaster aggregata* тоже АХЭ. АХ гидролизуются им намного интенсивнее, чем БуХ. Соотношение скоростей гидролиза этих субстратов 100:7. При высоких концентрациях АХ имеет место субстратное торможение, оптимальная концентрация АХ – $1.8 \cdot 10^{-3}$ М, K_m – $2.2 \cdot 10^{-4}$ М. Оптимум pH – 7.2, при pH 7–7.5 гидролизующая способность фермента близка к максимальной [51]. Фермент мозга линя (*Tinca vulgaris*) гидролизует АХ, ПрХ, БуХ в соотношении 100:45:5 соответственно.

Кривая зависимости активности фермента от концентрации субстрата имеет характерную колоколообразную форму, оптимальная концентрация АХ-йодида – $4 \cdot 10^{-3}$ М при pH 7.73 и температуре 37 °С. K_m фермента с АХ-йодидом равна $6.5 \cdot 10^{-4}$ М и сходна с K_m для АХЭ эритроцитов человека, мозга собаки и электрического органа рыб. Концентрация ингибитора, вызывающая 50%-ное угнетение активности фермента I_{50} , для эзерина равна $3.7 \cdot 10^{-7}$ М, для прозерина – $9.3 \cdot 10^{-7}$ М [88]. У *Lepomis macrochirus*, *Ictalurus punctatus*, *Salmo clarki* и *S. gairdneri* фермент с наибольшей скоростью гидролизует АХ, с наименьшей – ПрХ и MeX; БуХ и БэХ практически не гидролизуются. Активность фермента угнетается высокими концентрациями субстратов. Чувствительность их к одним и тем же фосфорорганическим ингибиторам сходна (табл. 2) [79, 80, 82]. Аналогичное соотношение скоростей гидролиза АХ

Т а б л и ц а 2

Чувствительность АХЭ мозга костистых рыб к ингибиторам (pI_{50})

Вид рыбы	Ээрин	62С47	ДФФ	ДДВФ	Параоксон	Малаоксон	Литературный источник
Сем. Centrarchidae							
<i>Lepomis macrochirus</i> **	6.6	5.2	4.4	5.6	5.8	6.8	[82]
Сем. Ictaluridae							
<i>Ictalurus punctatus</i> **	6.7	5.4	6.1	6.3	6.7	6.2	[82]
Сем. Salmonidae							
<i>Salmo clarki</i> **	6.8	5.0	4.1	6.1	5.4	-	[80]
<i>S. gairdneri</i> **	6.3	4.5	-	-	-	-	[79]
Сем. Cyprinidae							
<i>Rutilus rutilus</i> *	-	-	-	5.4	-	6.8	[10, 45]
<i>Abramis brama</i> *	-	-	-	5.3	-	-	[45]
<i>Cyprinus carpio</i> *	-	-	-	5.6	-	7.3	[10, 44]
Сем. Percidae							
<i>Perca fluviatilis</i> *	-	-	-	5.4	-	7.2	[10, 44]

* Значения pI_{50} (отрицательный логарифм I_{50}) рассчитаны по значениям K_{II} (по: [56]).

** Время инкубации с ингибитором 40 мин, в остальных случаях - 30 мин.

Кинетические характеристики АХЭ мозга рыб

Вид	Условия определения		K _m , M	Оптимальная концентрация АХ, M	Оптимальная рН	Литературный источник
	рН	температура, °С				
<i>Cyprinus carpio</i>	7.5	25	1.64·10 ⁻⁴	2·10 ⁻³	7.5-8.5	[4]
<i>Cumatogaster aggregata</i>	7.2	37	2.2·10 ⁻⁴	1.8·10 ⁻³	7.0-7.5	[51]
<i>Tinca vulgaris</i> *	7.7	37	6.5·10 ⁻⁴	4·10 ⁻³	-	[88]
				(2.5·10 ⁻³ -10 ⁻²)		
<i>Lepomis macrochirus</i>	7.6	-	-	1·10 ⁻²	-	[82]
<i>Ictalurus punctatus</i>	7.6	-	-	1·10 ⁻²	-	[82]
<i>Salmo clarki</i>	7.6	-	-	1·10 ⁻²	-	[80]
				(3.2·10 ⁻³ -6.3·10 ⁻²)		
<i>S. gairdneri</i>	7.2	15	-	1·10 ⁻²	-	[78]
<i>Cyprinodon variegatus</i>	7.0	22	-	1·10 ⁻²	7.0-7.5	[63]
<i>Rosucus americanus</i>	7.4	37	2.09-2.39·10 ⁻⁴	1·10 ⁻²	-	[72]
				(7.5·10 ⁻³ -2.5·10 ⁻²)		
<i>Lepomis gibbosus</i>	7.4	37	3.78·10 ⁻⁴	1.5·10 ⁻²	-	[73]
				(1·10 ⁻² -5·10 ⁻²)		
<i>Rutilus rutilus</i>	7.4	37	-	1.8·10 ⁻³	7.1-8.5	[34]
<i>Acerina cernua</i>	7.4	37	-	2·10 ⁻³	7.1-8.5	[34]
<i>Perca fluviatilis</i>	7.4	37	-	1.8·10 ⁻³	7.1-8.5	[34]

Примечание. Цифры в скобках - концентрации, при которых активность фермента меняется незначительно.

* K_m определена при температуре 34.5 °С.

и MeX наблюдается и у *Cyprinodon variegatus*. Кривая рS-активности для обоих субстратов типичной колоколообразной формы. Максимальная активность фермента с AX, так же как и у перечисленных выше видов рыб, выявляется при концентрации субстрата 10^{-2} M (табл. 3). AXЭ мозга плотвы (*Rutilus rutilus*), окуня (*Perca fluviatilis*) и ерша (*Acerina cernua*) обладает сходными свойствами. Зависимость скорости ферментативного гидролиза AX гомогенатами мозга от концентрации субстрата выражается колоколообразной кривой. Оптимальная концентрация субстрата порядка 10^{-3} M. Активность ферментов существенно не меняется при pH 7.1–8.5. Наибольшей активностью обладает фермент мозга плотвы. У окуня и ерша уровень активности в 2–3 раза ниже [34]. AXЭ мозга плотвы и окуня имеет одинаковую чувствительность к фосфорорганическим ингибиторам (ДДВФ, малаоксон), такую же как фермент мозга карпа (*Cyprinus carpio*), леща (*Abramis brama*) (см. табл. 2). K_{II} и pI_{50} малаоксона, ДДВФ для фермента этих и некоторых других видов рыб близки и сходны с константами ингибирования для AXЭ млекопитающих [10, 44, 45].

Методом электрофореза в полиакриламидном геле показано, что AXЭ мозга рыб может быть представлена одной или несколькими молекулярными формами. Так, у форели (*Salmo gairdneri*) в зависимости от температуры обитания выявляется 1 или 2 фракции фермента. При низкой температуре (2 °C) обнаружена одна медленно мигрирующая фракция, при высокой температуре (12 °C) – обе фракции. Кинетические характеристики фракций (соотношение скоростей гидролиза эфиров холина, рS-оптимум и pH, удельная активность, энергия активации) одинаковы при разных температурах. Однако сродство к субстрату зависит от температуры. Наименьшее значение K_m для первой фракции отмечено при 2 °C, для второй – при 17 °C [56]. У тропических видов рыб (*Mugil cephalus*, *Elops hawaiiensis*, *Parupenens chryserydros*, *Euthynnus yaito*) и антарктического *Trematodus borchgr-evinki* имеется 1 фракция AXЭ [55]. Вместе с тем у антарктических видов *Notothenia gibberifrons* и *Pseudochaenichthys georgianus* AXЭ мозга представлена соответственно 4 и 2 фракциями [98]. В гомогенатах мозга *Carassius auratus* выявлено 5 фракций AXЭ. После введения рыбам ДФФ, необратимого ингибитора ХЭ, все фракции инактивируются в одинаковой степени, однако их активность восстанавливается с различной скоростью [86]. При денситометрии электрофореграмм AXЭ мозга *C. carassius* выделяются 4 фракции. Острая интоксикация рыб хлороформом вызывала полное инактивирование в первую очередь двух более подвижных фракций [25].

В плазме крови хрящевых и у большинства костистых рыб содержание ХЭ значительно ниже, чем в мозге (табл. 4). По субстратной специфичности и по чувствительности к ингибиторам (эзерин, мипафокс, изо-ОМПА) фермент плазмы крови *Squalus acanthias*, *Scyliorhinus canicula*, *Lophius piscatorius*, *Esox lucius*, *Gadus callarias*, *Labrus bergylta*, *Anquilla anqu-*

Активность и субстратная специфичность ХЭ плазмы и сыворотки крови

Вид	Субстрат	Активность фер- мента, мкмоль/(см ³ .ч)	Относительная скорость гидролиза суб- стратов				Литературный источник	
			АХ	ПрХ	БуХ	МеХ		БэХ
Х р я щ е в ы е								
<i>Squalus acanthias</i>	АХС1	4	100	75	25.0	25.0	25.0	[52, 54]
<i>Scyliorhinus canicula</i>	АХС1	8	100	-	-	50.0	10.0	[52]
К о с т и с т ы е								
<i>Lephius piscatorius</i>	АХС1	12	100	46	30.8	15.4	38.4	[54]
<i>Esox lucius</i>	АХС1	11	100	16,7	8,3	8,3	8,3	[54]
"	АХ1	46,6	-	-	-	-	-	[81]
<i>Gadus callarias</i>	АХС1	5	100	67	50.0	33.0	16.7	[54]
<i>Labrus bergylla</i>	АХС1	4	100	50	50.0	25.0	25.0	[54]
<i>Anguilla anguilla</i>	АХС1	9	100	40	30.0	20.0	40.0	[54]
<i>Electrophorus electricus</i>	АХС1	370	100	-	5,8	28,8	0	[54]
<i>Ictalurus melas</i>	АХ1	28,2	-	-	-	-	-	[81]
<i>I. punctatus</i>	АХ1	28,1	100	57	-	7,0	-	[81]
<i>I. natalis</i>	АХ1	17,7	-	-	-	-	-	[81]
<i>Esox americanus</i>	АХ1	46,6	-	-	-	-	-	[81]
<i>Cyprinus carpio</i> *	АХВr	6,8	100	50	-	-	-	Собственные данные
<i>Abramis brama</i> *	АХ1	4,5	100	40	12,0	-	-	То же
" "	АХ1	24,7**	20	48	100,0	-	-	"
<i>Rutilus rutilus</i> *	АХ1	61,3	32	45	100,0	-	-	"
<i>Perca fluviatilis</i> *	АХВr	1,5	100	57	-	-	-	"

* Для определения использованы тиохиноновые аналоги соответствующих субстратов.

** Встречается у 23 % рыб.

illa, *Electrophorus electricus* идентифицируется как АХЭ [52, 54, 112]. Плазма *Ictalurus punctatus* также с наибольшей скоростью гидролизует АХ, а БУХ и БЭХ практически не гидролизуются. Каталитическая активность фермента угнетается избытком субстрата и максимальна при концентрации АХ 10^{-2} М. По чувствительности к ингибиторам фермент идентичен АХЭ мозга данного вида [81]. Активность ферментов сыворотки крови *Cyprinus carpio* и *Perca fluviatilis* близка активности ферментов плазмы перечисленных выше видов рыб. Они интенсивно гидролизуют АХ, обладают высоким сродством к ПрХ; БУХ не гидролизуются. Чувствительность их к ДДВФ аналогична чувствительности АХЭ мозга этих рыб. K_{II} для фермента сыворотки крови карпа - $(6.92 \pm 0.39) \cdot 10^3$ л/(моль·мин), окуня - $(5.59 \pm 0.17) \cdot 10^3$, для фермента мозга карпа - $(9.2 \pm 0.33) \cdot 10^3$, окуня - $(5.6 \pm 0.14) \cdot 10^3$ л/(моль·мин) [44, 45]. Методом электрофореза в полиакриламидном геле у *Cyprinus carpio* выявляется 1 фракция, у *Perca fluviatilis* - 2 фракции, обладающие одинаковой специфичностью. У обоих видов выявленные фракции имеют близкую относительную электрофоретическую подвижность (ОЭП) ~ 0.07 [46].

У рыб с высокой ХЭ-ной активностью сыворотки крови (*Abramis brama*, *A. ballerus*, *Rutilus rutilus*) тоже установлено наличие 2 фракций. Одна фракция имеет ОЭП 0.07, гидролизует АХ и ПрХ. Другая обладает большей ОЭП (0.26 у синца и леща, 0.29 у плотвы) и гидролизует АХ, ПрХ и БУХ. Наибольшее сродство фермент проявляет к БУХ. Активность первой фракции угнетается высокими концентрациями АХ. Субстратного торможения второй фракции не наблюдалось. Значение K_{II} ДДВФ для менее подвижного фермента около $8 \cdot 10^3$ л/(моль·мин), более подвижного - $2 \cdot 10^7$ л/(моль·мин). По субстратной специфичности и по чувствительности к ингибиторам (эзерин, ДДВФ) первая фракция обладает свойствами АХЭ, а вторая - БУХЭ [26, 45]. У *Abramis brama* выявлены 2 фенотипа (А и Б). Фенотип А имеет фермент типа БУХЭ, у фенотипа Б такой фермент отсутствует [46].

Мышечная ткань большинства видов рыб, как и сыворотка крови, обладает меньшей активностью в отношении АХ, чем мозг (табл.5). У более подвижных видов гидролизующая способность ферментов выше [59]. Встречаются виды, у которых каталитическая активность ферментов мышц близка к активности ферментов мозга. Так, у *Carassius auratus* и *Lebistes sp.* АХ гидролизуются со скоростью 1554 и 1925 мкмоль/(г·ч) соответственно [53, 59]. Ферменты мышц *Carassius auratus* и *Lebistes sp.* по ряду свойств сходны с АХЭ. Кривая зависимости активности ферментов от концентрации субстрата имеет характерную колоколообразную форму. БУХ гидролизуются незначительно. Специфический ингибитор АХЭ ВВ 284С51 угнетает их активность в такой же степени, как и АХЭ электрического органа рыб и эритроцитов человека. Чувствительность к мипафоксу, преимущественно ингибирующему БУХЭ, ниже. Для фермента *Carassius auratus* и *Lebistes sp.* pI_{100} равняется 3, а для БУХЭ сыворотки крови человека - 6.5 [89, 90].

Т а б л и ц а 5

Активность и субстратная специфичность ХЭ мышц

Вид	Активность фермента, мкмоль АХСЛ/(г.ч)	Относительная скорость субстратов				Литературный источник
		АХ	ПрХ	БуХ	гидролиза МеХ БэХ	
Х р я ш е в ы е						
<i>Raja radiata</i>	65	100	-	-	30.0	12.3 [52]
<i>Squalus acanthias</i>	44	100	-	-	45.0	4.1 [52]
К о с т и с т ы е						
<i>Labrus bergylta</i>	41	100	-	-	45.6	15.2 [52]
<i>Gadus callarias</i>	62	100	-	-	37.2	12.9 [52]
<i>G. pollachius</i>	-	100	-	40	17.0	- [91]
<i>Pleuronectes platessa</i>	-	100	41	59	5.0	13.0 [92]
<i>Lebistes sp.</i>	1925	100	75	12	-	- [53]
<i>Carassius auratus</i>	1554	-	-	-	-	- [59]
<i>C. auratus</i>	-	100	45	Очень медленно	12.0	- [90]
<i>Tinca vulgaris</i>	-	100	45	5	-	0 [88]

Фермент скелетных и гладких мышц *Tinca vulgaris* тоже обладает наибольшим сродством к АХ (табл. 5). Кривая рS-активности имеет с АХ характерную колоколообразную форму с максимумом при концентрации субстрата $4 \cdot 10^{-3}$ М. K_m для фермента мышц *T. vulgaris* одного порядка с K_m для АХЭ эритроцитов человека, мозга собаки и электрического органа рыб [88].

Гомогенаты мышц морских рыб (семейства *Gadidae* и *Pleuronectidae*) обладают способностью гидролизовать БУХ. Гистохимическими исследованиями у пресноводных и морских рыб на поверхности мышечных клеток выявлен плотно сгруппированный материал, ингибирующийся бисаммониевым соединением BW 284C51 и сохраняющийся при воздействии мипафоксом. По форме и структуре он сходен с материалом в концевых пластинках нервных окончаний. У морских рыб, кроме того, вдоль поверхности мышечных клеток имеется еще диффузно локализованный материал, не ингибирующийся BW 284C51, но устраняющийся мипафоксом. рS-оптимум АХ-йодида для пресноводных рыб составляет 2.23 ± 0.09 , а для морских – 1.94 ± 0.06 . В мышцах морских рыб содержатся 2 фермента: АХЭ и БУХЭ; в мышцах пресноводных – только АХЭ. Предполагают, что различия ферментов мышц морских и пресноводных рыб связаны с особенностями их водно-солевого обмена [89, 91]. Переведенная в раствор и частично очищенная БУХЭ из мышц камбалы *Pleuronectes platessa* представляет собой смесь множественных форм, разделяющихся изоэлектрическим фокусированием. Эти молекулярные формы не различаются по каталитической способности гидролизовать АХ, БУХ и БЗХ [60].

Показано, что гомогенаты печени рыб обладают способностью гидролизовать АХ [31, 32, 52, 68, 101], а у некоторых видов – и БУХ [68]. Печень хрящевой рыбы *Scylliorhinus canicula* с высокой скоростью расщепляет БЗХ. Соотношение скоростей гидролиза АХ, МеХ, БЗХ составляет 100:71:57 соответственно [52]. У *Hilsa ilisha* продукты реакции с АХ и БУХ откладываются в печени в форме мельчайших гранул вдоль лагун и стенок кровеносных сосудов. В морской (нагульный) период жизни рыб ферментативная активность печени выше, чем в речной (нерестовый) период [68].

Таким образом, для водных позвоночных, так же как для беспозвоночных, характерно разнообразие молекулярных форм ХЭ. Ферменту мозга круглоротых и хрящевых рыб свойственна меньшая субстратная избирательность, чем ферменту мозга костистых рыб. Наряду с АХ он довольно интенсивно гидролизует БУХ. Фермент мозга костистых рыб – типичная АХЭ. С наибольшей скоростью гидролизует АХ и ПрХ, несколько меньше – МеХ и практически не катализирует гидролиз БУХ и БЗХ. Реакция с АХ и МеХ тормозится их высокими концентрациями. Зависимость скорости ферментативного гидролиза от концентрации этих субстратов или от отрицательного логарифма концентраций $pS = -\lg S$ выражается колоколообразной кривой. Максимум активности фермента – при концентрации АХ $10^{-2} - 10^{-3}$ М. K_m с АХ изменяется у разных видов незначительно и име-

ет один порядок с K_m для АХЭ млекопитающих. По чувствительности к ингибиторам видовые отличия несущественны, но ингибирующая способность разных препаратов варьирует до 10 000 раз.

В плазме крови и мышцах у большинства костистых рыб присутствует АХЭ, по своим свойствам напоминающая фермент мозга. Вместе с тем у некоторых представителей сем. Cyprinidae в сыворотке крови имеется фермент, относящийся к типу БуХЭ. Его чувствительность к ингибиторам (эзерину, ДДВФ) выше, чем у АХЭ. У представителей морских рыб (семейства Gadidae и Pleuronectidae) мышцы тоже обладают БуХЭ-ной активностью. Печени рыб, так же как сыворотке крови и мышцам, свойственна и АХЭ- и БуХЭ-ная активность.

Наибольшее содержание АХЭ у позвоночных установлено в среднем мозге костистых рыб. В плазме крови наиболее высокий ее уровень у *Electrophorus electricus*, в мышцах - у *Lebistes* sp. и *Carassius auratus*. Значительной БуХЭ-ной активностью обладает сыворотка крови *Abramis ballerus*, *Rutilus rutilus* и фенотипа *Abramis brama*, а также мышцы морских рыб (семейства Gadidae и Pleuronectidae). Отмечена корреляция между уровнем активности мышц рыб и их подвижностью.

* * *

ХЭ содержатся в органах и тканях водных животных различных филогенетических групп. Наиболее полно изучен фермент мозга костистых рыб. По своим свойствам он относится к группе АХЭ и не имеет существенных отличий от типичной АХЭ, фермента мозга и эритроцитов млекопитающих. Наряду с этим у водных животных встречаются такие формы ферментов, безоговорочное отнесение которых к типу АХЭ или ХЭ - затруднительно.

Несмотря на множественность молекулярных форм ферментов, у водных животных можно выделить 3 типа проявления ХЭ-ной активности. У большинства видов (черви, членистоногие, моллюски, позвоночные) как в нервной системе, так и в мышцах, в сердце, гемолимфе и плазме крови преобладает АХЭ-ная активность. При этом возможен незначительный гидролиз БуХ.

Вместе с тем встречаются виды, у которых наряду с АХЭ-ной отмечена высокая БуХЭ-ная активность (сердце мидии *Mytilus graianii*, зрительный ганглий, гемолимфа, основное и жаберное сердце кальмара *Ommasterphes zloanei-pacificus* и каракатицы *Rossia pacifica*, мышцы камбалы *Pleuronectes platessa*). Согласно кинетическим исследованиям, в данном случае также присутствует только один фермент, но по субстратной и ингибиторной специфичности он обладает свойствами и АХЭ, и БуХЭ.

Кроме того, есть животные, в тканях которых содержатся 2 фермента: мышцы ретрактора хоботка морского червя *Physcosoma japonicum*, зрительный ганглий кальмаров (*Todarodes sagittatus*, *Stenoteuthis oualaniensis*, *Thysanoteuthis rhombus*, *Illex illecebrosus*), сыворотка крови плотвы *Rutilus rutilus*, сига *Abramis ballerus* и т. д. Один из ферментов - типичная

АХЭ, другой – обладает свойствами БуХЭ, но имеет по сравнению с классической БуХЭ меньшую избирательность к субстратам.

У водных животных в сравнении с высшими позвоночными нет преимущественного распределения типов ферментов в определенных органах и тканях. Как среди беспозвоночных, так и позвоночных есть виды, у которых и в нервной системе, и в других тканях содержатся ферменты с близкими свойствами. Так, у большого прудовика *Limnaea stagnalis* и у катушки *Planorbis corneus* сходны ферменты нервной системы и гемолимфы; у осьминога *Octopus* sp. – ферменты зрительного ганглия и сердечной мышцы; у кальмара *O. sloanei-pacificus* – ферменты зрительного ганглия, гемолимфы, основного и жаберного сердца. В сыворотке крови большинства костистых рыб содержится АХЭ, подобная ферменту мозга.

Вместе с тем у других животных органы и ткани имеют различные типы ХЭ-ной активности. В нервной системе *Anadonta cygnea* содержится или АХЭ, отличающаяся по ряду свойств от типичной АХЭ, или 2 фермента различной природы, так как гомогенаты гидролизуют АТХ и БуТХ с близкими скоростями, а кривая скорости гидролиза АХ не имеет колоколообразной формы. Гомогенатами сердца *A. cygnea* с наибольшей скоростью гидролизуются АХ, ферментом гемолимфы – только АХ, в аддукторе присутствуют 2 фермента АХЭ и БуХЭ. У рыб (*Rutilus rutilus*, *Abramis ballerus*) в мозге обнаружен 1 фермент – АХЭ, а в сыворотке крови – 2: АХЭ и БуХЭ.

Разнообразие молекулярных форм ХЭ, характеризующихся неодинаковой каталитической активностью в отношении субстратов и различной чувствительностью к ингибиторам, вероятно, обусловлено их функциями в организме. Роль АХЭ нервной системы более или менее ясна, функциональное значение других молекулярных форм АХЭ остается все еще невыясненным. Мало также известно о функциях БуХЭ. Нужно полагать, что в связи со столь своеобразным распределением БуХЭ между видами животных и их тканями, роль ее в организме не ограничивается функциями вспомогательного фермента (устранение АХ, вынесенного диффузией в межклеточное пространство и кровь; предотвращение накопления БуХ, который может ингибировать АХЭ), а имеет определенное значение в процессах метаболизма и внутриклеточного транспорта.

Как отмечалось выше, изучение ХЭ водных животных важно в связи с необходимостью выяснения механизмов действия ФОР. Создание препаратов с избирательной токсичностью – один из путей предотвращения отрицательного влияния токсикантов на человека и водных животных. Анализ представленных в данной работе материалов показывает, что ХЭ водных животных обладает различной чувствительностью к ФОР. Однако сведения о ферментах недостаточно полные. Выделить систематические группы животных, ферменты которых характеризуются сходной чувствительностью к фосфорорганическим соединениям, не представляется пока возможным, за исклю-

чением группы костистых рыб. АХЭ мозга последних по чувствительности к ФОП не имеет значительных видовых различий и приближается к АХЭ мозга млекопитающих. ХЭ водных беспозвоночных, в том числе Cladocera и Amphipoda, для которых ФОП представляют наибольшую опасность, практически не изучены. Вместе с тем заслуживает внимания выяснение зависимости токсичности ФОП от чувствительности к ним ферментов-мишеней у менее устойчивых видов.

Л и т е р а т у р а

1. Боголюбова Г.М., Карпинская Е.В., Куликова А.И., Розенгарт В.И. Субстратная специфичность холинэстеразы зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара и ацетилхолинэстеразы эритроцитов быка // Биохимия. 1972. Т. 37, вып. 4.
2. (Бресткин А.П., Брик И.Л., Григорьева Г.М.) Brestkin A.P., Brick I.L., Grigorieva G.M. Comparative pharmacology of cholinesterases // International encyclopedia of pharmacology and therapeutics. New York; London, 1973.
3. Бресткин А.П., Певзнер Д.Л. О свойствах ацетилхолинэстеразы мозга и эритроцитов быка // Биохимия. 1971. Т. 36, вып. 1.
4. Брик И.Л. Свойства ацетилхолинэстеразы мозга карпа // Биохимия. 1969. Т. 34, вып. 1.
5. Брик И.Л. Холинэстеразы мышц морских червей *Physcosoma japonicum* и *Lumbriconereis impatiens*// Биохимическая эволюция. Л., 1973.
6. Брик И.Л., Яковлев В.А. Сравнительное изучение свойств холинэстераз нервной системы позвоночных и насекомых // Биохимия. 1962. Т. 27, вып. 6.
7. Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М., 1967.
8. Вульфус Е.А., Юрченко О.П. Влияние антихолинэстеразных веществ на действие ацетилхолина и его аналогов на нейроны брюхоногих моллюсков // ДАН СССР. 1972. Т. 205, № 5.
9. Вульфус Е.А., Юрченко О.П., Зеймаль Э.В. О взаимном расположении холинорецепторов на мембране нейронных брюхоногих моллюсков и холинэстеразной активности нейронов // ДАН СССР. 1969. Т. 186, № 6.
10. Гантверг А.Н. Особенности резистентности некоторых видов пресноводных рыб к карбофосу и другим фосфорорганическим пестицидам: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1985.
11. Гер Б.А., Дардымов И.В., Лаврентьева В.В., Михельсон М.Я. Фармакологическая характеристика некоторых мышц сипункулид и аннелид // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1970. Т. 6, № 2.

12. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л., 1964.
13. Григорьева Г.М. Холинэстеразы зрительного ганглия осьминога *Octopus sp.* и кальмара *Ommatostrephes sloanei-pacificus* // Ферменты в эволюции животных. Л., 1969.
14. (Григорьева Г.М.) Grigor'eva G.M. Propionylcholinesterase in the nervous ganglia of the fresh-water pulmonate mollusc *Lymnaea stagnalis* // Comp. Biochem. Physiol. A. 1973. Vol. 44.
15. Григорьева Г.М. Холинэстеразы зрительного ганглия кальмара *Illex illecebrosus*, каракатицы *Sepia officinalis* и элэдоны *Eledone moshata* (Cephalopoda) // Сравнительная нейрофизиология и нейрохимия. Л., 1976.
16. Григорьева Г.М., Коньчева Н.В. Каталитические свойства холинэстераз зрительного ганглия кальмаров // Физиология и биохимия морских и пресноводных животных. Л., 1979.
17. Григорьева Г.М., Розенгарт Е.В., Турпаев Т.М. Характеристика специфичности холинэстераз сердечной мышцы и гемолимфы моллюсков // Физиология и биохимия беспозвоночных. Л., 1968.
18. Григорьева Г.М., Ткаченко С.С. Холинэстеразы гемолимфы брюхоногих моллюсков // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1971. Т. 7, № 3.
19. Гринберг М.Ж., Руп Т. Многообразие холинэстераз в гомологичных тканях двусторчатых моллюсков // Сравнительная фармакология синаптических рецепторов. Л., 1977.
20. (Кабачник М.И., Бресткин А.П., Годовиков Н.Н. и др.) Kabachnik M.J., Brestkin A.P., Godovikov N.N. ect. Hydrophobic areas on the active surface of cholinesterases // Pharmacol. Rev. 1970. Vol. 22.
21. Карташова Н.В., Панюков А.Н., Певзнер Д.Л., Розенгарт В.И., Розенгарт Е.В., Сахаров Д.А. Холинэстераза зрительных ганглиев кальмара *Ommatostrephes sloanei pacificus* // Физиология и биохимия беспозвоночных. Л., 1968.
22. Козловская В.И., Комов В.Т., Волкова Т.В. Холинэстераза нервных ганглиев брюхоногих моллюсков, обладающих различной устойчивостью к хлорофосу // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1982. № 54.
23. Козловская В.И., Мензикова О.В. О холинэстеразе нервных ганглиев *Limnaea stagnalis*. ИБВВ АН СССР. 1986. Деп. в ВИНТИ. 1986, № 6528-В 86 деп.
24. Козловская В.И., Мензикова О.В., Чуйко Г.М. Сравнительная устойчивость водных животных к фосфорорганическим пестицидам // Экспериментальная водная токсикология. Рига, 1985. № 10.

25. К о з л о в с к а я В.И., Ф л е р о в Б.А. Фосфорорганические пестициды и их опасность для водных животных // Теоретические вопросы водной токсикологии. Л., 1981.
26. К о з л о в с к а я В.И., Ч у й к о Г.М. Холинэстеразы сыворотки крови рыб сем. Cyprinidae с различной устойчивостью к хлорофосу // Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979.
27. К о р о ч к и н Л.И., С е р о в О.Л., П у д о в к и н А.И., А р о н ш т а м А.А., Б о р к и н Л.Я., М а л е ц к и й С.И., П о л я к о в а Е.В., М а н ч е н к о Г.П. Генетика изоферментов. М., 1977.
28. Л а п к и н а Л.Н., С т о й к о в а О.А. Холинэстеразы пиявок // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1986. № 69.
29. Л е й б с о н Н.Л. Ацетилхолинэстераза мозга в филогенезе позвоночных // ДАН СССР. 1963. Т. 153, № 6.
30. М а л а х о в В.В., Б е л о в а С.Л. О распределении холинэстеразной активности в нервной системе свободноживущей морской нематоды *Pontonema vulgare* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1977. Т. 13, № 5.
31. М а л я р е в с к а я А.Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного евтрофирования водоемов. Киев, 1979.
32. М е т е л е в В.В., Т р о с т и н а В.И. Энциматические методы индикации ФОС в рыбе и воде // Бюл. Всесоюз. ин-та эксперим. ветеринарии. 1969. Вып. 6.
33. М и х е л ь с о н М.Я., З е м а л ь Э.В. Ацетилхолин. Л., 1970.
34. М и х к и е в а В.С., Б о г д а н В.В. К вопросу об определении активности холинэстеразы в мышечной и нервной тканях пресноводных рыб // Экологическая биохимия животных. Петрозаводск, 1978.
35. Н о м е н к л а т у р а ферментов. М., 1979.
36. П а н ю к о в А.Н. О роли неспецифической холинэстеразы в головном мозгу // Тез. докл. I-го Всесоюз. биохим. съезда. М.; Л., 1963. Вып. 2.
37. П о р т у г а л о в В.В., Я к о в л е в В.А. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества // Вопр. мед. химии. 1953. № 5.
38. П о т а п е н к о Р.И. Влияние ацетилхолина на $N\alpha$, K-АТФазу микросом головного мозга крыс разного возраста // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1980. Т. 90, № 12.
39. Р о з е н г а р т В.И. Холинэстеразы. Функциональная роль и клиническое значение // Проблемы медицинской химии. М., 1973.
40. Р о з е н г а р т В.И., Ш е р с т о б и т о в О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектицидов. Л., 1978.
41. Т и р а с Х.П. Активность ацетилхолинэстеразы в нервной системе планарий в норме и при регенерации // Онтогенез. 1978. Т. 9, № 3.
42. Т и р а с Х.П., С а х а р о в а Н.Ю., Ш е й м а н И.М. Активность ацетилхолинэстеразы в нервной системе некоторых

- триклад (класс ресничных червей) // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1975. Т. 11, № 4.
43. Ф о м и н ы х М.Я. Холинэргические двигательные окончания в мышечных волокнах у полихеты *Nephtys hombergii* // Сравнительная нейрофизиология и нейрохимия. Л., 1976.
 44. Ч у й к о Г.М. Чувствительность ацетилхолинэстеразы мозга к хлорофосу и его токсичность для плотвы, леща, карпа и окуня // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1985. № 66.
 45. Ч у й к о Г.М. Биохимические и физиологические механизмы различной устойчивости пресноводных костистых рыб к действию хлорофоса и дихлофоса: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1987.
 46. Ч у й к о Г.М., К о з л о в с к а я В.И., С т е п а н о в а В.М. Эстеразы эфиров карбоновых кислот сыворотки крови саянца (*Abramis ballerus*), плотвы (*Rutilus rutilus*), леща (*Abramis brama*), окуня (*Perca fluviatilis*). ИБВВ АН СССР. 1983. Деп. в ВИНТИ. 22.11.83, № 6193-83 деп.
 47. Ш е в ц о в а С.П., Б р е с т к и н А.П., Н е с и с К.Н., Р о з е н г а р т Е.В. Об идентичности свойств холинэстераз зрительного ганглия кальмара *Ommastrephes bartrami* из Южной Атлантики и Большого Австралийского залива // Океанология. 1977. Т. 17, вып. 6.
 48. Ш е в ц о в а С.П., Б р е с т к и н А.П., Н е с и с К.Н., Р о з е н г а р т Е.В. Различия в свойствах холинэстераз зрительных ганглиев кальмаров *Ommastrephes bartrami* (Les) как показатель изолированности популяций из различных частей разорванного ареала // Океанология, 1979. Т. 19, вып. 3.
 49. Ю р ч е н к о О.П., В у л ь ф и у с Е.А., З е й м а л ь Э.В. (J u r s h e n k o O.P., V u l f i u s E.A., Z e i m a l E.V.). Cholinesterase activity in ganglia of *Gastropoda*, *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus*. 1. Effect of anticholinesterase agents of giant neurone depolarization by acetylcholine and its analogues // Comp. Biochem., Physiol. A. 1973. Vol. 45, N 1.
 50. Я к о в л е в В.А. Кинетика ферментативного катализа. М., 1965.
 51. A b o u - D o n i a M.B., M e n z e l D.B. Fish brain cholinesterase: its inhibition by carbamates and automatic assay // Comp. Biochem., Physiol. A. 1967. Vol. 21, N 1.
 52. A u g u s t i n s s o n K.B. Cholinesterases: a study in comparative enzymology // Acta physiol. scand. 1948. Vol. 15. Suppl. 52.
 53. A u g u s t i n s s o n K.B. Substrate concentration and specificity of choline ester-splitting enzymes // Arch. Biochem. 1949. Vol. 23.
 54. A u g u s t i n s s o n K.B. Electrophoresis studies on blood plasma esterases. II. Avian, amphi-

- bian and piscine plasmata // Acta chem. scand. 1959. Vol. 13, N 6.
55. B a l d w i n J. Adaptation of enzymes to temperature: acetylcholinesterase in the central nervous system of fishes // Comp. Biochem., Physiol. B. 1971. Vol. 40, N 1.
 56. B a l d w i n J., H o c h a c h k a P.W. Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization: Acetylcholinesterase from trout brain // Biochem. J. 1970. Vol. 116.
 57. B a n s c h a b a c h M.W., G i e s o n R.L., H o k i n - N e a v e r s o n M. Effects of cholinergic stimulation on levels and fatty acid composition of diacylglycerols in mouse pancreas // Biochem. biophys. acta. 1981. Vol. 663, N 3.
 58. B a n s c h a b a c h M.W., H o k i n - N e a v e r s o n M. Acetylcholine promotes the synthesis of prostaglandin E in mouse pancreas // FEBS Lett. 1980. Vol. 117, N 1.
 59. B a s l o w M.H., N i g r e l l i R.F. Muscle acetylcholinesterase levels as an index of general activity in fishes // Copeia. 1961. N 1.
 60. B r o d b e c k U., G e n t i n e t t a R., L u n d i n S.J. Multiple forms of a cholinesterase from body muscles of plaice (*Pleuronectes platessa*) and possible role of sialic acid in cholinesterase reaction specificity // Acta chem. scand. 1973. Vol. 27, N 2.
 61. B u l l G., H e b b C., R a t k o v i c D. Choline acetylase in the human placenta at different stages of development // Nature. 1961. Vol. 190, N.4782.
 62. (B u r n G.) Б е р н Г. Функции химических передатчиков вегетативной нервной системы. М., 1961.
 63. C o p p a g e D.L. Characterization of fish brain acetylcholinesterase with an automated pH-stat for inhibition studies // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1971. Vol. 6, N 4.
 64. C o p p a g e D.L. Organophosphate pesticides: specific level of brain AChE inhibition related to death in sheepshead minnows. // Trans. Amer. Fish. Soc. 1972. Vol. 101, N 3.
 65. C o p p a g e D.L., B r a i d e c h T.E. River pollution by anticholinesterase agents // Water Res. 1976. Vol. 10, N 1.
 66. C o p p a g e D.L., M a t t h e w s E., C o o k G.H., K u i g h t J. Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion, O, O-dimethyl S-(1, 2-dicarbethoxyethyl) phosphorodithioate // Pestic. Biochem. Physiol. 1975. Vol. 5.

67. C z u b a j A. Ultrastructural distribution of AChE in *Catenula leptocephala* (Nuttocombe, 1956) // *Histochemistry*, 1979. Vol. 61, N 2.
68. D e s a i A.K. Distribution of cholinesterase in the liver and stomach of the migratory fish *Hilsa ilisha* and non-migratory *Hilsa toli* // *J. Anim. Morphol. Physiol.* 1978. Vol. 25, N 1-2.
69. D e t t b a r n W.D. Hydrolysis of choline esters by invertebrate nerve fibers // *Biochem. biophys. acta.* 1963. Vol. 77, N 3.
70. D e t t b a r n W.D., R o s e n b e r g P. Acetylcholinesterase in *Aplysia* // *Biochem. biophys. acta.* 1962. Vol. 65, N 3.
71. (D i x o n M., W e b b E.) Д и к с о н М., У э б б Э. Ферменты. М., 1982. Т. 1.
72. E d w a r d s G. Normal brain cholinesterase activity in the white perch // *Edgewood Arsenal Technical Report 4524*. Maryland, 1971.
73. E d w a r d s G. Normal brain cholinesterase activity in the pumpkinseed sunfish // *Edgewood Arsenal Technical Report 4538*. Maryland, 1971.
74. E n g e l s H., N e e f J., W a c h t e n - d o n k D. v o n . Preparation and properties of acetylcholinesterase from the sea mussel *Mytilus edulis* // *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.* 1978. Bd 359, N 12.
75. E r z e n J., B r z i n M. Cholinergic mechanisms in *Planaria torva* // *Comp. Biochem., Physiol. C.* 1979. Vol. 64, N 1.
76. G a z s o L.R., T o r o k L., R a p p a y G. Contribution to the histochemistry of the nervous system of the planarians // *Acta biol. Acad. sci. hung.* 1961. Vol. 11, N 4.
77. G i b s o n J.R., L u d k e J.L., F e r g u - s o n D.E. Sources of error in the use of fish-brain acetylcholinesterase activity as a monitor for pollution // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1969. Vol. 4, N 1.
78. H a w k i n s R.D., M e n d e l B. True cholinesterase with pronounced resistance to eserine // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1946. Vol. 27, N 1.
79. H o b d e n B.R., K l a v e r k a m p J.F. A pharmacological characterization of acetylcholinesterase from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) brain // *Comp. Biochem., Physiol. C.* 1977. Vol. 57, N 1.
80. H o g a n J.W. Brain acetylcholinesterase from cutthroat trout // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 1971. Vol. 100 N4.
81. H o g a n J.W. Some enzymatic properties of plasma esterases from channel catfish (*Ictalurus punctatus*)

- tatus) // J. Fish. Res. Board Can. 1971. Vol. 28, N 4.
82. H o g a n J.W., K n o w l e s C.O. Some enzymatic properties of brain acetylcholinesterase from bluegill and channel catfish // J. Fish. Res. Board. Can. 1968. Vol. 25, N 4.
 83. H u n t R., T a v e a u x R. de M. On the physiological action of certain choline derivatives and new methods for detecting cholin // Brit. Med. J. 1906. Vol. 11.
 84. H u r w i t z L., W e i s s i n g e r J. Effects of variations in extracellular acetylcholine and calcium ion concentration on the operation level of calcium channels in intestinal smooth muscle // J. Pharmacol. Exp. Theur. 1980. Vol. 214, N 3.
 85. L e n t z T.L. Histochemical localization of acetylcholinesterase activity in a planarian // Comp. Biochem., Physiol. 1968. Vol. 27, N 3.
 86. L i m R., D a v i s G.A., A g r a n o f f B.W. Electrophoretic studies on solubilized proteins of goldfish brain // Brain Res. 1971. Vol. 25.
 87. L o e P.R., F l o r e y E. The distribution of acetylcholine and cholinesterase in the nervous system and in innervated organs of *Octopus dofleini* // Comp. Biochem., Physiol. 1966. Vol. 17, N 2.
 88. L u d t k e A.H., O h n e s o r g e F.K. Charakterisierung der cholinesterasen in verschiedenen geweiben der Schleic (*Tinca vulgaris*) und des Kamincheus // Ztschr. vergl. Physiol. 1966. Bd 52, H. 3.
 89. L u n d i n S.J. On the localisation of cholinesterase in fishes // Experientia. 1958. Vol. 14, N 4.
 90. L u n d i n S.J. Acetylcholinesterase in goldfish muscles. Studies on some substrates and inhibitors // Biochem. J. 1959. Vol. 72, N 2.
 91. L u n d i n S.J. Comparative studies of cholinesterase in body muscles of fishes // J. Cell. Comp. Physiol. 1962. Vol. 59, N 2.
 92. L u n d i n S.J. Properties of a cholinesterase from body muscles of plaice (*Pleuronectes platessa*) // Acta chem. scand. 1968. Vol. 22, N 7.
 93. M a y n a r d E.A. Esterases in Crustacean nervous system // J. Exp. Zool. 1964. Vol. 157.
 94. M u r p h y S.D., L a u w e r y s R.R., C h e e v e r K.L. Comparative anticholinesterase action of organophosphorus insecticides in vertebrates // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1968. Vol. 12.
 95. N a c h m a n s o h n D. Chemical and molecular basis of nerve activity. New York; London, 1959.

96. (N a s h m a n s o h n D.) Нахманзон Д.
Перспективы исследования молекулярных основ активности нервов // Молекулярная биология. Проблемы и перспективы. М., 1964.
97. N a s h m a n s o h n D., R o t h e n b e r g M.A.
Studies on cholinesterase: 1. On the specificity of the enzyme in nerve tissue // J. Biol. Chem. 1945. Vol. 158.
98. N i m i e r k o S., S k a n g i e l - K r a m a s k a J., M l e c z k o M., R a k u s a - S u s z c z e w s k i S. The effect of the assay temperature on brain acetylcholinesterase activity of two antarctic fish species // Bull. Acad. pol. sci. Sér. sci. biol. 1977. Vol. 25, N 12.
99. N i s t r i a A., C a m m e l l i E., D e B e l l i s A.M. Pharmacological observations on the cholinesterase activity of the leech central nervous system // Comp. Biochem., Physiol. C. 1978. Vol. 61, N 1.
100. (О'Б р и е н R.) О'Б р а й н. Токсические эфиры кислот фосфора. М., 1964.
101. R a t h S., M i s r a B.N. Toxicological effects of dichlorvos (DDVP) on brain and liver acetylcholinesterase (AChE) activity of Tilapia mossambica // Toxicology. 1981. Vol. 19.
102. R i c h a r d s o n S.B., H o l l a n g e r C.S., D' E l e t t o R., G r e e n l e a f P.W., T h a w C. Acetylcholine inhibits the release of somatostatin from rat hypothalamus in vitro // Endocrinology. 1980. Vol. 107, N 1.
103. S a l a n k i J., H i r i p i L., L a b o s E. Cholinesterase activity in the central nervous system of Anodonta cygnea L. // Ann. Biol. Tihany. 1966. Vol. 33.
104. S a l a n k i J., V a r a n k a I., H i r i p i L. Comparative study on the cholinesterase activity of different tissues of freshwater mussel (Anodonta cygnea L.) // Ann. Biol. Tihany. 1967. Vol. 34.
105. S u g d e n P.H., N e w s h o l m e E.A. Activities of choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, glutamate decarboxylase, 4-aminobutyrate aminotransferase and carnitine acetyltransferase in nervous tissue from some vertebrates and invertebrates // Comp. Biochem., Physiol. C. 1977. Vol. 56, N 1.
106. T h o m p s o n R.H.S. Cholinesterase // Brit. Med. Bull. 1953. Vol. 9, N 2.
107. V a r a n k a J. Biochemical investigation of cholinesterase in the central nervous system of Lym-

- naea stagnalis L. (Gastropoda) // Ann. Biol. Tihany. 1968. Vol. 35.
108. W e i s s C. The determination of cholinesterase in the brain tissue of three species of freshwater fish and its inactivation in vivo // Ecology. 1958. Vol. 39, N 2.
 109. W i l d e r W.H. Histochemical localization of cholinesterase in larvae of Culiseta inornata (Diptera: Culicidae) // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1970. Vol. 63.
 110. W i l l i a m s A.K., S o v a C.R. Acetylcholinesterase level in brains of fishes from polluted waters // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1966. Vol. 1, N 2.
 111. W i n n e r s N.e f f J., W a c h t e n - d o n k , v o n D. Distribution of cholinesterases and cholinesterases in haemolymphs and smooth muscles of molluscs // Comp. Biochem., Physiol. C. 1978. Vol. 61, N 1.
 112. Z e c h R., E n g e l h a r t H. Acetylcholinesterase activitat in serum des elektrischen aals // Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol.Chem. 1967. Bd. 347.

АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА В ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ РЫБ

Обонятельная луковица имеет сложную структурно-функциональную организацию и характеризуется большим разнообразием синаптических связей [7]. До настоящего времени природа медиаторов в обонятельной луковице остается невыясненной. В соответствии с морфологическим многообразием синапсов вполне вероятно, что медиаторную функцию в луковице могут выполнять разные, химически неродственные вещества. В ряде биохимических работ предполагается, что медиатором в первом синаптическом переключении с аксонов рецепторных клеток на дендриты вторичных нейронов может быть дипептид карнозин [18]. В обонятельной выстилке млекопитающих он содержится в довольно высоких концентрациях и после перерезки ипсилатерального обонятельного нерва содержание его резко падает вплоть до полного исчезновения. Результаты физиологической проверки поставили под сомнение гипотезу о карнозине как о возбуждающем нейротрансмиттере. Его роль в выстилке пока неясна [16].

Окончательно не решен вопрос и о гамма-аминомасляной кислоте, являющейся кандидатом на роль тормозного медиатора, посредством которого взаимодействуют зернистые и митральные клетки [13, 21]. Не исключается участие адренергической синаптической передачи в осуществлении межнейронных связей внутри обонятельной луковицы [8, 9]. Появились сведения об относительно высоком содержании в луковице серотонина, однако его физиологическая роль пока не установлена [1]. Довольно убедительны результаты гистохимических и биохимических работ, в которых определена локализация в обонятельной луковице млекопитающих ферментативной системы, обеспечивающей синтез и разрушение ацетилхолина (АХ). В соответствии с этими данными предполагают, что у млекопитающих с помощью холинергической передачи осуществляется связь между элементами луковицы и центрами более высокого порядка [11, 15, 17, 19, 20].

При таком разнообразии кандидатов выяснение вопроса об их соответствии определенным критериям, предъявляемым к медиаторам, особенно сложно. Даже для широко распространенных медиаторов методические возможности их идентификации ограничены. Так, в настоящее время еще не разработаны прямые гистохимические методы для обнаружения АХ. Поэтому на практике при решении вопроса о химической природе медиатора широко применяются дополнительные критерии и косвенные признаки.

В настоящей работе представлены данные, которые могут служить дополнительными аргументами в пользу того, что у рыб, как

и у млекопитающих, определенную долю контактов в системе синаптической передачи первого обонятельного центра – обонятельной луковицы – составляют холинергические синапсы.

Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли методом Элмана [12] в модификации М.Н. Масловой и Л.В. Резника [3]. Исследуемую ткань извлекали из животного. В опытах с фосдрином для предотвращения дополнительного угнетения фермента токсикантом в процессе подготовки для анализа ткань промывали фосфатным буфером (рН 7.5). Готовили гомогенаты тканей в следующих соотношениях: обонятельной выстилки 1:100, обонятельной луковицы 1:1000 и переднего мозга 1:500. Затем к 1.5 мл фосфатного буфера добавляли 0.25 мл разбавленной ткани, 0.25 мл смеси 0.006 М ацетилтиохолинийодида и 0.001 М 5-3дितिобис-2-нитробензойной кислоты в соотношении 1:1. Инкубацию проводили при 30 °С в течение 20 мин, реакцию останавливали прозеринум. Интенсивность окрашивания проб определяли на спектрофотометре „Spectol“ при длине волны 412 нм. Активность АХЭ выражали в микромолях гидролизованного АХ на 1 г ткани в 1 ч.

Экспериментальная часть работы выполнена на карасях (*Carassius carassius* L.) массой 150–200 г. В электрофизиологических опытах рыб обездвигивали внутримышечным введением α -тубокурарина (5 мг/кг массы). Затем животное фиксировали в проточной камере из плексигласа. Жабры непрерывно орошали водой (16 °С), поступающей из термостата $U=10$. Обонятельные луковицы и передний мозг обнажали, вырезали дорсальные стенки обонятельных мешков, которые перфузировали потоком воды со скоростью 5 мл/мин. Химический стимул, 10^{-4} раствор α , γ -серина вводили в поток строго дозированно без перепада давления с помощью электронно-магнитного клапана, управляемого электронным ключом. Продолжительность стимуляции составляла 2 с.

Электроольфактограмму (ЭОГ) отводили неполяризующимися капиллярными электродами с диаметром кончика 0.1 мм. Активный электрод находился в протоке, омывающем обонятельную выстилку, в непосредственной близости от нее. Индифферентный электрод помещали на голове. С электродов сигнал поступал на высокоомный вольтметр ЭМ-1 и далее на самопишущий прибор КСП-4. Величину ЭОГ оценивали по амплитуде в милливольтгах.

Импульсную активность от тракта отводили биполярными хлорированными серебряными электродами, сигнал с которых поступал на предварительный усилитель переменного тока, а затем по двум каналам непосредственно и через интегратор ($\tau=0.7$ с) на двухлучевой осциллограф С-1-68. Сигналы регистрировали с экрана осциллографа фотоаппаратом. Величину импульсных ответов оценивали по площади, ограниченной интегрирующей кривой и уровнем фоновой активности, и выражали в относительных единицах. В качестве антихолинэстеразных препаратов использовали прозерин и фосфорорганический инсектицид фосдрин, содержащий 24 % активного вещества мевинфоса (0,0-диметил-0-1-метил-2-карбометоксивинил фосфат).

Т а б л и ц а 1

Удельная активность АХЭ (мкмоль/(г·ч)) в различных отделах обонятельной системы рыб

Вид рыбы	Число измерений	Тип луковицы	Обонятельная выстилка	Обонятельная луковица	Передний мозг
Вьюн	5	Стебельчатая	40±4	411±60	116±19
Налим	5	"	418±63	311±62	198±17
Карп	7	"	34±2	754±93	333±21
Чехонь	4	"	74±7	511±34	254±35
Угорь	2	Сидячая	7	167	91
Лещ	4	Стебельчатая	12±1	463±69	431±44
Синец	6	"	11±2	249±37	303±33
Камбала	3	Сидячая	28±7 (верхняя) 15±2 (нижняя)	157±22	321±42
Окунь	8	"	6±0.5	75±5	201±8
Щука	4	"	3.5±0.3	69±4	255±34
Треска	4	Стебельчатая	15±3	96±7	431±23

Результаты определения удельной активности АХЭ в периферическом и центральных отделах обонятельной системы рыб представлены в табл. 1. Уровень активности фермента в обонятельной выстилке всех исследованных видов рыб очень низкий по сравнению с центральными отделами. Исключение составляет налим, у которого активность АХЭ в выстилке выше, чем в луковице или переднем мозге. Вместе с тем прослеживается некоторая связь между уровнем активности фермента в выстилке и экологией вида. Так, у рыб с сумеречным типом активности и хорошо развитым обонянием активность АХЭ в выстилке значительно выше, чем у видов со слабым обонянием. У камбалы активность фермента в верхней выстилке в 2 раза выше, чем в нижней.

Удельная активность фермента в луковице в какой-то мере отражает уровень развития обоняния у различных видов рыб и обнаруживает связь с расположением обонятельной луковицы по отношению к переднему мозгу. Так, у рыб, характеризующихся хорошо развитым обонянием и имеющих стебельчатые луковицы (налим, вьюн, карп), уровень активности АХЭ в луковице намного выше, чем у рыб-микросматиков с сидячими луковицами (щука, окунь). Лишь треска - обладатель стебельчатых луковиц - отличается

очень низким уровнем активности фермента. По этому признаку треска попадает в одну группу со щукой и окунем.

Уровень активности АХЭ в переднем мозге, где расположен вторичный обонятельный центр, не обнаруживает связи с развитием обоняния. Однако сравнение активности фермента в обонятельной луковице и переднем мозге позволяет выделить 3 группы рыб. Первая объединяет такие виды, как вьюн, налим, карп, чехонь, отличающиеся статистически достоверным превышением активности АХЭ в луковице по сравнению с передним мозгом. Во вторую группу (лещ, синец) вошли виды, для которых уровни активности фермента в этих отделах мозга примерно одинаковы. И наконец, третья группа (окунь, щука, треска) характеризуется значительно более низкой активностью АХЭ в луковице, чем в переднем мозге. Такое распределение исследуемых видов полностью соответствует классификации Тейхмана [23], согласно которой налим и карп по уровню обонятельной чувствительности относятся к макросматикам, лещ и синец – к медиосматикам, а окунь, треска и щука – к микросматикам. Различный уровень развития обонятельной системы у представителей одного отряда среди карпо- и трескообразных и сходный уровень чувствительности у рыб из разных отрядов – вьюн и налим, треска и щука – наглядно демонстрируют независимый от таксономического положения видов адаптивный характер развития обонятельной функции. Причем, усиление функции сопровождается увеличением активности АХЭ в обонятельной выстилке и луковице. Случайно ли такое соответствие биохимических показателей действительной картине, или оно объясняется участием холинергической ферментативной системы в обонятельной функции? Этот вопрос самым непосредственным образом связан с проблемой медиаторов в обонятельной системе и, в частности, с выяснением функциональной роли АХ-АХЭ-системы в обонятельной выстилке и в обонятельной луковице. Для этого были проведены специальные эксперименты.

Влияние ингибирования активности АХЭ в различных отделах обонятельной системы на их функциональные свойства исследовали в опытах *in vivo*. Для этого рыб помещали в аквариум, содержащий фосдрин в концентрации 0.5 L C_{50} (10 мг/л). Через сутки в электрофизиологических опытах регистрировали ЭОГ в обонятельной выстилке и импульсные реакции от обонятельного тракта в ответ на химическую стимуляцию рецепторов, а также определяли удельную активность АХЭ в выстилке, луковице и переднем мозге. Контролем служили рыбы, помещенные в чистую воду.

При отравлении карасей фосдрином происходит снижение активности АХЭ как в периферическом, так и в центральном отделе системы, сопровождаемое угнетением обонятельной функции: реакции в периферическом отделе снижаются на 45 %, а в луковице – на 74 % по сравнению с нормой (табл. 2).

В функциональном отношении обонятельная луковица более чувствительна к фосдрину, чем выстилка. Однако опыты *in vivo* не позволяют решить вопрос о существовании причинной связи между степенью ингибирования фермента и угнетением функции. С этой

Т а б л и ц а 2

Действие фосдрина на физиологические и биохимические показатели обонятельной системы карася

Показатель	Норма	Фосдрин	Степень угнетения, %	
ЭОГ на серин 10^{-4} М, мВ	4.09±0.29 (14)	2.24±0.23 (8)	45	
Импульсные реакции в тракте на серин 10^{-4} М, усл. ед.	49.0±0.9 (9)	12.75±3.6 (8)	74	
Активность АХЭ, мкмоль/(г.ч)	обонятельная выстилка	82±7.0 (10)	24±4.0 (15)	71
	обонятельная луковица	859±57.0 (11)	341±33.0 (15)	60
	передний мозг	418±28.0 (8)	149±113.0 (14)	64

П р и м е ч а н и е. В скобках - количество исследованных рыб.

целью проведены специальные электрофизиологические опыты *in situ* и биохимические *in vitro*.

Перфузия обонятельной выстилки раствором фосдрин 10^{-5} М в течение 10 мин вызывает одновременно как снижение ЭОГ на адекватные химические стимулы, так и уровня АХЭ-ной активности. При отмывании токсиканта раствором Рингера электрический ответ быстро восстанавливается, тогда как активность фермента продолжает снижаться (рис. 1). Это означает, что ферментативная система АХ-АХЭ не участвует в генерации ЭОГ, а действие фосдрин на рецепторный потенциал не связано с его антихолинэстеразным свойством.

Непосредственное воздействие фосдрин на обонятельную луковицу изучали в электрофизиологических опытах. В ответ на химическую стимуляцию выстилки регистрировали импульсные реакции от обонятельного тракта. Эти реакции отражают конечный результат обработки сигналов в луковице и поэтому служат надежным показателем ее функционального состояния. Аппликация на поверхность луковицы растворов антихолинэстеразных веществ - прозерина и фосдрин, а также М-холиномиметика ареколина - показала, что общая картина действия этих веществ сходна. Низкие концентрации довольно быстро (3-5 мин) приводят к возрастанию уровня спонтанной импульсной активности и увеличению ответов на адекватный стимул - 10^{-4} М раствор *d, l*-серина по сравнению с нормой. Эффект ареколина обратим (рис. 2). При более высоких концентрациях этих веществ наблюдается значительное снижение как спонтанной, так и вызванной активности (рис. 3). В целом такая

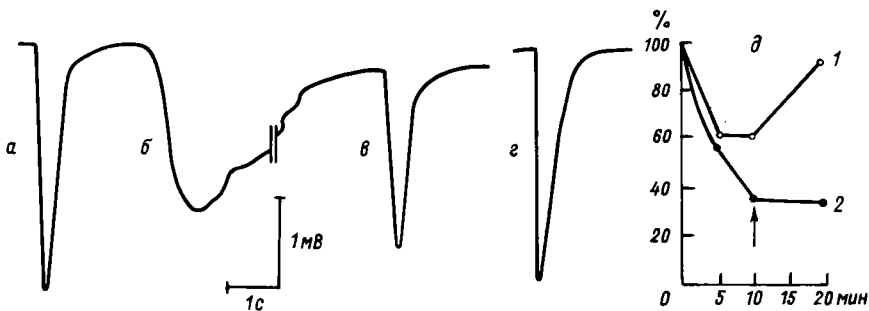


Рис. 1. Действие фосдрина (10^{-5} М, 10 мин) на ЭОГ и АХЭ в обонятельной выстилке карася.

а – ЭОГ в норме, б – деполяризация, вызванная перфузией фосдрином, в – ЭОГ через 5 мин от начала действия фосдрина, г – восстановление ЭОГ через 10 мин отмывания раствором Рингера, д – динамика изменения величины ЭОГ и активности АХЭ при воздействии фосдрином. 1 – амплитуда ЭОГ, % от нормы, 2 – активность АХЭ, % от нормы.

картина соответствует представлению о том, что одним из медиаторов в обонятельной луковице рыб может быть АХ. Действительно, прозерин и фосдрия повышают содержание эндогенного АХ, что приводит к гиперфункции с последующей десенситизацией. М-холиномиметик ареколин имитирует эффекты, вызываемые повышением концентрации АХ.

Полученные результаты свидетельствуют о различной роли холинергического ферментативного механизма в периферическом и центральном отделах обонятельной системы.

В 60-е годы появились первые сведения о наличии и локализации АХЭ в обонятельной выстилке. Вслед за этим ряд авторов [6] выдвинули гипотезу, согласно которой АХ в обонятельной выстилке выполняет определяющую роль в генерации рецепторного потенциала. Однако немногочисленные электрофизиологические данные о влиянии холинергических веществ на ЭОГ и импульсные реакции обонятельных рецепторов противоречивы и недостаточно убедительны [2, 6]. В этом плане наши результаты, отражающие динамику воздействия фосдрина на ЭОГ и активность АХЭ в обонятельной выстилке, свидетельствуют о независимости процессов генерации рецепторного потенциала от системы АХ-АХЭ (см. рис. 1).

В целом роль холинергической системы в обонятельной выстилке пока остается невыясненной. Биохимическими и электрофизиологическими методами показано, что в обонятельной выстилке лягушки и саламандры присутствуют М-холинорецепторы [10, 14]. Они, по всей вероятности, находятся на мембранах рецепторных клеток. По данным Хедланда и Шеферда [14], после перерезки обонятельного

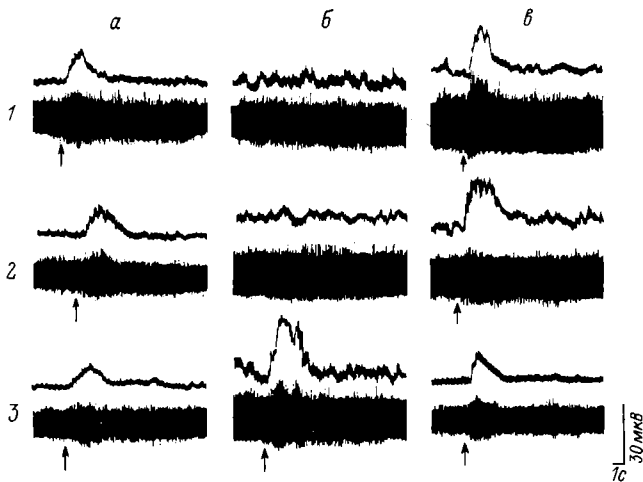


Рис. 2. Возбуждающее действие холинергических веществ на импульсную активность в обонятельном тракте караса.

1 - фосдрин (10^{-5} М), 2 - прозерин (10^{-5} М), 3 - ареколин (10^{-4} М). а - реакция на химическую стимуляцию выстилки 10^{-4} М раствором д, л-серина в норме; б (1, 2) - изменение фоновой активности при воздействии холинергическим веществом; в (3), в (1, 2) - реакции на этот же стимул при воздействии холинергическим веществом; в (3) - восстановление реакции через 20 мин отмывания ареколина раствором Рингера.

нерва, вызывающей ретроградную дегенерацию рецепторных клеток, связывание агониста в гомогенате обонятельной выстилки саламандры снижается в 5 раз. Мы полагаем, что рыбы в этом отношении не являются исключением, так как в ответ на стимуляцию выстилки караса холинергическими веществами (лобелин, мехолин, пилокарпин, ареколин) всегда регистрируется ЭОГ. Более того, предварительная перфузия выстилки атропином вызывает блокирование ответов на мехолин, не влияя на ЭОГ, вызванную серином (наши неопubl. данные). Таким образом, не исключено, что холинорецепторы в обонятельной выстилке низших позвоночных - самостоятельные рецепторы некоторых алкалоидов.

Холинацетилтрансфераза (ХАТФ) и АХЭ локализируются в нерцепторных элементах выстилки [14]. Роль этих ферментов окончательно не определена, однако возможно их участие в вегетативной регуляции выстилки, которая, по нашим данным [5], осуществляется с помощью холинергического механизма. Снижение ЭОГ после точного воздействия фосдрином (см. табл. 1) мы связываем с нарушением вегетативной регуляции обонятельной выстилки. Аналогичный эффект - снижение и исчезновение ольфактограмм - мы наблюдали через сутки после перерезки веточки тройничного нерва

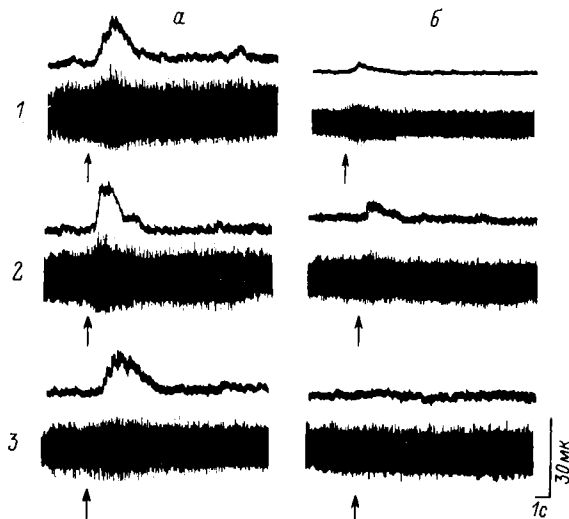


Рис. 3. Ингибирующее действие холинергических веществ на импульсную активность в обонятельном тракте карася.

1 - фосдрин (10^{-4} М), 2 - прозерин (10^{-3} М), 3 - ареколин (10^{-3} М). а - реакция на 10^{-4} М раствор *d, l*-серина в норме, б - реакция на этот же стимул через 10 мин после воздействия холинергическим веществом.

ophthalmicus superficialis, иннервирующей обонятельную выстилку (наши неопубл. данные).

В отличие от обонятельной выстилки, холинергическая система обонятельной луковицы, по нашим данным, имеет самое непосредственное отношение к процессам восприятия химических сигналов. Характер действия холинергических веществ на обонятельную луковицу, а также положительная корреляция между уровнем активности АХЭ в луковице и степенью развития обонятельной функции предполагают наличие холинергической передачи в синаптической организации луковицы. Роль холинергических синапсов в процессах обработки обонятельных сигналов, по-видимому, весьма существенна, так как воздействия на холинергическую ферментную систему приводят к значительным изменениям вплоть до блокирования реакций на выходе луковицы.

Относительно локализации этих синапсов можно строить лишь предположения, основанные на результатах, полученных для млекопитающих. Известно, что ферменты ХАТФ и АХЭ локализуются в местах контактов между элементами луковицы и центрифугальными волокнами - в слое клубочков, наружном и внутреннем плексиформном слоях, в слое гранулярных клеток [11, 15, 22]. Более того, установлена зависимость холинергической системы обонятельной луковицы от эфферентного входа [17, 19, 20]. В частности пока-

зано, что разрушение переднего мозга приводит к значительному снижению или исчезновению активности ХАТФ и АХЭ в обонятельной луковице млекопитающих, тогда как перерезка обонятельного нерва или аносмирование не влияют на удельную активность АХЭ [17, 19]. И наконец, имеются данные, прямо указывающие на зернистые клетки как на место локализации холинорецепторов [15]. Так, установлено, что количество мускариновых рецепторов и активность ХАТФ резко возрастают в период активной пролиферации зернистых клеток. Известно, что дендриты зернистых клеток разветвляются в наружном и внутреннем сетевидных слоях луковицы, контактируя с митральными клетками, нейронами переднего обонятельного ядра и центробежными волокнами. Поэтому не исключено, что у млекопитающих зернистые клетки контактируют с центробежными волокнами через холинергические синапсы.

Наши результаты по определению удельной активности АХЭ в обонятельной системе у представителей различных видов рыб также довольно хорошо соответствуют представлению о связи холинергического механизма с системой зернистых клеток. Действительно, увеличение уровня сенсорной чувствительности коррелирует с повышением активности АХЭ в обонятельной луковице по сравнению с передним мозгом, что можно расценивать как усиление ее функциональной организации. Последнее может достигаться либо с помощью более интенсивной эфферентной регуляции через систему центрифугальных волокон и зернистых клеток, либо за счет морфофункциональной перестройки, включающей слияние части клеток переднего обонятельного ядра с луковицей и соответственно усложнение синаптических взаимодействий, осуществляемых через зернистые клетки. Перемещение части переднего обонятельного ядра из переднего мозга в обонятельную луковицу характерно для многих видов рыб и несомненно может служить примером такой перестройки, в результате которой перераспределяются функции между двумя отделами мозга.

Нужно отметить, что у рыб переднее обонятельное ядро более отчетливо выражено в стебельчатых луковицах, чем в сидячих [4]. Именно стебельчатые луковицы отличает более высокий уровень активности АХЭ по сравнению с передним мозгом. По этому признаку нами выделена группа, представленная такими видами, как вьюн, налим, карп. Все они имеют стебельчатые луковицы и являются макросматиками. Сведения о функциональной роли холинергического механизма обонятельной луковицы в обработке афферентных сигналов практически отсутствуют. Известно только, что спонтанная активность митральных, кисточковых и гранулярных клеток обонятельной луковицы млекопитающих снижается после микроионофоретического введения АХ или физостигмина [8, 9]. В этом отношении мы пока не располагаем какими-либо данными, позволяющими конкретизировать этот вопрос. Однако на основании результатов экспериментов с аппликацией фосдрина, прозерина и ареколина можно считать, что холинергический механизм имеет непосредственное отношение к процессам обработки химических сигналов в луковице.

Нарушение его самым существенным образом отражается на способности обонятельной системы воспринимать запахи.

В целом результаты настоящей работы полностью согласуются с предположением о наличии холинергических синапсов в обонятельной луковице рыб. При этом не исключается участие других медиаторов в синаптической организации этого отдела мозга.

* * *

Таким образом, на примере 11 видов рыб показано, что активность АХЭ в обонятельных центрах может служить показателем степени развития обонятельной системы. Виды с хорошо развитым обонянием отличает более высокий уровень активности АХЭ в обонятельной луковице по сравнению с передним мозгом. У видов со слабыми обонятельными способностями активность в луковице ниже, чем в переднем мозге.

Угнетение активности АХЭ в обонятельной выстилке и луковице при отравлении карасей фосдрином ($1/2 LC_{50}$) сопровождается снижением амплитуды ЭОГ и величины импульсных реакций в тракте.

М-холиномиметик ареколин и антихолинэстеразные вещества – прозерин и фосдрин, апплицируемые на поверхность обонятельной луковицы карася, – в низких концентрациях (10^{-5} – 10^{-4} М) вызывают возрастание спонтанной импульсной активности и увеличение ответов на химическую стимуляцию выстилки, а в более высоких концентрациях (10^{-3} М) – снижение как спонтанной, так и вызванной активности.

В обонятельной выстилке рыб уровень активности АХЭ значительно ниже, чем в центральных отделах системы.

Л и т е р а т у р а

1. Д ю ж и к о в а Н.А., П а в л о в а М.Б., Н о в и к о в С.Н. Содержание серотонина в обонятельных луковицах в связи с механизмами регуляции агрессивного поведения у самцов домовый мыши с помощью феромонов // ДАН СССР. 1987. Т. 292, № 5.
2. К р у ж а л о в Н.Б., Г у с е л ь н и к о в а К.Т. Действие некоторых холинолитиков и антихолинэстераз на электроольфактограмму лягушки // Физиол. журн. СССР. 1971. Т. 57.
3. М а с л о в а М.Н., Р е з н и к Л.В. Угнетение холинэстеразной активности в мозге крыс фосфорорганическими ингибиторами с различной степенью гидрофобности // Укр. биохим. журн. 1976. Т. 48, № 4.
4. М и н о р А.В. Физиология обоняния // Физиология сенсорных систем. Л., 1972. Ч. 2.
5. Р у ж и н с к а я Н.Н., Г д о в с к и й П.А. Влияние закисления среды на обонятельную чувствительность рыб // Экология

- и биологическая продуктивность Баренцева моря: Тез. конф. Мурманск, 1986.
6. Т ы р ы ш к и н а Е.М., Ф и н к и н ш т е й н Я.Д. Актив-
ность нервов и луковиц лягушек при нарушении синтеза ацетил-
холина в обонятельной выстилке // Физиол. журн. СССР. 1974.
Т. 60, № 7.
 7. A n d r e s K.H. Anatomy and ultrastructure of
the olfactory bulb in fish, amfibia, reptilis, birds
and mammals // Taste and smell in vertebrates.
London, 1970.
 8. B a u m g a r t e n R., B l o o m E.E., O l i -
v e r A.P., S a l m o i r a g h i G.C. Response
of individual olfactory nerve cells to microintophore-
tically administered chemical substances // Pfuld.
Arch. Ges. Physiol. 1963. N 277.
 9. B l o o m F.E., C o s t a E., S a l m o i r a -
g h i G.C. Analysis of individual rabbit olfactory
bulb neuroresponses to the microelectrophoresis of
acetylcholin, norepinephrine and serotonin sinergists
and antagonista // J. Pharmacol. Exp. Therap. 1964.
Vol. 146, N 1.
 10. B o u v e t J.T., D e l a l e u J.C. Responses
électriques de la miqieuse plfactive de Grenouille
a l'acetylcholine et de substance // C.r. Acad. sci.
Paris. 1984. Vol. 298.
 11. C a r s o n K.A., B u r d C.D. Localization of
acetylcholinesterase in the main and accessory ol-
factory bulb of the mouse by light and electron
microscopic histochemistry // J. Comp. Neurol. 1980.
Vol. 191.
 12. E l l m a n J.L., C o u r t n e y K.D., A n d -
r e s I.R., F e a t h e r s t o n e R.M. A new
and rapid colorimetric determination of acetylcho-
linesterase activity // Biochem. Pharmacol. 1961.
Vol. 7.
 13. F e l i x D., M c L e n n a n H. The effect of
bicuculline on the inhibition of mitral cells of the
olfactory bulb // Brain Res. 1971. Vol. 25.
 14. H e d l u n d B., S h e p h e r d H.M. Bioche-
mical studies on muscarinic receptors in salaman-
der olfactory epithelium // FEBS Lett. 1983. Vol. 162.
 15. L a r g e T.H., L a m b e r t M.P., G r e m i l -
l o n M.A., K l e i n W.L. Parallel postnatal de-
velopment of choline acetyltransferase activity and
muscarinic acetylcholine receptors in the rat olfac-
tory bulb // J. Neurochem. 1986. Vol. 46.
 16. M a c L e o d N.K., S t r a u g h a n D.W.
Responses of olfactory bulb neurones to the di-
peptide carnosine // Exp. Brain Res. 1979. Vol. 34.

17. M a c r i d e s F., D a v i s B.I., J o u n g s W.M., N a d M.S., M a r g o l i s F.L. Cholinergic and catecholaminergic afferents to the olfactory bulb in the hamster: a neuroanatomical, biochemical and histochemical investigation // J. Comp. Neurol. 1981. Vol. 203.
18. M a r g o l i s F.L., F e r r i e r o D., H a r d i n g J. Carnosine (β -alanil-1-histidine) in the olfactory nerve: a putative neurotransmitter candidate // Proc. VI Intern. Congr. Pharmacol. Oxford, 1976. Vol. 2.
19. M e i s a m i E., M o u s a v i R. Lasting effects of early olfactory deprivation on the growth, DNA, RNA and protein content and Na-K-ATP-ase and AChE activity of the rat olfactory bulb // Develop. Brain Res. 1981. Vol. 2, N 2.
20. M e i s a m i E., M o u s a v i R., S a t a u R. AChE and ACh in rat olfactory bulb during development and under olfactory deprivation // Proc. Europ. Soc. Neurochem. Gottingen ect., 1978.
21. N i c o l l R.A. Pharmacological evidence for GABA as the transmitter in granule cell inhibition in the olfactory bulb // Brain Res. 1971. Vol. 35.
22. P r i c e I.L. The termination of centrifugal fibers in olfactory bulb // Brain Res. 1968. Vol. 27.
23. T e i c h m a n n H. Vergleichende Untersuchungen an der Nase der Fische // Ztschr. Morphol. Tiere. 1954. Bd 43, N 42.

ВЛИЯНИЕ АНОСМИИ И ДЕЭФФЕРЕНТАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЫ КАРАСЯ

Существует мнение, что в обонятельной луковиче млекопитающих имеется система холинергических синапсов. По данным гистохимических и биохимических исследований, они локализованы в местах контактов между нейронами луковичи и центробежными волокнами [6, 7]. О зависимости холинергической системы обонятельной луковичи млекопитающих от ее эфферентного входа также свидетельствуют работы, в которых установлено, что разрушение переднего мозга приводит к значительному снижению или исчезновению активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и холинацетилтрансферазы (ХАТФ) в луковиче, тогда как перерезка обонятельного нерва или аносмирование не влияют на удельную активность АХЭ [9-10].

Исследуя активность АХЭ в периферическом и центральном отделах обонятельной системы рыб с различной экологией, мы обнаружили наличие положительной корреляции между активностью фермента в луковиче и значением обоняния в жизни и поведении вида [1]. Это позволило предположить, что в обонятельной луковиче рыб, как и у млекопитающих, есть холинергические синапсы, участвующие в обработке обонятельных сигналов. Однако для большей обоснованности этого высказывания необходимо экспериментально проверить наличие связи между обонятельной функцией и активностью фермента в луковиче рыб. Задача настоящей работы – выяснить, зависит ли удельная активность АХЭ обонятельной луковичи карася от центробежных влияний, а также от нагрузки афферентного входа.

Работа выполнена на карасе. Рыб подвергали хирургическим воздействиям двух видов. В первом случае у карасей перерезали обонятельный тракт, во втором – выжигали обонятельную выстилку. Контролем служили интактные рыбы или рыбы с ложной операцией. Активность АХЭ в обонятельной луковиче и переднем мозге определяли по методике, описанной нами ранее (см. наст. кн., с. 67-78). При изучении вопроса о центробежном влиянии на синтез АХЭ в обонятельной луковиче рыб подвергали действию фосфорорганического инсектицида фосдрин. Как известно, фосфорорганические соединения (ФОС) обладают антихолинэстеразным свойством, заключающемся в необратимом ингибировании холинэстераз, в том числе и АХЭ. Восстановление активности фермента после прекращения воздействия ФОС происходит благодаря синтезу новой АХЭ [4]. На основании литературных данных о динамике восстановления АХЭ [2] были подобраны концентрации и продолжительность воздействия фосдрином, при которых восстановительные процессы идут с достаточно высокой скоростью.

Влияние перерезки обонятельного тракта на удельную активность АХЭ в центральных отделах обонятельной системы карася, мкмоль/(г·ч)

Время после операции, сут	Контроль (ложная операция)			Опыт (перерезка тракта)		
	<i>n</i>	обонятельная луковича	передний мозг	<i>n</i>	обонятельная луковича	передний мозг
1	2	868	383	4	795±313	393±79
2	-	-	-	4	863±199	333±48
3	2	610	164	4	725±169	227±144
7	6	703±238	301±37	4	558±240	308±108

Примечание. Здесь и в табл. 2: *n* - количество измерений.

Карась имеет стебельчатые обонятельные луковичи, характеризующиеся высоким уровнем активности АХЭ (норма - 700±155 мкмоль/(г·ч)), значительно превышающим активность в переднем мозге (норма - 244±35 мкмоль/(г·ч)). Изоляция обонятельной луковичи от центробежных влияний, по нашим данным, не вызывает заметных изменений в активности фермента (табл. 1). В течение первых 3 сут с начала опыта активность АХЭ в луковиче оперированных карасей практически не отличается от контроля. Незначительное ее снижение наблюдается на 7-е сутки, однако оно не достоверно. В переднем мозге карасей с перерезанными трактами, так же как и у рыб с ложной операцией, заметно некоторое повышение активности АХЭ в первые сутки, причины которого неизвестны. В основном же колебания уровня АХЭ в этом отделе мозга находятся в пределах ошибки среднего.

Используя предварительное необратимое ингибирование АХЭ с помощью фосдрин, мы попытались выяснить, влияет ли перерезка обонятельного тракта на скорость синтеза АХЭ в луковиче. Содержание рыб в растворе фосдрин вызывает снижение активности фермента в обонятельной луковиче на 84 %, а в переднем мозге - на 80 % (табл. 2). Через сутки после действия фосдрин за счет синтеза новой АХЭ удельная активность фермента в обонятельной луковиче у контрольных рыб (с интактными трактами) восстанавливается на 73 % по сравнению с нормальным уровнем, а в переднем мозге превышает норму на 16 %. Опытные караси от контрольных практически не отличаются. На 3-и сутки с начала опыта активность АХЭ в контроле достигает исходного уровня, в то время как в луковиче опытных рыб она на 12 % ниже нормы. Эти

Т а б л и ц а 2

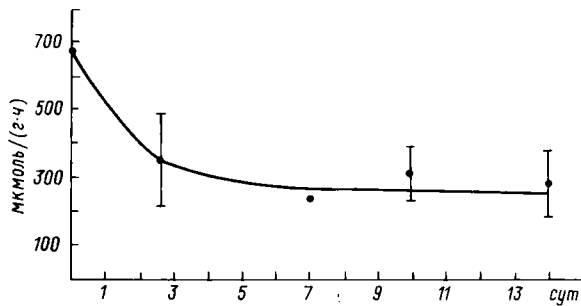
Синтез АХЭ в центральных отделах обонятельной системы карася в норме и при нарушенной эфферентации луковицы

Условия эксперимента	Удельная активность АХЭ, мкмоль/(г·ч)			
	n	обонятельная луковица	n	передний мозг
Интактные караси	14	682±100	14	241±34
Фосдрин, 100 мг/л, 30 мин	2	110	2	49
1 сут:				
контроль	8	577±41	7	302±64
опыт	12	615±98	14	283±31
3 сут:				
контроль	8	694±144	8	324±38
опыт	4	629±221	4	307±36

различия невелики и статистически недостоверны. Поскольку увеличение активности фермента в данном случае определяется его синтезом, то полученный результат означает, что скорость синтеза АХЭ в обонятельной луковице карася не испытывает центробежного влияния.

Следующая задача заключалась в выяснении вопроса о зависимости активности АХЭ обонятельной луковицы от ее афферентного входа. Результаты опытов с аносмированием представлены на рисунке. Отсутствие потока афферентных импульсов в течение 3 сут приводит к снижению активности АХЭ в луковице на 45 %. Затем этот процесс замедляется и за весь дальнейший период наблюдений (11 сут) активность снижается всего на 13 %. В целом в результате блокирования афферентного входа активность фермента в луковице ингибируется на 60 %.

Для выяснения центробежного влияния проведен еще один вариант опытов. Мы предположили, что оно должно проявиться более отчетливо при отсутствии эффекта афферентного входа, например у аносмированных рыб в период между 7-ми и 14-ми сутками, когда кривая активности АХЭ выходит на плато. Чтобы выяснить это, карасям перерезали обонятельные тракты спустя неделю после удаления у них обонятельных выстилок. Через 3 сут после этой операции и соответственно через 10 сут с начала аносмирования активность АХЭ в луковице этих рыб составила (191±73) мкмоль/(г·ч), т. е. оказалась на 17 % ниже, чем у карасей с интактными трактами – (322±39) мкмоль/(г·ч). Однако различие между опытом и контролем статистически недостоверно. Таким образом, и в



Удельная активность АХЭ в обонятельной луковице караса после аносмирования.

этих условиях центробежное влияние на активность АХЭ в луковице караса не проявилось.

В соответствии с поставленной задачей нас интересовали те изменения активности АХЭ в луковице, которые связаны с обонятельной функцией и обусловлены прекращением афферентного и эфферентного потоков нервных импульсов. Последнее достигалось с помощью хирургического вмешательства — перерезки обонятельного тракта или удаления обонятельной выстилки. В таких случаях следует иметь в виду возможность изменений в активности фермента, вызванных дегенерацией структурных элементов луковицы, участвующих в его синтезе. Учитывая это, обонятельные тракты перерезали ближе к переднему мозгу. В течение недели после операции длина периферических концов трактов оставалась неизменной, в то время как центральные концы за этот срок заметно укорачивались. Таким образом, надо полагать, что ретроградная дегенерация в обонятельной луковице не имела места. Что же касается дегенеративных изменений в луковице при удалении обонятельной выстилки, то, согласно литературным данным [5, 11], в двухнедельный период они затрагивают только аксодендритные синапсы, не распространяясь на другие синаптические контакты внутри клубочков. Поскольку ацетилхолин не является медиатором в этих синапсах [3], то вряд ли наблюдаемое нами снижение активности АХЭ связано с этими структурными изменениями. Тем более, что максимум снижения АХЭ (1–3 сут) опережает первые типичные признаки дегенерации, обычно наблюдаемые начиная с 3–5-х суток после разрушения выстилки или перерезки обонятельного нерва [5, 11].

* * *

Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что уровень активности АХЭ в обонятельной луковице караса в значительной мере зависит от функциональной нагрузки афферентного входа, а центробежное влияние на активность фермента не существенно. Напомним, что в нескольких работах на млекопитающих

[5, 11] получены прямо противоположные результаты, согласно которым функциональная депривация не влияет на уровень активности АХЭ в обонятельной луковице, а деэfferентация приводит к значительному снижению и даже исчезновению активности. В чем причина таких различий, пока не ясно. Тем не менее в настоящей работе экспериментально показано, что активность АХЭ в обонятельной луковице карася определяется афферентным потоком импульсов. Это свидетельствует в пользу предположения о наличии холинергической синаптической передачи в обонятельной луковице рыб.

Л и т е р а т у р а

1. Г д о в с к и й П.А., Р у ж и н с к а я Н.Н. Роль холинергической системы в восприятии запаха у рыб различной экологии // Экология и биологическая продуктивность Баренцева моря: Тез. докл. Мурманск, 1986.
2. К о з л о в с к а я В.И., С т е п а н о в а В.М., Ч у й к о Г.М. Обратимость интоксикации карпа карбофосом // Реакции гидробионтов на загрязнение. М., 1983.
3. М и н о р А.В. Физиология обоняния // Физиология сенсорных систем. Л., 1972. Ч. 2.
4. Р о з е н г а р т В.Н., Ш е р с т о б и т о в О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Л., 1978.
5. В e r g e r B. Formes diverses de degenerescence des boutons synaptiques dans le glomerule olfactif de lapin apres lesion du nerf olfactif // Brain Res. 1971. Vol. 33.
6. С a r s o n К.А., В u r d С.Д. Localization of acetylcholinesterase in the main and accessory olfactory bulb of the mouse by light and electron microscopic histochemistry // J. Comp. Neurol. 1980. Vol. 191.
7. L a r g e I.H., L a m b e r t M.P., G r e m i l l o n M.A., К l e i n W.L. Parallel postnatal development of choline acetyltransferase activity and muscarinic acetylcholine receptors in the rat olfactory bulb // J. Neurochem. 1986. Vol. 46.
8. М а с р и д е s F., D a v i s B.J., У o n a r g s W.M., N a d N.S., M a r g o l i s F.L. Cholinergic and catecholaminergic afferents to the olfactory bulb in the hamster: a neuroanatomical, biochemical and histochemical investigation // J. Comp. Neurol. 1981. Vol. 203, N 3.
9. М e i s a m i E., М o u s a v i R. Lasting effects of early olfactory deprivation on the growth, DNA, RNA and protein content, and Na-K-ATP-asa and

- AChE activity of the olfactory bulb // Develop. Brain Res. 1981. Vol. 2, N 2.
10. M e i s a m i E., M o u s a v i R., S a t a u R. AChE and Ach in rat olfactory bulb during development and under olfactory deprivation // Proc. Europ. Soc. Neurochem. Gottingen ect., 1978.
 11. W i n k e l m a n n E., M a r x J. Mikroskopischen und submikroskopischen Veränderungen im Telencephalon von Ampystoma mexicanum nach Resektion des Riechorgans // Forschung. 1969. Bd 81, H. 1.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ОЦЕНКИ
ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ
ВЕЩЕСТВ НА РЫБ

Основные принципы оценки токсичности загрязняющих веществ для гидробионтов основываются на использовании показателей, которые наиболее полно „отражают благополучие особи вида“. Это – выживаемость, размножение, плодовитость, качество потомства [9], а также рост. Применительно к рыбам последний показатель приобретает особую ценность, поскольку от темпа роста во многом зависят их товарные качества.

В последние годы проблема диагностирования сублетального действия токсических веществ на рыб становится все более актуальной. Для решения этой проблемы необходима оценка состояния рыб, обитающих непосредственно в загрязненных водоемах. В настоящее время основным и практически единственным методом изучения сублетальных эффектов токсикантов являются хронические эксперименты, охватывающие жизненный цикл гидробионтов полностью или частично. Однако такие эксперименты чрезвычайно трудоемки и осуществимы с ограниченным набором видов. Кроме того, данные, полученные в результате лабораторных экспериментов, не всегда адекватно отражают реальную ситуацию в водоеме. Поэтому одни только лабораторные хронические опыты не могут быть признаны достаточно эффективным методом изучения сублетального действия загрязняющих веществ на рыб.

В связи с этим представляется перспективным поиск „экологически весомых“ биохимических показателей токсичности, которые, проявляясь до гибели организма и отражая степень его неблагополучия, могут служить диагностическими тестами состояния водных животных, населяющих природные водоемы. Одним из таких перспективных биохимических тестов является коллаген позвоночника, метаболизм которого тесно связан с процессами роста организмов.

Коллаген и его роль в организме. Коллаген – самый распространенный белок многоклеточных организмов, от губок до человека [49]. Состав коллагена своеобразен: треть аминокислотных остатков представлена глицином, что необычайно много для белков. Имеются 2 аминокислоты – оксипролин и оксилизин, редко встречающиеся в других белках, высоко содержание пролина [47, 49]. Основная структурная единица коллагена – тропоколлаген, состоящий из 3 закрученных относительно друг друга полипептидных цепей, каждая из которых имеет форму спирали. В зависимости от типа коллагена состав этих цепей различен. В настоящее время выделено 5 типов коллагена, представленных не менее чем 10 молекулярными формами [5, 13, 14, 47].

Коллаген синтезируется клетками в виде высокомолекулярного предшественника – протоколлагена, который секретируется, а затем на его основе внеклеточно под действием соответствующих ферментов образуется тропоколлаген [14]. При формировании уникальной структуры коллагена оксипролин и оксилизин включаются в молекулу коллагена не в процессе сборки полипептидной цепи, а при гидроксилировании пролина и лизина. Процесс происходит под действием специфических ферментов – пролингидроксилазы (К.Ф. 1.14.11.2, пролилглицил-пептид, 2-оксоглутарат: кислород оксидоредуктаза [6]) и лизингидроксилазы (К.Ф. 1.14.11.4, пептидиллизин, 2-оксоглутарат: кислород оксидоредуктаза [6]), свободного кислорода и соответствующих кофакторов (α -кетоглутарат, ионы двухвалентного железа и аскорбиновая кислота) [14, 18, 39].

Гидроксилирование пролина и лизина – чрезвычайно важный процесс. ОН-группы оксилизина и оксипролина участвуют в образовании поперечных швов, от которых во многом зависят механические свойства коллагеновых волокон (прочность, эластичность, упругость) [11, 12]. Этим волокнам свойственны 2 типа поперечных швов: внутримолекулярные (в пределах одной тропоколлагеновой единицы) и межмолекулярные (между отдельными тропоколлагеновыми единицами) [47].

В организме коллаген выполняет опорную функцию. Он составляет около 90 % органического матрикса костей и других опорных тканей. В том или ином количестве коллаген содержится также почти во всех органах и объединяет клетки в определенные структурные единицы. В коллагеновых волокнах между концом одной молекулы тропоколлагена и началом другой имеются промежутки около 40 нм, выполняющие роль центров отложения минеральных веществ [10, 21]. Минеральная часть кости представлена главным образом фосфатом кальция в виде кристаллов оксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$ и, кроме того, включает карбонаты, фториды, гидроксиды и цитраты [17]. В промежутках между молекулами тропоколлагена располагается около 50 % кальция кости, а остальной кальций присутствует в некристаллической форме и образует в фибриллах коллагена минеральные мостики, увеличивающие прочность кости [10]. Коллагену свойственны и регуляторные функции, он непосредственно участвует в определении направления биохимических процессов в клетке. Показано участие коллагена в регуляции процессов эмбриогенеза, морфогенеза, цитодифференцировки, а также в поддержании гомеостаза организма и формировании иммунологической памяти [3].

Действие загрязняющих веществ на коллаген. При изучении действия хлорорганических пестицидов на черноголовую пимефалес *Pimephales promelas Rafinesque*, канального сомика *Ichthalus punctatus (Rafinesque)* и гольца *Salvelinus fontinalis (Mitchill)* установлено, что эти вещества угнетают синтез коллагена или приводят к изменению его свойств. Воздействие токсафеном (0,055–0,727 мкг/л) в течение 150 сут на 10-суточных мальков черноголовой пимефалес вызывало уменьшение содержания в

позвоночнике рыб коллагена, оксипролина и лизина, а также увеличение количества кальция и повышение степени минерализации кости. У рыб развивался синдром „сломанной спины“. Рентгенографически выявлена деформация позвоночника. При действии электрического тока (напряжение 60 В) такие позвоночники ломались [36]. Аналогичный эффект получен и на 40-суточных мальках этого же вида с концентрациями токсафена 0.097 и 0.173 мкг/л. Снижение количества коллагена и оксипролина отмечено на 98-е сутки. Причем изменения в количестве оксипролина наступали раньше, чем в содержании коллагена [27, 31, 36, 37].

90-суточное экспонирование в токсафене (0.039–0.139 мкг/л) гольца (икра и мальки, вылупившиеся из нее) и канального сомика (икра и мальки, полученные от производителей, находившихся в растворах токсиканта) также влияло на состав и свойства их позвоночника. В отличие от черноголовой пимефалес, у этих рыб изменялось не только содержание коллагена и кальция в позвоночнике, но и содержание фосфора [27, 31, 37]. При этом у гольца количество оксипролина уменьшалось на 7-е сутки после вылупления, а достоверные изменения массы наступали на 30-е сутки [37]. Коэффициент корреляции между концентрацией коллагена и оксипролина в позвоночнике и массой рыб, экспонированных в токсафене, был довольно высоким. Отмечено, что корреляция между коллагеном и массой была выше (0.626–0.911), чем между оксипролином и массой (0.179–0.911) [31].

30-суточное пребывание только что вылупившихся мальков черноголовой пимефалес в растворах кепона и мирекса показало, что кепон (0.17 и 0.31 мкг/л) достоверно снижает, а мирекс (3 и 7 мкг/л) достоверно увеличивает количество оксипролина в теле мальков. При больших концентрациях мирекса (13 и 34 мкг/л) тенденция в изменении содержания оксипролина сохранялась, но отличия были статистически недостоверны. Через 120 сут воздействия кепоном снижалось и содержание коллагена, но мирекс к этому времени уже не оказывал на рыб никакого влияния. Вместе с тем концентрация оксипролина в плавательном пузыре достоверно снижалась как при действии кепона (0.031–0.31 мкг/л), так и мирекса (3–34 мкг/л) [38].

Для хлорорганических пестицидов выявлена определенная связь между накоплением токсиканта в организме и концентрацией коллагена позвоночника. Так, формирование кости у мальков гольца, черноголовой пимефалес и канального сомика нарушалось при накоплении у них токсафена в количестве 0.4, 0.2–0.6, 1–1.5 мкг/г сырой массы. Изменения в позвоночнике половозрелых рыб наступали при более высоких остаточных количествах токсиканта (у черноголовой пимефалес – 1–3.3, канального сомика – 11 мкг/г сырой массы), чем у мальков [27]. Анализ рыб из водоемов с различной степенью загрязненности показал, что как у хищных видов (судака *Stizostedion lucioperca* (L.), окуня *Perca fluviatilis* L.), так и у мирных (леща *Abramis brama* L., серебряного карася *Carrasius auratus* L.) при большем содержании ДДТ и его ме-

таболоитов в жировой ткани коллагена в позвоночнике было меньше на 30,5–62,7 % [4]. Аналогичные результаты получены на плотве *Rutilus rutilus* L. и щуке *Esox lucius* L. при сопоставлении остаточных количеств хлорорганических пестицидов (ДДТ, ДДЕ, ДДД, полихлорпинена и линдана) в рыбе и концентрации коллагена в позвоночнике [32].

Изучено влияние полихлорированного бифенила ароклора 1254 (0,43–13 мкг/л) на гольца (икра за 10 сут до вытупления и мальки). Через 38 сут экспонирования в растворах с концентрациями 1,5–13 мкг/л отмечено снижение содержания в позвоночнике оксипролина и витамина С. Через 48 сут при этих же концентрациях наблюдались достоверные изменения массы рыб. При переходе на активное питание часть мальков погибла. Содержание оксипролина и фосфора в позвоночнике выживших мальков через 118 сут пребывания в растворах ароклора 1254 (0,69–6,2 мкг/л) было низким. Различий в массе между опытными и контрольными мальками в этот период не выявлено [31, 33].

При длительном воздействии фосфорорганическим пестицидом хлорофосом (5 мг/л) на карася *Carassius carassius* L. наблюдалось снижение содержания коллагена позвоночника. Достоверные изменения отмечены через 45 сут, на 65–е сутки концентрация коллагена в позвоночнике повысилась до уровня контроля, а через 85 сут вновь существенно уменьшилась. При этом уровень пролина, оксипролина, кальция и фосфора не изменялся [1, 2]. Фосфорорганический дефолиант ДЕФ (бутифос) (0,76–9,5 мкг/л) в течение 90 сут не влиял на состав позвоночника (коллаген, кальций, оксипролин, фосфор) радужной форели *Salmo gairdneri* Richardson, подвергавшейся действию токсиканта на 12–е сутки после вытупления. Однако изменялась плотность позвонков, выраженная отношением их сухой массы к объему. При концентрации токсиканта 1,7–9,5 мкг/л она снизилась на 12–19 %. При действии ДЕФ на канального сомика плотность позвонков также уменьшалась на 16–28 % и достоверно снижалось содержание оксипролина и фосфора. Как у радужной форели, так и у канального сомика уменьшение плотности позвонков коррелировало со снижением их прочности (предела упругости и величины разрывного усилия) [16].

Воздействие диметилевой солью 2,4–Д (0,5–2 мкг/л) на 9–месячных мальков черноголовой пимефалес в течение 60 сут приводило к снижению содержания коллагена в позвоночнике (концентрация токсиканта 1 и 2 мкг/л) и увеличению оксипролина (концентрация токсиканта 0,5 и 2 мкг/л) [31]. У полуторагодового гольца и 10–суточных мальков черноголовой пимефалес, испытывавших продолжительное влияние пластификатора ди–2–этилгексилфталата (150 и 127 сут соответственно), также уменьшалось содержание коллагена, а содержание оксипролина возрастало. Такой эффект зарегистрирован на гольце и на радужной форели при концентрациях токсиканта соответственно 3,7–52 и 11–26 мкг/л. Вместе с тем у черноголовой пимефалес при высоких концентрациях токсиканта (52 и 100 мкг/л)

количество коллагена уменьшалось, а оксипролина – оставалось без изменений [31].

Таким образом, различные загрязняющие вещества изменяют содержание коллагена в позвоночнике рыб. Механизмы действия токсикантов на коллаген пока недостаточно ясны. Однако есть основания полагать, что они обусловлены химической природой веществ. Среди изучавшихся соединений наиболее понятно действие токсафена. У рыб, испытывающих влияние этого токсиканта, снижается и перераспределяется количество витамина С. Отношение витамина С в печени к таковому в позвоночнике возрастает, что обусловлено усилением потребления аскорбиновой кислоты для детоксикации токсафена оксидазами смешанных функций печени [27, 29–32, 37]. Дефицит аскорбиновой кислоты в позвоночнике неблагоприятно сказывается на витамин-С-зависимых процессах синтеза коллагена. Замедляется гидроксилирование пролина, снижаются концентрация оксипролина в коллагене и общее содержание коллагена в позвоночнике. Наблюдаемые при этом деформации позвоночника (сколиоз, лордоз, кифоз) объясняются накоплением хрупких костных структур [27, 29–32, 36, 37]. Аналогичные явления описаны при дефиците витамина С в рационе [25, 26]. Снижение количества оксипролина и отношения концентраций оксипролин/пролин, как правило, предшествуют появлению видимых изменений позвоночника [23, 41–45]. Сходные нарушения прослеживаются и при интоксикации ароклором 1254 [31, 33].

Другие токсические вещества, снижая концентрацию коллагена, не влияют на содержание в нем оксипролина или же, напротив, повышают ее. Диметилловая соль 2,4-Д, ди-2-этилгексилфталат, а также мирекс вызывают усиление гидроксилирования пролина, изменяя тем самым свойства коллагена [31]. Хлорофос, вероятно, угнетает синтез коллагена за счет ингибирования эстераз [1, 2]. Токсиканты могут действовать и на гидроксилирующие ферменты. Так, введение в культуру костной ткани кадмия и цинка вызывает снижение активности лизиноксидазы, а марганца и ртути – ее повышение [22]. Содержание крыс на рационе с кадмием также снижает активность лизиноксидазы, что приводит к уменьшению степени гидроксилирования молекул коллагена и увеличению доли его растворимой фракции [22].

Интоксикация рыб загрязняющими веществами влияет не только на содержание и свойства коллагена, но изменяет и соотношение минеральной (кальций и фосфор) и органической (коллаген) составляющих позвоночника [31, 36]. Повышение степени минерализации кости (увеличение отношения $Ca+P$ /коллаген), а также степень гидроксилирования коллагена существенно сказываются на формировании и механических свойствах позвоночника (прочность и упругость) [20, 36, 40, 48]. Позвонки становятся более хрупкими и при повышенной двигательной активности рыб могут ломаться в результате резких мышечных сокращений. Ухудшение их свойств и структуры сказывается на выживании рыб [35, 36, 46].

Действие токсикантов на метаболизм коллагена изучали на различных стадиях развития рыб (икра, мальки, сеголетки и взрослые

рыбы, в том числе производители). Отмечено, что в большей степени влияние токсикантов на синтез коллагена проявляется на ранних стадиях развития и у более молодых рыб [28, 31]. При сопоставлении массы, длины и содержания коллагена позвоночника установлено, что первоначально ингибируется синтез коллагена, а затем замедляется рост [28, 31, 33, 37].

Поскольку снижение синтеза коллагена предшествует изменению темпов роста, определение его концентрации в позвоночнике можно рассматривать как прогностический тест при оценке хронического действия загрязняющих веществ на рыб, а возможно, и как показатель состояния рыб в водоеме. В последнем случае необходимо учитывать потенциальную изменчивость количественных и качественных характеристик метаболизма коллагена. Она может быть связана как с видовыми особенностями рыб, так и с их физиологическим состоянием [5, 7, 8, 15, 19, 24, 34]. Оценивая состояние рыбы в водоеме по изменению содержания коллагена в позвоночнике, следует анализировать рыб одного возраста, вида, физиологического состояния и в пределах одного сезона.

Л и т е р а т у р а

1. (Козловская В.И., Майер Ф.) K o z l o v s k a y a V.I., M a y e r F. Brain acetylcholinesterase and backbone collagen at intoxication of fish with organophosphorus pesticides // J. Great Lakes Res. 1984. Vol. 10, N 3.
2. Козловская В.И., Майер Ф., Петти Дж. Активность ацетилхолинэстеразы мозга и содержание коллагена в позвоночнике карася при интоксикации хлорофосом // Гидробиол. журн. 1984. Т. 20, № 4.
3. Лебедев Д.А. Коллагеновые структуры - одна из информационных систем организма // Успехи соврем. биологии. 1979. Т. 88, № 1 (4).
4. Маслова О.Н. Сравнительная оценка содержания коллагена в позвоночнике рыб Днепро-Бугского лимана и Килийской дельты Дуная // Гидробиол. журн. 1981. Т. 18, № 15.
5. Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утевская Л.А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. Киев, 1977.
6. Номенклатура ферментов. М., 1979.
7. Поликарпова Н.И., Солодова Е.В., Печенова Т.Н., Шевцова Н.Ф. Сравнительное изучение аминокислотного состава коллагена кожи леща в различные периоды жизненного цикла // ДАН УССР. 1977. Т. 5, № 12.
8. Преображенский А.А., Глинка А.В. Изучение биосинтеза коллагена в раннем эмбриогенезе белуги // Биохимия. 1988. Т. 48, № 2.
9. Строганов Н.С., Фленко О.Ф., Лебедев А.Г.Д. и др. Основные принципы биотестирования сточных

- вод и оценка качества вод природных водоемов // Теоретические вопросы биотестирования. Волгоград, 1983.
10. A s k e n a s i R. Relation entre la matrice osseuse et la phase minerale // Rev. Med. Bruxelles. 1978. Vol. 34, N 4.
 11. B a i l e y A., R o b i n s S. Development and maturation of the crosslinks in the collagen fibres of skin // Front. Matrix. Biol. Basel. etc., 1973. Vol. 1.
 12. B e n t l e y J.A. Ageing of collagen // J. Invest. Dermatol. 1979. Vol. 73, N 1.
 13. B l u m e n k r a n t z N., A s b o e-H a n s e n G. Hydroxyproline to hydroxylysine molar ratio indicates collagen type // Acta dermato-venereol. 1978. vol. 58, N 2.
 14. B o r n s t e i n P. The biosynthesis of collagen // Ann. Rev. Biochem. 1974. Vol. 43.
 15. B r i d e M., B e n s h i m o n e S., S t o c k e r S., G r i m a u d J. Mise en evidence du collagène par immunofluorescence au cours du développement du Xenope (*Xenopus laevis* Daud.) // C.r. Soc. biol. Vol. 176, N 4.
 16. C l e v e l a n d L., H a m i l t o n S. Toxicity of the organophosphorus defoliant DEF to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*) // Aquat. Toxicol. 1984. Vol. 4, N 5.
 17. D r i e s s e n c e F. The mineral in bone, dentin and tooth enamel // Bull. Soc. chim. belq. 1980. Vol. 89, N 8.
 18. F l a n a g a n B., N i c h o l s G. Metabolic studies of bone in vitro. IV. Collagen biosynthesis by surviving bone fragments in vitro // J. Biol. Chem. 1962. Vol. 237, N 6.
 19. G r e e n H., G o l d b e r g B., S c h w a r t z M., B r o w n D. The synthesis of collagen during the development of *Xenopus laevis* // Develop. Biol. 1968. Vol. 18, N 4.
 20. H a m i l t o n S., M e h r l e P., M a y e r F., J o n e s J. Mechanical properties of bone in channel catfish as affected by vitamin C and toxaphene // Trans. Amer. Fish. Soc. 1981. Vol. 110, N 6.
 21. H ö h l i n g H., A l t h o f f J., B e r k h a u s R. etc. Early stages of crystall nucleation in hard tissues formation // Intern. Cell. Biol., 1980-1981; 2nd Intern. Congr., Berlin (West.) Berlin etc., 1980.
 22. I g u c h i H., S a n o S. Effect of cadmium on the bone collagen metabolism of rat // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1982. Vol. 62, N 1.

23. I k e d a S., S a t o M., Y o s h i n a k a R.
Role of vitamin C in collagen formation of fish //
Vitamins. 1983. Vol. 57, N 8.
24. L i m C., L o v e l l R. Pathology of vitamin C
deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus
punctatus*) // J. Nutr. 1978. Vol. 108, N 7.
25. M a h a j a n C., A g r a w a l N. Vitamin C de-
ficiency in *Channa punctatus* Bloch // J. Fish. Biol.
1979. Vol. 15, N 6.
26. M a h a j a n C., A g r a w a l N. The role of
vitamin C in calcium uptake by fish // Aquaculture.
1980. Vol. 19, N 3.
27. M a y e r F., M e h r l e P. Toxicological as-
pects of toxaphene in fish: a summari // Trans.42nd
N. Amer. Wildlife Nat. Res. Conf. Washington, 1977.
28. (M a y e r F., M e h r l e P.) M а й е р Ф.,
М е р л е П. Коллаген и гидроксипролин в токсикологических
исследованиях на рыбах // Влияние загрязняющих веществ
на гидробионтов и экосистемы водоемов. Л., 1979.
29. M a y e r F., M e h r l e P., D w y e r W. To-
xaphene effects on growth, reproduction and mor-
tality of brook trout // Ecol. Res. Ser. USA EPA
N 660/3-75-013. Duluth, 1975.
30. M a y e r F., M e h r l e P., D w y e r W. To-
xaphene: chronic toxicity to fathead minnows and
channel catfish // Ecol. Res. Ser. USA EPA
N 600/3-77-069. Duluth, 1977.
31. M a y e r F., M e h r l e P., S c h o e t g e r R.
Collagen metabolism in fish exposed to organic che-
micals // Recent Advances in Fish Toxicology:
a symposium. Corvallis, 1977.
32. (M a y e r F., P e t t y J., К о з л о в с -
к а я V.I., Ф л е р о в B.A.) M а й е р Ф.Л., П е т -
т и Дж.Д., К о з л о в с к а я В.И., Ф л е р о в Б.А.
Определение остаточных количеств пестицидов в рыбах
Рыбинского водохранилища // Гидробиол. журн. 1981.
Т. 18, № 5.
33. M a u s k W., M e h r l e P., M a y e r F.
Effects of the polychlorinated biphenil Aroclor 1254
on growth, survival, and bone development in brook
trout (*Salvelinus fontinalis*) // J. Fish. Res. Board
Canada. 1978. Vol. 35, N 8.
34. M c B r i d e J., M a c L e o d R., I d l e r D.
Seasonal variation in the collagen content of Paci-
fic herring tissues // J. Fish. Res. Board Canada.
1960. Vol. 17, N 8.
35. M e h r l e P., H a i n e s T., H a m i l t o n S.
etc. Relationship between body contaminants levels

- and bone development in West-Coast Striped Bass // Trans. Amer. Fish. Soc. 1982. Vol. 111, N 2.
36. M e h r l e P., M a y e r F. Toxaphene effects on growth and bone composition of fathead minnows, *Pimephales promelas* // J. Fish. Res. Board Canada. 1975. Vol. 32, N 5.
 37. M e h r l e P., M a y e r F. Bone development and growth of the fish as affected by toxaphene // Fate of pollutants in the air and water environment. Washington, 1977. Pt 2.
 38. M e h r l e P., M a y e r F., B u c k l e r D. Kepon and mirex: effects on bone development and swim bladder composition in Fathead minnows // Trans. Amer. Fish. Soc. 1981. Vol. 110, N 4.
 39. M u s s i n i E., H u t t o n J., U d e n f r i e n d S. Collagen proline hydroxylase in wound healing, granuloma formation, scurvy and growth // Science. 1967. Vol. 157, N 3791.
 40. R u c k e r R., R i g g i n s R., L a u g h - l i n R. etc. Effects of nutritional copper deficiency on the biomechanical properties of bone and arterial elastin metabolism in chick // J. Nutr. 1975. Vol. 105, N 10.
 41. S a t o M., K o n d o T., Y o s h i n a k a R., I k e d a S. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1982. Vol. 48, N 4.
 42. S a t o M., K o n d o T., Y o s h i n a k a R., I k e d a S. Effect of water temperature on the skeletal deformities in ascorbic acid deficient rainbow trout // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1983. Vol. 49, N 3.
 43. S a t o M., Y o s h i n a k a R., I k e d a S. Dietary ascorbic acid requirements of rainbow trout for growth and collagen formation // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1978. Vol. 44, N 9.
 44. S a t o M., Y o s h i n a k a R., I k e d a S. Nonessentiality of ascorbic acid in the diet of carp // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1978. Vol. 44, N 10.
 45. S a t o M., Y o s h i n a k a R., K o n d o T., I k e d a S. Accumulation of the underhydroxylated collagen in rainbow trout fed the diet with deficit of the ascorbic acid // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1982. Vol. 48, N 7.
 46. (S c h o e t t g e r R.) Ш о т т г е р Р. Регистрация пестицидов: некоторые соображения о проведении тестов по определению токсичности в воде // Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов. Л., 1979.

47. (S t r y e r L.) С т р а й е р Л. Биохимия. М., 1984. Т.1.
48. V o g e l H. Influence of maturation and aging on mechanical and biomechanical properties of rat bone // Gerontology. 1979. Vol. 25, N 1.
49. (W h i t e A., H e d l e r F., S m i t h E., H i l l R., L e m a n I.) У а й т А., Х е н д л е р Ф., С м и т Э., Х и л л Р., Л е м а н И. Основы биохимии. М., 1981. Т. 3.

ДЕЙСТВИЕ ХЛОРОФОСА НА СТРОИТЕЛЬНОЕ
ПОВЕДЕНИЕ ЛИЧИНОК РУЧЕЙНИКОВ
SNAETOPTERYX VILLOSA FABR.

Поведение водных животных (как приобретенное, так и инстинктивное) может существенно изменяться при попадании в воду загрязняющих веществ [6]. Так как эти превращения могут отражаться в конечном счете на судьбе популяции, изучение влияния качества воды на поведение актуально для экологического прогнозирования. Однако использование поведенческих показателей для прогноза сталкивается с определенными трудностями. Главная из них заключается в том, что наблюдатель, обнаруживший в лаборатории те или иные отклонения в „нормальном” ходе поведения, не всегда может однозначно оценить их экологическое значение. Поэтому необходима разработка четких критериев для различия существенных и несущественных отклонений в поведении.

Этологические методы применяются и при разработке чувствительных поведенческих тестов на загрязнение воды. Здесь достигнуты значительные успехи: разработаны тесты, основанные на регистрации общей двигательной активности, реакций привлечения-избегания, пищевого и группового поведения и т. п. [3]. Тем не менее развитие и этой области связано с определенными сложностями. Даже у наиболее примитивных животных выделяется множество поведенческих реакций, каждая из которых может оцениваться по большому числу произвольно выделенных параметров. В результате поиск реакций, наиболее чувствительных к загрязнению воды, ведется вслепую и поэтому не всегда эффективен.

В настоящей работе мы рассмотрим некоторые подходы к разработке методов поиска чувствительных к загрязнению поведенческих показателей и к оценке значения наблюдаемых изменений в поведении. Наиболее распространенный подход в современных исследованиях влияния качества воды на поведение водных животных заключается в использовании так называемых интегральных показателей, к которым обычно относят общее время, затраченное на ту или иную активность в течение эксперимента или, например, количество поглощенной пищи и число агрессивных столкновений [3]. Между тем, интегральные показатели могут давать неверное представление о реакции животного на загрязнение по следующей причине.

Суммарная длительность и общая частота какого-либо поведенческого акта складывается из длительностей и частот его появления на различных участках цепи инстинктивных действий. На этих участках состояние животного и его реакция на внешнее воздействие могут быть разными. Поэтому не исключено, что под влиянием загрязняющих веществ частота регистрируемого действия будет увеличиваться на одних участках инстинктивной цепи и уменьшаться или оставаться неизменной на других. Кроме того, в психофарма-

кологических исследованиях было показано, что к действию химических веществ более чувствительны частоты переходов от одних поведенческих актов к другим и менее чувствительны общие частоты выполнения этих же актов [2].

Чувствительность поведенческого акта к загрязнению воды может зависеть и от его роли в инстинктивной цепи. В составе этих цепей выделяют appetentную фазу, на которой последовательность действий животного изменчива и чувствительна к внешнему раздражению, и завершающий комплекс фиксированных действий (КФД), относительно неизменный и нечувствительный к изменению во внешней среде. Можно предполагать, что наиболее чувствительной к качеству воды окажется appetentная фаза. В то же время известно, что биологически важной целью поведения является именно КФД, причем на его выполнении не отражаются отклонения в порядке действий на appetentной фазе.

Для изучения влияния загрязняющих веществ на последовательность поведенческих актов требуется получить этограмму поведения. Интегральные показатели могут быть выведены из этограммы, но в ней потенциально содержится значительно больше информации о реакции организма на загрязнение.

К выявлению чувствительных звеньев в поведенческой цепи можно подойти и с других позиций, применив к поведению животных представления об устойчивости динамических систем. Динамическая система рассматривается как устойчивая, если малые возмущения, вызывающие отклонения в ее состоянии, компенсируются и не отражаются на дальнейшем поведении. В случае неустойчивости, напротив, отклонения не только сохраняются, но и усиливаются [4]. Поэтому микроскопические эффекты слабых возмущений могут в дальнейшем наблюдаться на макроскопическом уровне, а неустойчивая система может служить как бы усилителем внешних воздействий. Для устойчивых систем характерна жесткая детерминация будущего поведения прошлым, а для неустойчивых – непредсказуемость. Существуют также системы, в поведении которых имеются и устойчивые и неустойчивые звенья.

Если рассматривать загрязнение воды как возмущение, действующее прежде всего на неустойчивые звенья в поведении организма, то естественно провести анализ этого поведения на устойчивость и затем сопоставить устойчивость и чувствительность к качеству воды у одних и тех же звеньев. При анализе устойчивости поведения также требуется получить этограмму. Целью данной работы было применение обоих подходов к изучению влияния хлорофоса на строительное поведение личинок *Chaetopteryx villosa* Fabr.

Ранее в поведении этих личинок мы выделили микро- и макроуровень (см. наст. кн., с. 29–41). Предположение, проверившееся в эксперименте, состояло в том, что при небольших сублетальных концентрациях хлорофоса изменения в поведении будут наблюдаться прежде всего на микроуровне и коснутся макроуровня в меньшей степени.

Личинок последнего возраста собирали в ручье и помещали по одной в чашки Петри, содержащие профильтрованную воду из ручья (контроль) или раствор хлорофоса в такой же воде. Через 24 ч личинкам разрушали домики на 2/3 и покрывали дно чашек слоем песка. Еще через 1 ч начинали регистрировать поведение каждой личинки в течение 1 ч. Порядок наблюдений был следующим: личинок из двух растворов наблюдали поочередно так, чтобы в течение 1 сут зарегистрировать поведение равного числа особей из контроля и опыта. В августе 1986 г. проведены наблюдения за 20 особями в растворе хлорофоса $5 \cdot 10^{-5}$ мг/л и 20 особями в контроле, а также за личинками в растворе $1 \cdot 10^{-5}$ мг/л (19 особей в опыте и 20 в контроле). Более подробно методика изложена в предыдущей работе (см. наст. кн., с. 29–41).

Предварительно были поставлены эксперименты на выживаемость личинок в растворах с указанными концентрациями, а также при концентрациях, на порядок больших: $5 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ мг/л. В каждый раствор помещали по 10 особей, каждую в отдельную чашку Петри, частично разрушали у личинок домики, и через 24 ч отмечали число закончивших строительство и погибших особей. Кроме того, погибших личинок регистрировали перед началом каждого наблюдения и через 24 ч после его окончания. Все эксперименты проводили при температуре 20–22 °С и естественном световом режиме. Для статистической оценки различий между опытом и контролем применяли критерий χ^2 .

В растворах с концентрациями $1 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-4}$ мг/л некоторые личинки погибали, а выжившие строили домики очень медленно и не завершали строительство за 24 ч. При концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ и $5 \cdot 10^{-5}$ мг/л все личинки выживали, как и в контроле, а домики оказывались полностью восстановленными. Особи, за поведением которых велось наблюдение, также все оставались живыми и завершали постройку через 24 ч после окончания эксперимента.

Влияние хлорофоса на частоту циклов и отдельных этапов строительного поведения

Хлорофос влиял на частоту завершения циклов строительства, а также на частоту появления некоторых этапов в составе циклов (табл. 1). Доля завершенных циклов в общем числе циклов и среднее число песчинок, приклеенных к домику каждым ручейником, не изменялись ни при одной из концентраций. Другими словами, макроуровень строительного поведения, отражающий скорость восстановления домика, оказался нечувствительным к хлорофосу. В то же время на микроуровне частота двух поведенческих актов – укрепления и ошупывания – изменялась. Укрепление представляет собой оплетение клеевой нитью внутренней поверхности домика и может наблюдаться после приклеивания песчинки в начале следующего цикла. Частота приклеиваний значительно снижалась при обеих концентрациях токсиканта, и причина этого остается неясной. Хлорофос мог

Действие хлорофоса на общие характеристики строительства у *Ch. villosa*

Характеристика поведения	Концентрация хлорофоса, мг/л					
	$1 \cdot 10^{-5}$			$5 \cdot 10^{-5}$		
	контроль	опыт	P	контроль	опыт	P
Частота завершённых циклов, % от общего	32 (677)	28 (661)	<0.95	21 (1049)	20 (1017)	<0.95
Число приклеенных песчинок, в среднем на одну личинку	10.7 (20)	9.9 (19)	<0.95	10.8 (20)	10.3 (20)	<0.95*
Частота укрепления, % от числа завершённых циклов	55 (196)	38 (168)	>0.95	62 (195)	35 (196)	>0.95
Частота ощупывания, % от числа завершённых циклов	52 (189)	53 (168)	<0.95	71 (191)	53 (196)	>0.95

Примечание. Здесь и в табл. 3-4: цифры в скобках — общее число наблюдений. P — уровень значимости различий (критерий χ^2).

* Критерий Манна-Уитни (двусторонний).

бы влиять на продукцию клейкого секрета, но тот же секрет расходуется и на приклеивание камней, а эта последняя функция не пострадала. С другой стороны, можно предполагать, что укрепление связано с раздражением от острых граней песчинок и что хлорофос снижает чувствительность к этому раздражению. Однако какими бы ни были непосредственные причины уменьшения частоты укреплений, для целей данной работы важно, что изменение, вызванное токсином на микроуровне поведения, не отразилось на его макроуровне.

Частота ощупываний после завершённых циклов не изменялась в растворе меньшей концентрации и уменьшалась при большей. Другие поведенческие акты, входящие в состав циклов, наблюдались в контроле и при обеих концентрациях хлорофоса практически одинаково часто.

Таким образом, при использовании общей частоты выполнения того или иного поведенческого акта в качестве критерия качества воды оказывается, что поведение, устойчивое на макроуровне, остается на этом же уровне нечувствительным к загрязняющему веществу, вызывающему отклонения на макроуровне.

Влияние хлорофоса на последовательность циклов и отдельных этапов строительного поведения

Хлорофос не оказывал влияния не только на частоту завершенных циклов, но и на тенденцию таких циклов следовать друг за другом, а также на сходную тенденцию незавершенных циклов (табл. 2). По окончании тех и других циклов частоты появления завершенных и незавершенных циклов существенно не различались в растворах хлорофоса и в соответствующих контрольных наблюдениях. На микроуровне картина была иной. После каждого этапа, входящего в цикл, могут выполняться 2 или более других этапов, каждый с характерной для него частотой. При действии хлорофоса эти частоты во многих случаях изменялись, причем при большей концентрации такие изменения наблюдались чаще (табл. 2). Изменение частот следования одних этапов за другими означает, что токсикант влияет на последовательность поведенческих этапов. Однако в этом случае изменения на микроуровне не отражаются на устойчивой детерминированной последовательности циклов на макроуровне.

Рассмотрим некоторые случаи влияния хлорофоса на последовательность этапов более подробно. Частоты этапов, появляющихся вслед за приклеиванием, изменяются в растворах токсиканта при обеих концентрациях. Более детальное рассмотрение показало, что этот эффект связан в основном с уменьшением общей частоты укрепления, обычно следующего сразу за приклеиванием. В результате увеличиваются частоты появляющихся вслед за приклеиванием ошупывания и других этапов. Однако ошупывание при меньшей концентрации происходит в целом не чаще, чем в контроле, а при большей концентрации наблюдается даже реже, как указывалось выше. Следовательно, при действии хлорофоса этот этап должен встречаться реже на других участках инстинктивной цепи (табл. 3). При концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ мг/л увеличение частоты ошупывания после приклеивания сопровождается уменьшением его частоты после укрепления.

Другой пример изменения частоты поведенческого акта на разных участках инстинктивной цепи связан с манипулированием песчинкой и отбрасыванием ее. Захваченной песчинкой ручейник может манипулировать несколько секунд и затем отбросить ее, он может также сделать это после длительной манипуляции (более 8 с) или после следующего этапа – установки песчинки на кромке домика. При концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ мг/л песчинки отбрасывались после длительного манипулирования или установки чаще по сравнению с контролем (табл. 4). Соответственно увеличивалась и частота длительных манипуляций в незавершенных циклах, в завершенных, напротив, они становились реже (табл. 4), чем и можно объяснить отсутствие различий в общей частоте этого этапа между опытом и контролем.

Полученные данные (см. табл. 1 и 2) свидетельствуют, что хлорофос оказывает на последовательность инстинктивных действий

Статистическая значимость различий в частотах переходов к следующим циклам или этапам у личинок в растворе хлорофоса и в соответствующем контроле у *Ch. villosa*

	Концентрация хлорофоса, мг/л	
	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
Незавершенный цикл	-	-
Завершенный "	-	-
Передвижение	-	+
Поиск песчинки	-	-
Захват песчинки	-	-
Отбрасывание	-	-
Манипулирование:		
краткое (до 8 с)	-	+
длительное (более 8 с)	-	+
Установка песчинки на кромке домика	-	-
Приклеивание	+	+
Укрепление	+	+
Ощупывание	+	-
Поворот	-	-

П р и м е ч а н и е. "+" - различия значимы при $P > 0.95$,
 "-" - различия незначимы.

более глубокое влияние, чем на интегральные показатели. Это проявляется и в большем числе изменений, и в том, что нарушения последовательности касаются и таких этапов строительства, общая частота которых не изменяется под действием токсиканта.

В то же время все эти разнообразные изменения в порядке следования этапов, как и в общей частоте их появления в составе циклов, касаются только микроуровня поведения и не сказываются на макроуровне в такой степени, чтобы это можно было обнаружить в эксперименте с использованными низкими концентрациями хлорофоса. Выше уже отмечалось, что при значительно более высоких концентрациях поведение на макроуровне также изменяется: ручейники приклеивают к домику меньше камней.

Таким образом, полученные результаты в целом соответствуют предположению о том, что чувствительность к загрязнению воды может быть связана со свойствами устойчивости поведения как динамической системы. Как уже указывалось, поведение личинок устойчиво на макроуровне по отношению к отклонениям, происходящим на микроуровне. Поэтому можно было ожидать, что подобные отклонения, вызванные слабым химическим воздействием, не обяза-

Т а б л и ц а 3

Действие хлорофоса ($5 \cdot 10^{-5}$ мг/л) на переход к ощупыванию после других этапов строительства

Переход к ощупыванию	Контроль	Опыт	P
После приклеивания, % от общего числа приклеиваний	24 (199)	43 (195)	>0.95
После укрепления, % от общего числа укреплений	68 (139)	41 (91)	>0.95

Т а б л и ц а 4

Действие хлорофоса ($5 \cdot 10^{-5}$ мг/л) на частоту длительных манипуляций при строительстве

Частота длительных манипуляций	Контроль	Опыт	P
В незавершенных циклах, % от их общего числа	11 (705)	17 (638)	>0.95
В завершенных циклах, % от их общего числа	85 (137)	68 (145)	>0.95

тельно сохраняться, но в силу устойчивости будут нивелированы и не „передадутся“ на макроуровень. Это и подтвердилось в эксперименте.

Возникает вопрос, почему на микроуровне частоты не всех этапов и переходов между этапами оказались чувствительными к токсиканту? Логично предположить, что и микроуровень строительного поведения может содержать относительно устойчивые и неустойчивые последовательности этапов. В нашей работе (см. наст. кн., с. 29–41) показано, что некоторые этапы – укрепление, ощупывание и поворот личинки в домике – не детерминированы своим прошлым появлением в предыдущих циклах. Частота и порядок следования 2 из этих этапов изменялись в растворе хлорофоса. Напротив, переход от отбрасывания песчинки к следующему этапу детерминирован предшествующим поведением ручейников. Личинка после отбрасывания склонна начать передвижение по песку, если перед захватом песчинки она уже двигалась, но переходит к поиску новой песчинки, если передвижения не было. Соответственно переход от отбрасывания к следующему этапу не изменялся под действием токсиканта (см. табл. 2), так же как и общая частота поиска и передвижения (см. табл. 1). Однако соответствие между чувствительностью этапа к токсиканту и детерминацией этого этапа предшествующим поведением не всегда очевидно. Так, длительность манипулирования зависит от

завершения предыдущего цикла, но в то же время изменяется в растворе хлорофоса большей концентрации. Для выяснения связи между детерминацией текущего поведения на микроуровне прошлыми событиями требуется более подробный анализ. Для этого необходимо ввести меру детерминизма для каждого данного этапа и количественно сопоставить ее с концентрацией токсиканта, действующей на этот этап.

Устойчивость и неустойчивость поведения личинок ручейников, разделение этого поведения на уровни и чувствительность к токсиканту можно связать с существующей этологической классификацией этапов инстинктивного поведения. Изменчивые и в некоторых случаях необязательные этапы микроуровня естественно отнести к аптентной фазе инстинктивной цепи, тогда как приклеивание песчинки, определяющее собой характер цикла на макроуровне, соответствует комплексу фиксированных действий, цели строительного поведения.

Таким образом, у ручейников наиболее важная в экологическом отношении сторона поведения – скорость восстановления домика, необходимого для укрытия и прокачивания воды, насыщенной кислородом, – наиболее устойчивая функция и наименее чувствительная к качеству воды.

Насколько зависимость между устойчивостью, этологической структурой и чувствительностью к токсиканту, выявленная при действии хлорофоса на поведение личинок ручейников, справедлива для других токсикантов и для поведения других видов животных? Хлорофос влияет на определенные биохимические показатели, в частности на активность ацетилхолинэстеразы. Однако между отдельным процессом на биохимическом уровне и отдельным поведенческим актом не существует прямой однозначной связи. Например, у пиявок [1] различные химические вещества в больших, близких к летальному порогу концентрациях, вызывают специфические симптомы, а в малых количествах эти же вещества влияют на одни и те же поведенческие акты, связанные с передвижением. Вещества, действующие на разные биохимические мишени у рыб, влияют в различной степени на одни и те же характеристики поведения [6].

Поведение животного представляет собой самостоятельную систему. Даже если изменение на биохимическом уровне непосредственно влияет только на одно звено инстинктивной цепи, то степень его дальнейшего проявления на других этапах и уровнях поведения будет определяться свойствами поведения как динамической системы. Поэтому нам представляются перспективными исследования, направленные на анализ устойчивости поведения и выявление на этой основе показателей, которые с наибольшей вероятностью могут оказаться чувствительными к качеству воды и существенными для экологического прогноза.

* * *

Хлорофос в слабых сублетальных концентрациях вызывает изменения в частоте и последовательности отдельных этапов строительства, причем при большей концентрации эти изменения затрагивают большее число этапов. Последовательность этапов – более чувстви-

тельный показатель действия токсиканта, чем их частота. В раст-
ворах токсиканта некоторые этапы встречаются чаще по сравнению
с контролем на одних участках последовательности и реже на дру-
гих. В результате общая их частота не изменяется.

Чувствительны к хлорофосу в основном те этапы, появление ко-
торых в последовательности не запрограммировано предыдущим по-
ведением личинок и может считаться проявлением неустойчивости
в поведении как в динамической системе. Другая поведенческая
характеристика – последовательность циклов строительства, состоя-
щих из отдельных этапов и заканчивающихся приклеиванием песчин-
ки к домику или ее отбрасыванием, – частично детерминирована
предыдущими циклами и устойчива к отклонениям в выполнении эта-
пов, входящих в цикл. Частота и последовательность циклов с от-
брасыванием и приклеиванием не изменяются при действии хлорофо-
са в слабых концентрациях. Только при концентрациях, близких к
летальным, приклеивание песчинок к домику замедляется.

Приклеивание песчинок представляет собой целевой акт цикла
строительного поведения, от которого зависит скорость восстанов-
ления домика, тогда как другие этапы цикла часто даже не обяза-
тельны для его успешного завершения. Таким образом, существует
связь между устойчивостью поведения как динамической системы,
его биологической ролью и чувствительностью к загрязнению воды.
Для поиска чувствительных поведенческих индикаторов качества
воды представляется перспективным выявить в цепи инстинктивного
поведения неустойчивые звенья. Напротив, экологически важным
последствием загрязнения может оказаться нарушение устойчивых
характеристик поведения.

Л и т е р а т у р а

1. Л а п к и н а Л.Н., Ф л е р о в Б.А. Использование пиявок для
идентификации пестицидов в воде // Гидробиол. журн. 1980.
Т. 16, вып. 3.
2. П о ш и в а л о в В.П. Экспериментальная психофармакология
агрессивного поведения. Л., 1986.
3. (A l a b a s t e r J.S., L l o y d R.) Алабас-
тер Дж., Л л о й д Р. Критерии качества воды для пресно-
водных рыб. М., 1984.
4. (C r u t c h f i e l d J.P., F a r m e r J.D., P a -
s k a r d N.H., S h a w R.S.) К р а т ч ф и л д Дж.П.,
Ф а р м е р Дж.Д., П а к к а р д Н.Х., Ш о у Р.С. Хаос //
В мире науки. 1987. № 2.
5. G i a t t i n a J.D., G a r t o n R.R. A review of
the preference-avoidance responses of fishes to
aquatic contaminants // Res. revs. 1983. Vol. 87, N1.
6. L i t t l e E.E., F l e r o v B.A., R u z h i n s -
k a y a N.N. Behavioral approaches in aquatic to-
xicity investigations: a review // Toxic substances
in the aquatic environment: an international aspect.
Behesda, 1985.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ ЖАБЕРНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРЭСНОВОДНЫХ КОСТИСТЫХ РЫБ

Жабры рыб – полифункциональный орган. В их эпителии осуществляются процессы дыхания, поддержания осмотического и кислотно-щелочного балансов, обмен ионов и через них же удаляются продукты метаболизма [1, 4, 6, 15, 36]. Многообразие функций определило сложное строение органа. Морфологическими исследованиями установлено существование в жаберном эпителии 2 специализированных отделов, различных по своей структуре, васкуляризации и ультратонкой организации клеточных компонентов [6, 36, 37, 45]. В соответствии с этим жаберный эпителий подразделяется на многослойный эпителий филамента (первичный), связанный с артериовенозной кровеносной системой, и двуслойный ламеллярный (вторичный), снабжаемый кровью из артерио-артериальной системы. Физиологическими исследованиями показано и функциональное различие между этими отделами эпителия [36, 37]. Согласно выполняемым функциям, эпителий филамента в настоящее время классифицируется как осморегуляторный, а ламеллярный – как респираторный.

Современные представления о функции и структуре жаберного эпителия и его отделов объединены морфофизиологической концепцией [36]. Она позволяет рассматривать жаберный эпителий как единую систему, сопряженная деятельность элементов которой направлена на выполнение жизненно важных функций в организме рыб, в первую очередь ионного обмена и дыхания. В условиях антропогенного загрязнения среды жабры рыб осуществляют адаптивные процессы на органном, тканевом и клеточном уровнях.

Нашей задачей было изучение общей структуры и ультратонкой организации жаберного эпителия пресноводных костистых рыб, различающихся по своей экологии, и исследование адаптивных реакций этого органа на изменение ионного состава окружающей среды. Материалом послужил жаберный эпителий 16 видов пресноводных костистых рыб, относящихся к 8 семействам, в норме и при различных токсических воздействиях (табл. 1). Его изучали с помощью световой, а также трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии. Центральные участки 2-го и 3-го жаберных лепестков фиксировали в 2.5 или 3 %-ном растворах глутарового альдегида, приготовленного на Na_2K -фосфатном или Na_2CO_3 -какодилатном буферах с рН 7.3 с последующей дофиксацией в 1 %-ном растворе четырехоксида осмия с добавлением танина. После дегидратации в восходящем ряду спиртов и ацетоне материал заливали в аралдит. Для исследований в световом микроскопе полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали метиленовым синим. Ультратонкие срезы толщиной 50–60 нм контрастировали 1 %-ным раствором уранил-ацетата,

Т а б л и ц а 1

Подопытный материал и условия эксперимента

Семейство и вид рыб	n	pH	Al, мг/л	Аммоний, ммоль/л	Полихлорпинен, мг/л	Фосфин, мг/л
Карповые:						
карп	82	4,5-5,0	-	-	0,02	-
карась	124	3,8-5,5	-	0,5	0,02, 0,1	-
лещ	21	5,0	-	-	-	-
плотва	15	-	-	-	-	-
синец	18	-	-	-	-	-
Окуновые:						
окунь	113	4,0-5,5	0,25; 0,5	-	-	-
судак	12	-	-	-	-	-
Лососевые:						
семга	96	5,0-5,5	0,10-0,250	-	-	-
форель ручьевая	31	5,0-5,5	-	-	-	-
" радужная	82	5,0	0,05-0,125	-	-	-
Сиговые:						
омуль байкальский	20	-	-	-	-	-
Колосковые:						
колوشка трехиглая	48	5,0	-	0,5	-	-
" девятииглая	52	-	-	0,5-2,0	-	-
Угровые:						
угорь	7	-	-	-	-	0,1
Сомовые:						
сом	4	-	-	-	-	-
Щуковые:						
щука	5	-	-	-	-	-

Примечание. Здесь и в табл. 2: n - количество исследуемых рыб.

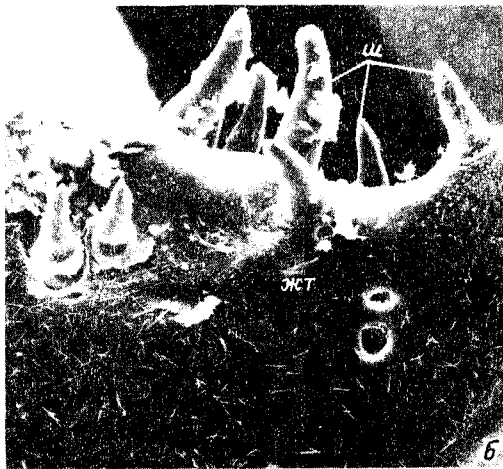
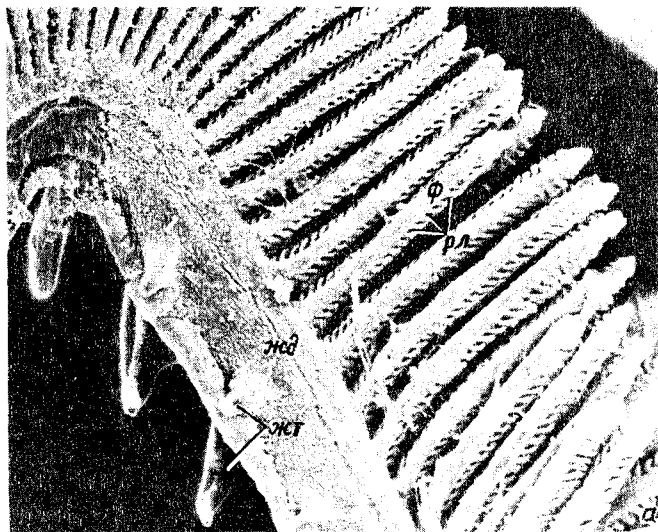


Рис. 1. Ультраструктура жаберной пластинки молоди семги (а) и жаберных тычинок омуля (б, в).

вп - вкусовая почка, жд - жаберная дуга, жт - жаберная тычинка, рл - респираторная ламелла, ф - филамент, ш - шип. а - х 75, б - х 200, в - х 450.

окрашивали цитратом селенца и просматривали в электронном микроскопе JEM-100 С.

Для изучения структуры поверхности жаберного эпителия участки жаберных лепестков после фиксации в растворах глутарового

Т а б л и ц а 2

Количество (I) и длина (II, мм) филламентов и респираторных ламелл в жабрах рыб

Вид рыб	n	Филламенты		Респираторные ламеллы	
		I	II	I	II
Карп	20	30.1±1.2	3.6±0.3	59.2±2.8	0.48±0.10
Карась	20	34.2±1.4	4.0±0.2	55.2±1.7	0.49±0.10
Окунь	20	48.9±1.3	4.9±0.2	80.3±4.3	0.68±0.04
Шука	7	54.3±2.2	5.2±0.4	85.7±3.1	0.73±0.10
Форель радужная	15	60.4±2.1	5.7±1.3	102.0±4.4	0.81±0.10
Семга	15	64.3±1.8	5.4±1.5	107.1±3.7	0.84±0.08

альдегида и четырехокси осмия и дегидратации проводили через критическую точку в сжиженном CO₂, напыляли золотом и просматривали в сканирующем электронном микроскопе JEM-25S.

Структура жабр

У всех костистых рыб жаберы имеют единый план строения. Это — парный орган. Каждая жабра образована 4 пластинками, состоящими в свою очередь из 2 полужабр. От выпуклой стороны жаберной дуги постеролатерально простираются 2 ряда первичных жаберных ламелл — филламентов, представляющих собой структурную единицу жаберной пластинки (рис. 1, а). От вогнутой поверхности жаберной дуги антеромедиально отходят 2 ряда жаберных тычинок. Они принимают участие в общем колебательном движении жаберных пластинок и служат частью так называемого цедильного аппарата, отфильтровывающего из воды планктон. На поверхности тычинок располагаются вторичные отростки — шипы, повышающие эффективность работы „цедильного” сита, а также хеморецепторные вкусовые почки (рис. 1, б, в). Количество филламентов на жаберной дуге варьирует в зависимости от экологии и видовой принадлежности рыб. Длина их также меняется в пределах жаберной дуги, достигая максимальных значений в центральном участке жаберной пластинки. Общее число жаберных филламентов и их средняя длина больше у активных рыб: окуневых, лососевых и др. (табл. 2).

От основания до вершины каждой первичной ламеллы (филламента) на одинаковом расстоянии под углом 40–50° отходят вторичные, или респираторные ламеллы (рис. 1, а). В центральном участке они длиннее, чем на вершине и в базальной части филламента. Так же, как и первичные, респираторные ламеллы более многочисленны и имеют большую длину у активных рыб (табл. 2). Это повышает

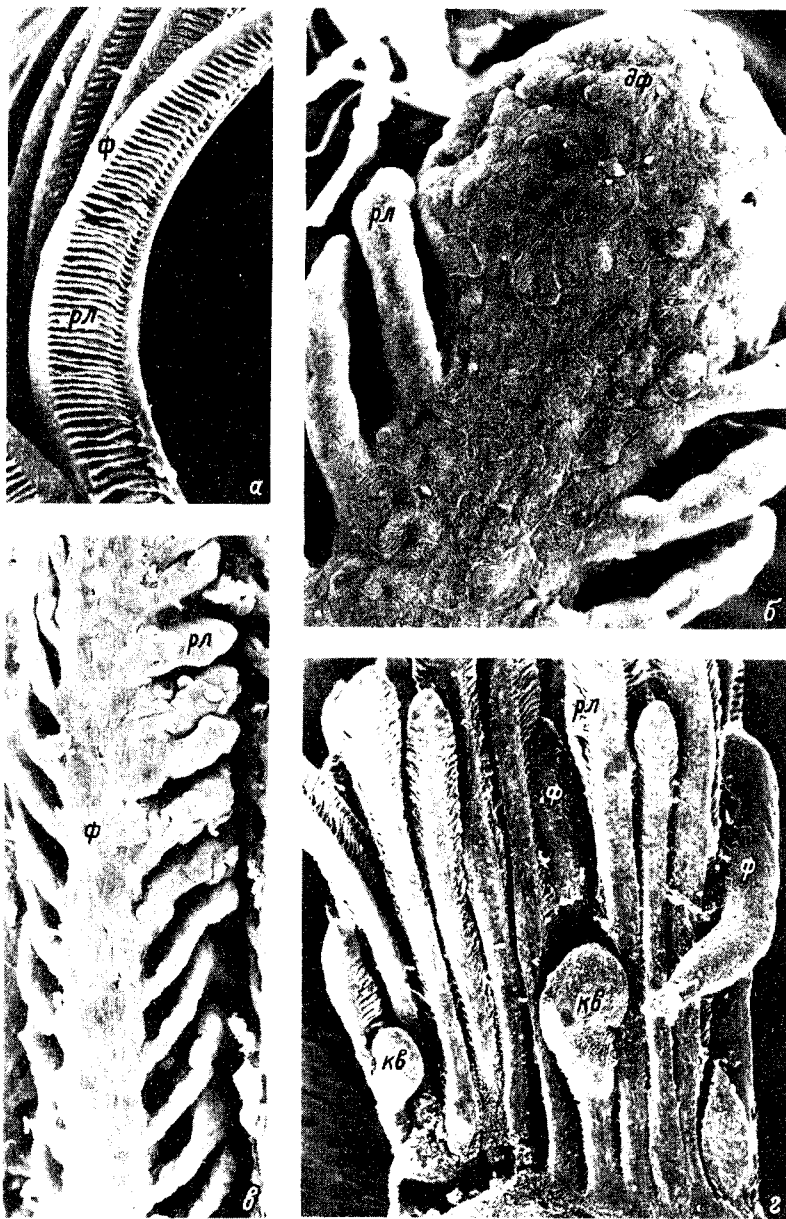


Рис. 2. Ультраструктура жаберных лепестков пресноводных рыб в норме (а) и при токсических воздействиях (б-г).

а - форель; б - форель, Аλ 0.05 мг/л, рН 5.6, 2 сут; в - угорь, фосдрин 0.1 мг/л, 1 сут; г - семга, Аλ 0.25 мг/л,

интенсивность газообмена, находящегося в прямой зависимости от площади и количества респираторных ламелл [10, 36, 37, 45]. В норме респираторные ламеллы параллельны друг другу и имеют правильную треугольную или трапециевидную форму (рис. 2, а). При действии же токсических веществ в сублетальных концентрациях [рН 4.5–5.5, полихлорпинен (ПХП) – 0.1 мг/л, фосдрин – 0.5 мг/л, сернистый аммоний – 0.5 ммоль/л, Al^3+ – 0.05–0.5 мг/л] отмечается значительное набухание и изменение формы ламелл и расширение дистальных участков жаберных филamentos (рис. 2, б). Подобные преобразования, способствующие увеличению дистанции „кровь–среда“ и тем самым ослабляющие прямое воздействие токсикантов, могут рассматриваться как морфофункциональная адаптация этого органа к изменению ионного состава среды. При действии низких значений рН (< 4), высоких концентраций в воде Al^3+ (≥ 0.5 мг/л) и ПХП (0.2–0.4 мг/л) у всех исследованных видов рыб отмечаются слияние и колбообразные вздутия респираторных ламелл, а также значительное расширение филamentos и слушивание поверхностных слоев специализированных респираторных и хлоридных клеток (рис. 2, в, г). Это ингибирует процессы дыхания и ионного транспорта и является одной из причин гибели рыб.

Эпителий филамента

Жаберные филamentos покрыты эпителием, состоящим из нескольких основных типов клеток: респираторных, хлоридных, слизистых, палочковых и недифференцированных. Эпителий жабр четко подразделяется на афферентную и эфферентную зоны. Различие между ними состоит в том, что поверхность последней выполнена только респираторными клетками, тогда как афферентная зона включает и другие типы клеток: хлоридные, слизистые и палочковые. Морфометрия жабр показала, что площадь афферентной зоны эпителия филамента в 2 раза больше, чем эфферентной [28]. Эпителий филамента анатомически и функционально связан с артериовенозной системой [23, 36, 37, 55].

Эпителий филамента многослойный и лежит на плотной базальной пластинке, отграничивающей его от кровеносной системы. Он состоит из нескольких базальных и промежуточных слоев недифференцированных, дифференцирующихся и молодых клеток и поверхностного слоя полностью сформированных клеток, контактирующих с внешней средой (рис. 3). Количество клеточных слоев, формирующих эпителиальную ткань, во многом зависит от экологии рыб. У активных видов эпителий тоньше (у окуня и форели соответственно 4 и 5, у

рН 5.6, 19 сут. дф – дистальный участок филамента, кв – колбообразное вздутие филамента. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. а – х100, б – х300, в – х200, г – х70.

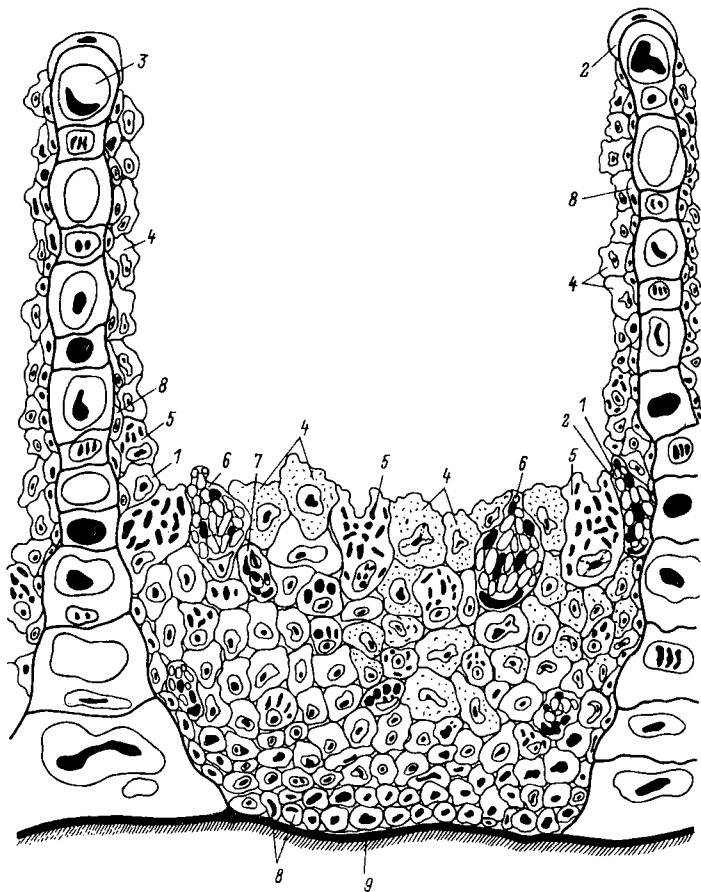


Рис. 3. Строение жаберного эпителия пресноводных костистых рыб.

1 - эпителий филамента; 2 - ламеллярный эпителий; 3 - капилляр. Клетки: 4 - респираторная, 5 - хлоридная, 6 - слизистая, 7 - палочковая, 8 - недифференцированная; 9 - базальная пластинка.

карповых - до 8, у сомовых - 7-9 слоев). Уменьшение высоты эпителия сокращает дистанцию „кровь-среда“ и делает возможным более интенсивный обмен между внутренней и внешней средой.

Реакция жаберного эпителия исследованных нами рыб на ряд токсических воздействий (см. табл. 1) на тканевом уровне неспецифична. Она состоит в увеличении числа хлоридных, слизистых и палочковых клеток, гипертрофии респираторных и активации созревания и деления недифференцированных элементов эпителия жабр.

Респираторные клетки (РК) - наиболее многочисленны элементы эпителия жаберных филламентов рыб. Они не только входят в состав эпителия жаберных лепестков, но покрывают и жаберную дугу, и

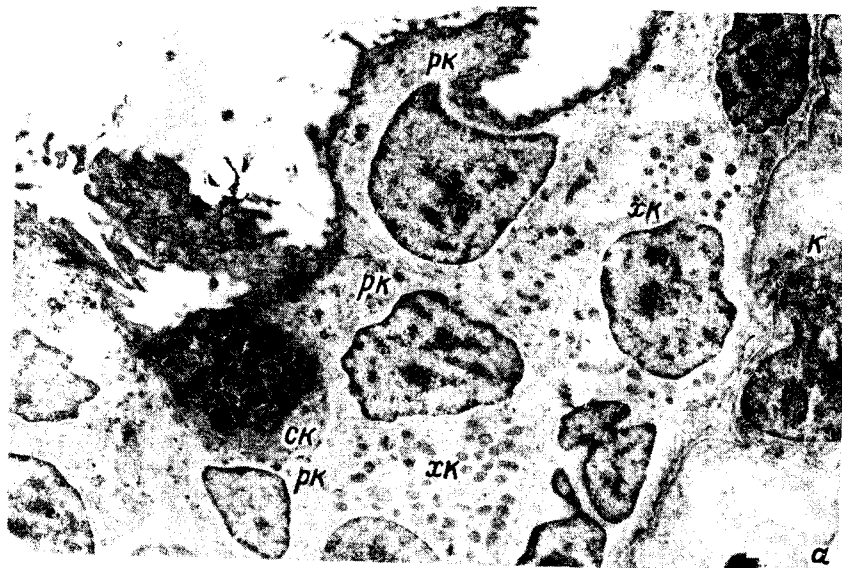
поверхность жаберных тычинок. В зависимости от видовой принадлежности и экологических особенностей рыб количество РК колеблется в среднем от 80 до 90 % от общего числа эпителиальных клеток. РК рассматриваются как морфологический базис для важнейшей функции жабр – газообмена. Обсуждается вопрос и о возможности их участия в процессе транспорта ионов [23].

Форма РК варьирует в зависимости от их локализации в эпителии филамента: в более глубоких его слоях они цилиндрические и кубические, на поверхности – удлиненные, листообразные (рис. 4, а). Диаметр РК обычно не превышает 10 мкм. Большая часть клеток занята центрально расположенным или слегка смещенным в базальную часть ядром; зона цитоплазмы узкая, насыщена рибосомами, содержит несколько плоских цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума и большое количество микропузырьков, окруженных унитарной мембраной (рис. 4, б). Немногочисленные митохондрии со светлым матриксом и пластинчатыми кристами не имеют определенной локализации в клетке. Характерная особенность РК – наличие в их цитоплазме хорошо развитых комплексов Гольджи, активно продуцирующих микропузырьки, что свидетельствует о высокой метаболической активности этих клеток. Апикальная зона цитоплазмы содержит пучки микрофиламентов, расположенные параллельно апикальной поверхности клетки, а также короткие микрофиламенты, образующие терминальную сеть. Это – элементы цитоскелета РК, функция которого состоит в обеспечении механической прочности апикальной цитоплазматической мембраны, имеющей сложную структуру поверхности.

Апикальная мембрана РК обладает рядом структурных особенностей, связанных с функцией этих клеток. Она представляет собой барьер, через который происходит диффузия O_2 и CO_2 в жабрах рыб. Интенсивность газообмена находится в прямой зависимости от площади поверхности жабр. Последняя многократно превышает общую площадь поверхности тела рыбы и коррелирует с рядом экологических параметров, важнейший из которых – двигательная активность рыб. Соотношение площади дыхательной поверхности жабр к массе тела у малоподвижных, умеренных и активных рыб составляет соответственно 2 : 1, 4 : 1 и 10 : 1 [60]. Такое увеличение протяженности границы между внешней и внутренней средами возможно лишь благодаря своеобразной организации структуры поверхности РК.

Сравнительный анализ строения поверхности РК эпителия филамента позволил установить особенности их ультратонкой организации в зависимости от семейства, к которому принадлежит исследуемый вид. Полученные данные подтверждают гипотезу о наличии корреляции между топографией поверхности жабр и образом жизни рыб [27].

В качестве типичных представителей малоактивных рыб, ведущих в основном придонный образ жизни, были рассмотрены некоторые виды семейства карповых и сомовых. У исследованных нами карповых рыб поверхность РК имеет общий план строения. Харак-



терный признак – четко выраженные клеточные границы, высота которых в 1,5 раза больше, чем высота микрогребней на поверхности этих клеток. Границы, представляющие собой „двойной гребень“, окружают клетки, имеющие гекса- или пентагональную форму (рис. 5, а). Рельеф поверхности РК эпителия филамента карповых имеет своеобразный рисунок и не зависит от локализации в эпителии (в афферентной или эфферентной зонах) самой клетки. Общая топография поверхности такова: узкие (0.15–0.2 мкм) микрогребни, длина которых варьирует от 3 до 8 мкм, слабо разветвлены, анастомозированы между собой и разделены плоскими и широкими (до 0.7–0.8 мкм) желобками, частично заполненными слизью (рис. 5, а). Микровилли на поверхности РК карповых отсутствуют. Некоторое своеобразие рельефа РК можно отметить у карася: очень короткие микрогребни располагаются в центральной части клетки, а по периферии – длинные неразветвленные, ориентированные параллельно клеточным границам.

У сома, двигательная активность которого ниже, чем у карпа, на поверхности РК расположено лишь несколько неразветвленных длинных микрогребней, образующих концентрические рельефы (рис. 5, б). Очевидно, увеличение площади наружной поверхности РК карповых и сомовых за счет несложного рельефа микрогребней относительно невелико.

Окуневые рыбы, как правило, – ярко выраженные оксифилы, ведущие подвижный образ жизни. Рельеф поверхности их РК более сложен, чем у малоактивных рыб. У окуня и судака РК не имеют четко выраженных границ, поскольку высота гребней, окружающих клетку, не отличается от таковой микрогребней. Последние имеют значительную длину (до 15 мкм), почти не разветвлены и формируют систему, напоминающую лабиринт (рис. 5, в). Широкие (0.3–0.4 мкм) микрогребни разделены очень узкими (0.15 мкм) желобками. Такая организация поверхности жабр способствует значительному приросту их общей площади.

Наиболее сложный рельеф поверхности РК присущ активным рыбам, способным преодолевать большие расстояния, – хищникам-засадчикам. У представителей трех различных семейств – лососевых, щуковых и угревых – при всем разнообразии деталей строения общая архитектура поверхности РК обладает определенным сходством. У всех исследованных рыб микрогребни чрезвычайно разветвлены, анастомозированы и практически непрерывны. Границы клеток отчетливо выявляются только у угря, микрогребни расположены

Рис. 4. Ультраструктура эпителия филамента форели (а) и респираторной клетки карпа (б).

глк – гликокаликс, гэр – гранулярный эндоплазматический ретикулум, к – капилляр, м – митохондрия, мкп – микропузырек, р – рибосомы, рк – респираторная клетка, ск – слизистая клетка, хк – хлоридная клетка, я – ядро. а – х 2600, б – х 10 000.

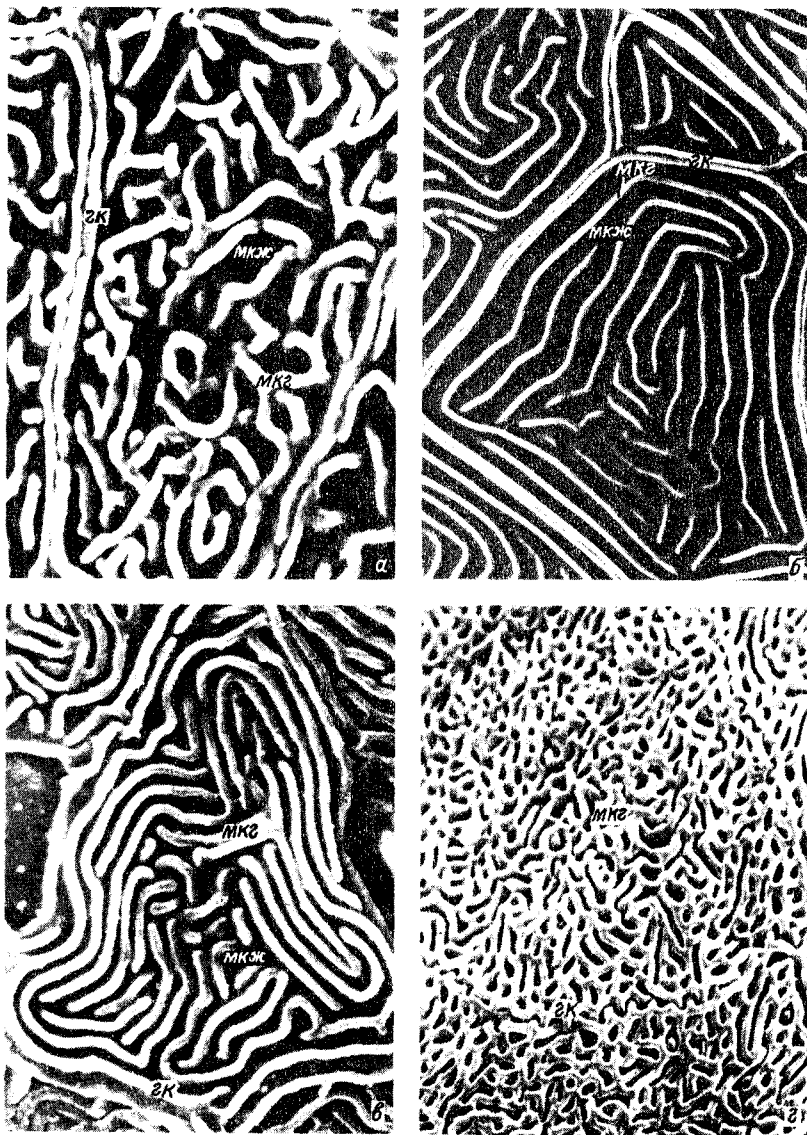


Рис. 5. Рельеф поверхности респираторных клеток у различных видов пресноводных рыб.

а - карп, б - сом, в - судак, г - угорь. гк - граница клетки, мкг - микрогребни, мкж - микрожелобки. а-г - х 7000.

перпендикулярно к гребню, окружающему клетку (рис. 5, г). Микрогребни рассмотренных видов рыб широкие (до 0,4–0,6 мкм), а разделяющие их желобки узкие и глубокие. Такая структура обеспечивает максимальное увеличение площади контакта между поверхностью жабр и водой и делает возможным осуществление интенсивных дыхательных процессов, присущих активным рыбам.

Наиболее важной функцией микрогребней следует считать увеличение поверхности РК и общей площади жабр. Образование на поверхности РК системы микрогребней, степень развития которой зависит от экологии и систематического положения рыб, может рассматриваться как морфологическая адаптация, за счет которой обеспечивается интенсивный газообмен через наружную плазматическую мембрану этих элементов эпителия жабр. Функция микрогребней РК состоит также в закреплении на поверхности жабр слизи, играющей определенную роль в процессах осморегуляции пресноводных костистых рыб [6, 24, 26, 27].

Принципы структурной организации РК свидетельствуют о том, что их основная функция – обмен дыхательных газов. Отсутствие специализированных клеточных структур, необходимых для активной сорбции ионов из внешней среды, и развитие на поверхности этих клеток системы микрогребней, увеличивающей интенсивность газообмена, еще раз подтверждают четкую функциональную специализацию этих элементов ткани жаберного эпителия. Знание деталей ультратонкого строения РК опровергает гипотезу о возможности локализации в них механизмов транспорта ионов против градиента концентрации между внутренней и внешней средой.

Изменения в РК жаберного эпителия исследованных нами видов рыб в условиях токсических воздействий носят неспецифический характер. При действии высоких концентраций H^+ , повышенном содержании в воде пестицидов (фосдрин и ПХП) отмечается прогрессирующее увеличение объемов этих клеток. Система микрогребней, образованная складками апикальной плазмалеммы, в данном случае играет роль резерва. При постепенном растяжении наружной цитомембраны в процессе клеточной гипертрофии укорачиваются и частично редуцируются микрогребни. Это позволяет клетке сохранить свою целостность даже при значительном увеличении объема.

Хлоридные клетки (ХК) жаберного эпителия – структурные единицы жабр как ионо-, так и осморегулирующего органа. Модель ионного обмена, предложенная Метцем [41], обобщила представления об активном транспорте ионов, в частности Na^+ и Cl^- , через эти клетки у пресноводных рыб. В последние годы появились данные о локализации в ХК механизмов сорбции Ca^{2+} , Mg^{2+} и K^+ [1, 2, 38, 49].

ХК составляют 4–7 % от общего числа клеток эпителия филламента. Они локализуются в поверхностном слое первичного эпителия, преимущественно в межламеллярных участках его афферентной зоны (см. рис. 3, 4, а). У пресноводных рыб количество ХК, заключенных между смежными респираторными ламеллами, не превышает 4–5. Форма клеток варьирует в зависимости от локализации

в эпителии филамента: от округлой – у молодых в глубине эпителиального пласта – до цилиндрической или кубической – у зрелых наружного слоя, непосредственно взаимодействующего с внешней средой.

В жабрах пресноводных рыб ХК одиночны и взаимодействуют с респираторными, слизистыми или палочковыми клетками (см. рис.3). ХК ацидофильные, крупные (до 12 мкм), с округлым ядром, обычно смещенным в базальную часть (рис. 6, а). Матрикс цитоплазмы насыщен рибосомами, в ее апикальной зоне локализуются многочисленные микрофиламенты и микротрубочки, представляющие собой элементы цитоскелета. К основным структурным характеристикам ХК как ионотранспортирующих единиц относятся полимеризация митохондрий, наличие 3 развитых мембранных внутриклеточных систем и асимметрия наружных цитоплазматических мембран.

Высокое содержание митохондрий в цитоплазме ХК отличает их от других типов клеток жаберного эпителия рыб. Общее число митохондрий превышает таковое в РК в 5–7 раз на единицу площади. Митохондрии локализуются во всех зонах клетки, за исключением узкого участка цитоплазмы, непосредственно прилегающего к апикальной клеточной мембране, и в области комплексов Гольджи (рис. 6, а). Эти органоиды имеют удлиненную палочковидную форму, размеры их у исследованных нами видов рыб различаются незначительно и варьируют от 2 до 2.5 мкм. Матрикс митохондрий осмируется достаточно интенсивно, у карповых в нем выявляются электронно-плотные гранулы [6].

Обилие митохондрий обеспечивает высокий энергетический уровень, необходимый для работы по переносу ионов против градиента концентрации, поскольку именно в них синтезируется АТФ – универсальный источник энергии. Это коррелирует с высокой активностью в клетках сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – одного из клеточных ферментов цикла Кребса, используемого как маркер митохондрий [33, 61]. Высокая активность СДГ выявлена в осморегуляторных органах рыб, обитающих как в пресной, так и в соленой воде [9, 12, 14, 35, 58]. Однако абсорбция ионов в жабрах пресноводных рыб осуществляется с меньшей скоростью, чем их экскреция у рыб, обитающих в средах с высокой соленостью, и энергия, затраченная на поглощение ионов, меньше, чем при их выведении из жабр рыб, обитающих в соленой воде [19, 30]. Это коррелирует с меньшим содержанием митохондрий и более низким уровнем активности СДГ в ХК жаберного эпителия пресноводных рыб по сравнению с морскими или эвригалинными, адаптированными к соленой воде.

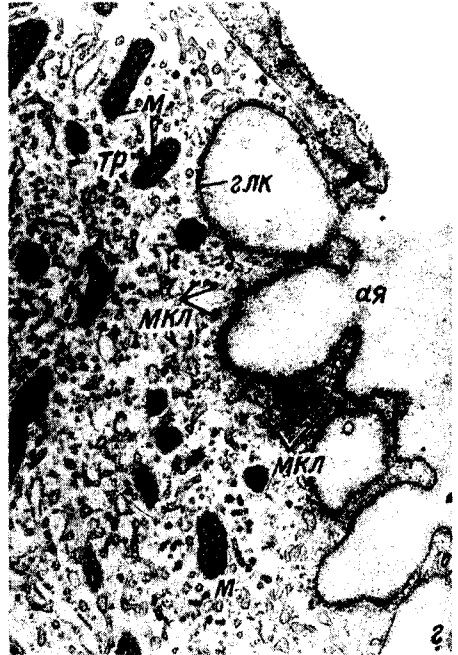
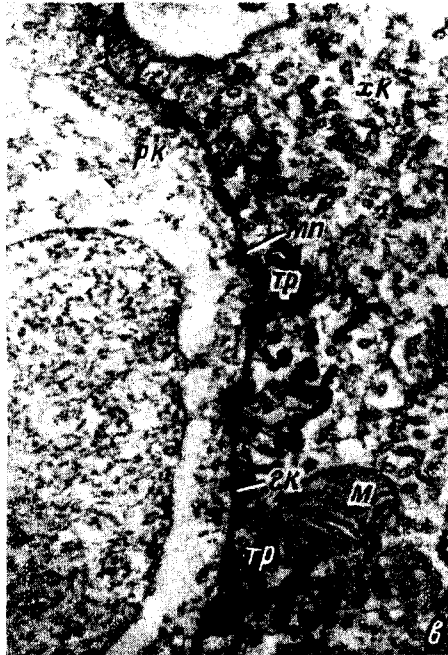
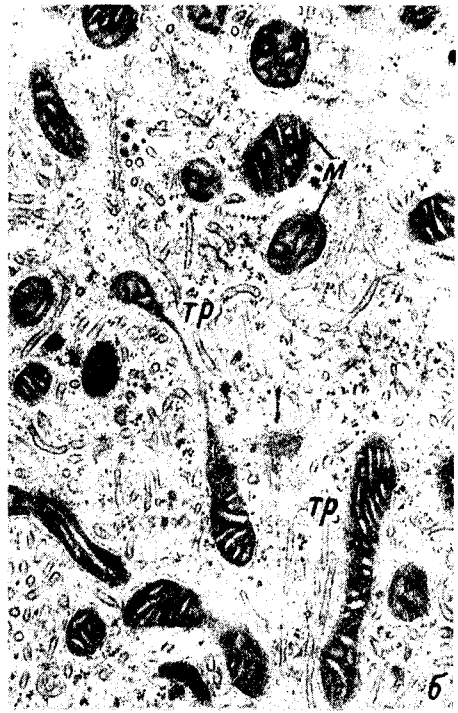
У пресноводных костистых рыб внутриклеточные мембранные системы включают 3 независимых компонента: тубулярный ретикулум, тубуловезикулярную систему и гранулярный эндоплазматический ретикулум. Тубулярный ретикулум представляет собой крупноячеистую сеть, образованную повторяющимися единицами – тубулами (рис. 6, б). При исследовании в трансмиссионном электронном микроскопе отчетливо выявляется прямой переход латеральных и ба-

зальной клеточных мембран в мембраны тубулярного ретикулума. Окрашивание ультратонких срезов жаберного эпителия окуня, карася, карпа и форели хлористым лантаном позволяет проследить быстрое (10–15 мин) заполнение тубул контрастирующим веществом, что возможно лишь в том случае, если их просветы представляют собой продолжение базолатеральных межклеточных пространств (рис. 6, в). Наличие в ХК такой системы обеспечивает многократное увеличение общей площади поверхности клеточных мембран и контакт с экстрацеллюлярной средой [30, 50, 51, 56].

Согласно цитологическим, цитохимическим и автордиографическим данным, на мембранах тубулярного ретикулума локализуется Na-K-ATP -азный комплекс, являющийся молекулярной основой натриевого насоса [30, 34, 50]. Благодаря деятельности ионных насосов в составе полианионного содержимого элементарных тубул концентрируются Na и Cl , что создает градиент концентрации в просвете трубочек тубулярного ретикулума [54]. У пресноводных и эвригалинных рыб, адаптированных к пресной воде, активность Na-K-ATP -азного транспортного комплекса относительно невелика [14, 20, 25]. Уровень жаберных АТФаз у пресноводных рыб в 2–5 раз ниже, чем у морских [34]. Это коррелирует с меньшей объемной плотностью тубулярной сети в ХК пресноводных рыб и соответственно с меньшим суммарным количеством сайтов Na-K-ATP -азы на мембранах ретикулума. В свете представлений о тубулярном ретикулуме как месте локализации ионных насосов важно отметить тесное взаимодействие его тубул с митохондриями (рис. 6, б, в). Вероятно, такие контакты позволяют облегчить перенос молекул АТФ, синтезированных в митохондриях, в ионные насосы тубулярного ретикулума, транспортирующие ионы против градиента концентрации.

Тубуловезикулярная мембранная система располагается в апикальной зоне ХК: между разветвленными трубочками тубулярного ретикулума и наружной цитоплазматической мембраной (рис. 6, б). Система образована многочисленными микропузырьками и отдельными сегментами. Наибольшего развития она достигает у представителей семейства лососевых. Тубуловезикулярная система рассматривается как коммуникационный канал между внутренней и внешней средой, обеспечивающий транспорт органических молекул и полисахаридных материалов и перемещение одновалентных ионов [16, 51, 53, 57]. Входящие в состав этой системы микропузырьки – морфологическая база транспорта полисахаридного материала, синтезирующегося в области комплексов Гольджи. Часть его концентрируется в апикальной ямке ХК (рис. 6, г). Это способствует повышению содержания в этой зоне ряда катионов, главным образом Na^+ [22]. Некоторое количество полисахаридного содержимого микропузырьков, вероятно, участвует в образовании нитей гликокаликса, покрывающего апикальную мембрану ХК [43].

Третья мембранная система – гранулярный эндоплазматический ретикулум – происходит от наружной ядерной мембраны и служит матрицей для пролиферации цистерн гранулярного ретикулума [46].



Для ХК характерна мембранная асимметрия, присущая всем ион-транспортующим клеткам. Их апикальная плазмалемма значительно утолщена из-за наличия тонкого слоя электронно-плотных гранул непосредственно под ней и присутствия на ее поверхности интегрального компонента этой мембраны – гликокаликса (рис. 6, г). У исследованных нами видов рыб гликокаликс наиболее развит у лососевых, наименее – у карповых рыб. С одной стороны, он участвует в регуляции проницаемости клеток для воды, с другой – выполняет роль ионного „сита“. Последнее способствует локальному повышению концентрации катионов на поверхности клеток и облегчает реализацию этими клетками ионтранспортующих функций [6, 30, 43].

ХК содержат апикальные ямки, образованные складками и инвагинациями наружной утолщенной плазмалеммы. Наибольших размеров и степени развития эти образования достигают у рыб, обитающих в значительно минерализованных водоемах [5, 6, 8]. Сложная организация апикальной ямки приводит к увеличению поверхности площади обмена между внутри- и внеклеточными средами, что может рассматриваться как доказательство активного транспорта ионов через апикальную мембрану клетки.

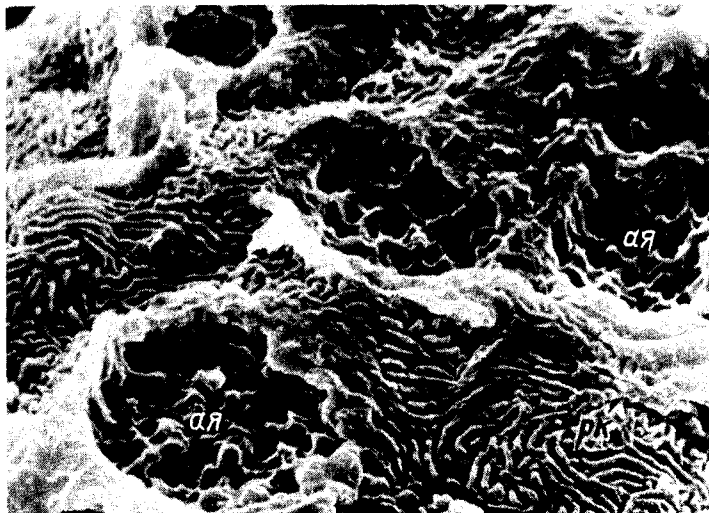
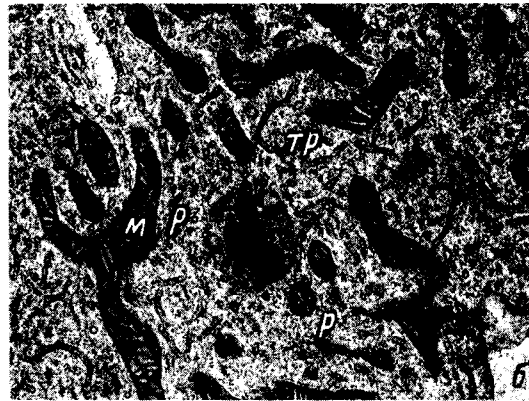
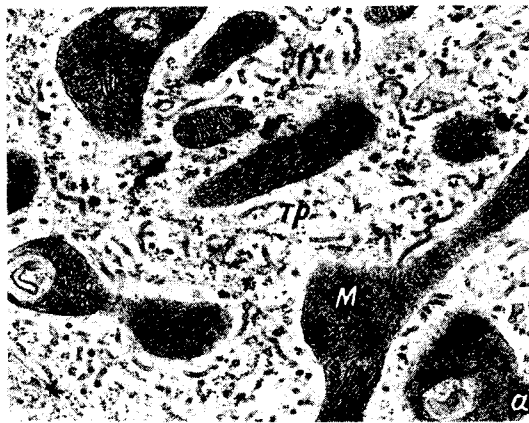
Ультраструктура ХК подтверждает их ионтранспортующую функцию. Эти клетки представляют собой типичные „функционально асимметричные клетки, являющиеся структурной основой любого осморегулирующего органа, в которых через апикальную мембрану идет постоянное поступление ионов, а через базолатеральные – непрерывное выведение их“ [11, с. 12].

ХК характеризуются высокой чувствительностью к действию токсических факторов среды. Так, при воздействии низких значений рН (3.8) на жабры караса первые изменения обнаруживаются при 5-минутной экспозиции только в ультратонкой организации ХК [9]. При этом деструктивным изменениям подвергаются клеточные органоиды, непосредственно связанные с транспортом ионов: митохондрии и тубулярный ретикулум. В дальнейшем эти преобразования распространяются на все большее число клеток, и это является одной из основных причин угнетения активного поглощения ионов, приводящего к гибели рыб [9].

При действии рН в толерантном диапазоне (4.5–5.5 – для карповых и 5.0–5.5 – для лососевых) преобразования ХК носят адаптивный характер. После первоначального (12–48 ч) нарушения структу-

Рис. 6. Ультраструктура хлоридных клеток пресноводных костистых рыб.

а – колюшка, общий вид клетки; б – форель, перинуклеарная зона цитоплазмы; в – окунь, проникновение лантана в просвет трубочек тубулярного ретикулума; г – колюшка, апикальная зона цитоплазмы, ая – апикальная ямка, мп – межклеточное пространство, тр – тубулярный ретикулум. Остальные обозначения те же, что и на рис. 4 и 5. а – х 8300, б – х 16 000, в, г – х 13 000.



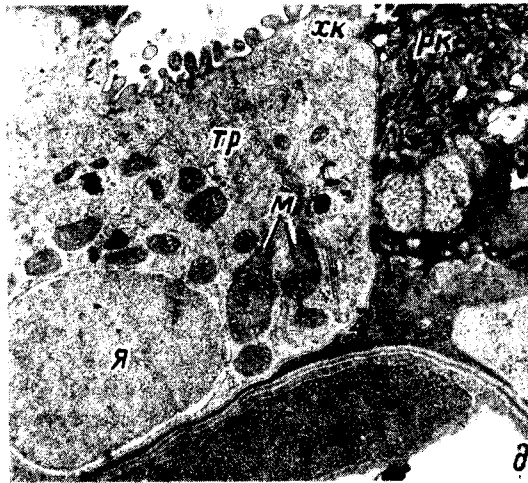
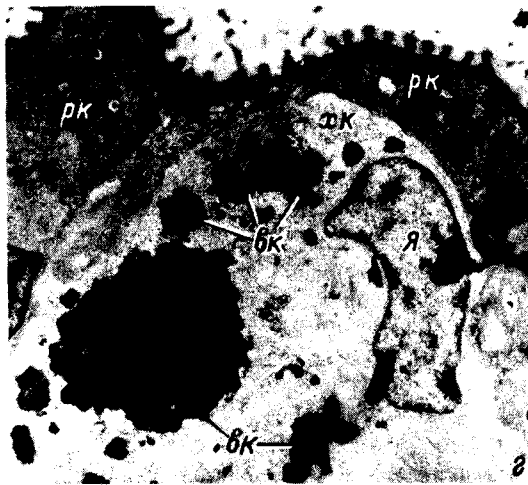


Рис. 7. Изменение ультраструктуры хлоридных клеток при токсических воздействиях.

а - семга, рН 5.0, 3 ч, нарушение структуры митохондрий и тубулярного ретикулума; б - карась, рН 4.5, пролиферация митохондрий и ретикулума; в - форель, рН 5.0, 7 сут; апикальные ямки хлоридных комплексов на поверхности эпителия филамента; г - семга, включения Al в цитоплазме клетки, концентрация Al 0.25 мг/л, рН 5.6, 19 сут; д - окунь, концентрация Al 0.25 мг/л, рН 5.5, 10 сут, отсутствие включений Al ; вк - включения. Остальные обозначения те же, что и на рис. 4 и 6. а - х 16 000, б - х 13 000, в - х 4500, г, д - х 2600.

ры митохондрий и тубулярного ретикулума (рис. 7, а) эти структуры восстанавливаются и развиваются дальше (рис. 7, б). Гипертрофированные ХК характеризуются увеличением числа митохондрий и чрезвычайным развитием тубулярной системы, изменением организации ядерного аппарата, связанным с возрастанием интенсивности синтетических процессов, направленных на осуществление репаративных процессов [6].

Важная адаптивная реакция – образование хлоридных комплексов, отмеченная нами через 5–7 сут у всех видов, подвергшихся воздействию кислой среды в толерантном диапазоне (рис. 7, в). Эти комплексы присутствуют и в эпителии жабр окуней, постоянно обитающих в слабоминерализованных кислых озерах [5]. Изменения в структуре и числе ХК носят достаточно общий характер и выявляются также при адаптации жаберного эпителия девятииглой колюшки к действию солей аммония, ингибирующих транспорт ионов [6]. Возникновение хлоридных комплексов – новых, функционально более мощных единиц – может способствовать поддержанию уровня поглощения ионов, достаточного для выживания в закисленной среде.

Добавление в закисленную до рН 5,0–5,5 воду алюминия в диапазоне концентраций 0,05–0,5 мг/л вызывает в ХК реакцию, прямо зависящую от величины концентрации металла, времени его действия и вида рыбы. Так, у лососевых (молодь семги и радужной форели) после 10-суточной экспозиции (рН 5, $Al - 0,25$ мг/л) мы обнаружили в матриксе цитоплазмы включения алюминия (рис. 7, г). Подобные результаты были получены и на ручьевой форели [29]. С другой стороны, у окуня, отличающегося высокой устойчивостью к действию этого комплексного фактора, отложения алюминия в ХК не наблюдались (рис. 7, д). Проследивалась лишь общая адаптивная реакция, состоящая в гиперплазии и гипертрофии ХК и пролиферации клеточных органоидов.

При действии хлорорганических (ПХП) и фосфорорганических (фосдри) соединений внутренняя структура ХК серьезно не изменяется. Реакция состоит лишь в резком увеличении их объема, в результате чего редуцируется апикальная ямка, в которой концентрируются катионы.

Таким образом, ХК могут рассматриваться как наиболее реактивный элемент системы эпителия жабр. Процессы адаптации к загрязнению среды в этих клетках осуществляются благодаря внутриклеточным перестройкам, направленным на поддержание их основной функции – активного транспорта ионов.

Слизистые клетки (СК) представляют собой железистый компонент системы жаберного эпителия рыб, выполняющий важную вспомогательную роль в осуществлении основных функций жабр: дыхания и осморегуляции. Число СК в жаберном эпителии зависит от видовой принадлежности и экологических особенностей рыб. Так, у бентофагов (лещ, плотва) и придонных рыб (сомовые, угревые) их количество достигает 12–15 % от общего числа эпителиальных клеток, тогда как у пелагических лососевых и у окуневых, преимущественно планктофагов, оно значительно ниже – 6–8 %.

СК располагаются в дистальных участках жаберных филламентов, в афферентной и в меньшем количестве в эфферентной зонах первичного эпителия. Они всегда одиночны и окружены респираторными клетками, однако в межламеллярной зоне эпителия филламента могут граничить и с хлоридными (см. рис. 3). СК – типичные одноклеточные железы. Их форма и размеры варьируют в зависимости от локализации в жаберном эпителии, функциональной активности и фазы секреторного цикла.

В эпителии жабр можно выделить СК, находящиеся на 3 фазах развития: молодые, в которых осуществляются начальные этапы секретобразования, клетки в стадии накопления секрета и зрелые клетки в фазе выведения секреторных продуктов. Молодые клетки располагаются в промежуточных слоях эпителия филламента на границе с малодифференцированными элементами. Клетки в фазе накопления секрета локализуются в более дистальных слоях, в отдельных случаях могут достигать поверхности эпителия, но не имеют непосредственного выхода на нее, так как прикрыты сверху тонкими отростками эпителиальных клеток (рис. 8, а).

Зрелые СК всегда располагаются на поверхности эпителия филламента. Для них на всех фазах развития характерно наличие органоидов, непосредственно связанных с процессами секретобразования – мощно развитой системы гранулярного эндоплазматического ретикула, многочисленных комплексов Гольджи (рис. 8, б). Первичные секреторные гранулы представляют собой вакуоли, отщепившиеся от расширенных участков диктиосом комплексов Гольджи. На их мембранах синтезируются и накапливаются мукополисахариды, составляющие основную часть слизистого содержимого специализированной клетки, а белки, входящие в состав секрета, синтезируются на рибосомах гранулярного эндоплазматического ретикула. Объединение белков и мукополисахаридов и сульфатирование последних происходят в крупных секреторных гранулах центральной части комплексов Гольджи [47]. Прогрессирующее возрастание общего числа гранул приводит к увеличению объема СК. Апоикальные части последних выходят на поверхность эпителия через так называемые секреторные поры (рис. 8, в). Гранулы секрета из зрелых СК выводятся по мерокриновому типу.

Роль СК и продуктов их секреции в осуществлении физиологических функций жаберного эпителия рыб многообразна. Слизь выполняет чисто механическую функцию субстрата, задерживающего инородные твердые частицы, взвешенные в омывающей жабры воде. Это особенно актуально для придонных рыб. Пленка слизи предохраняет наружные слои жаберного эпителия от механического слушивания и благодаря своим бактерицидным свойствам является первым барьером, препятствующим проникновению инфекции в организм рыб [26, 27, 43, 44].

В процессах осморегуляции СК играют вспомогательную роль, обусловленную физико-химическими свойствами продуцируемого ими содержимого. Слизь представляет собой полианионную субстанцию, основные компоненты которой – нейтральные и кислые мукополисахариды.

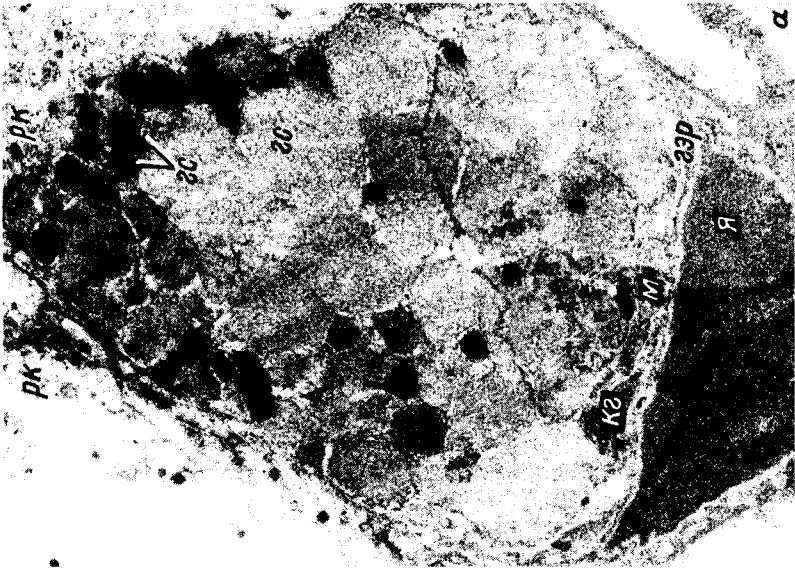
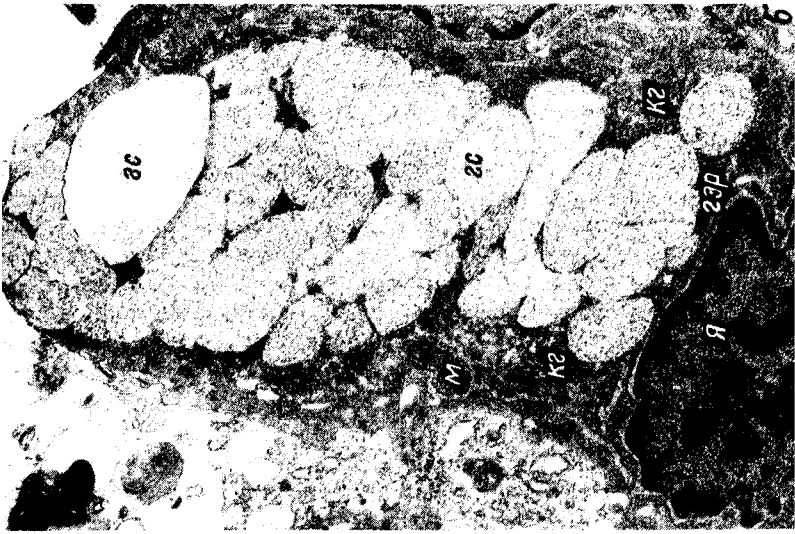




Рис. 8. Ультраструктура слюнных клеток в норме (а-в) и при токсических воздействиях (г,д). а - семга, молодая СК; б - карп, зрелая СК; в - семга, секреторная пора; г - семга, массовое выведение гранул секрета из слюнных клеток, рН 5; д - угорь, выведение гранул секрета, фосфатин 0,1 мг/л, гс - гранула секрета I, кГ - комплекс Гольджи, сп - секреторная пора. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 4 и 5. а-в - х 10 000, б - х 8300, г - х 1000, д - х 4500.

хариды [44, 63]. Последние представлены сиало- и сульфомуцинами, причем гликопротеины – производные сиаловой кислоты – преобладают [18, 63]. Благодаря этому слизистое покрытие жаберного эпителия приобретает отрицательный заряд, что способствует концентрации в этой зоне физиологически важных катионов Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} и K^+ [22, 43, 44]. В результате в зоне, непосредственно прилегающей к поверхности эпителия, образуется особая микросреда, что особенно актуально для пресноводных рыб, так как облегчает сорбцию катионов хлоридными клетками [22, 43]. Предполагают, что слизь наряду с содержанием микропузырьков ХК – морфологическая база для формирования нитей гликокаликса, включающих сиаловую кислоту. Это в свою очередь способствует сорбции катионов смежными ХК жаберного эпителия.

Гипертрофия, усиление функциональной активности и увеличение общего числа СК в эпителии филамента – обязательный компонент ответной реакции на токсические воздействия различной природы [42]. При закислении среды гиперплазия СК отмечается обычно через 48 ч, причем у лососевых количество этих клеток превышает контрольное в 4–6 раз [8]. Практически через все имеющиеся секреторные „поры“ на поверхности эпителия филамента выводятся крупные округлые шары секрета, часть которых представляет собой конгломерат из нескольких элементарных гранул слизи (рис. 8, г). Избыточное выведение слизи клетками эпителия филамента отмечается и при действии хлор- и фосфорорганических соединений (рис. 8, д).

Слизистое покрытие жабр принимает участие в защите органов от действия токсических веществ, вызывающих серьезные деструктивные изменения пограничных эпителиальных тканей [8, 29, 42]. При повышении кислотности внешней среды слизь, обладающая щелочными свойствами, вероятно, снижает концентрацию H^+ в зоне, непосредственно прилегающей к поверхности органа. Возможно, на поверхности пленки слизи конденсируются и вещества, загрязняющие среду, и это является одним из компонентов их детоксикации и ослабления прямого действия на клетки жаберного эпителия.

Повышенное содержание слизи на поверхности жабр из токсической среды – одна из причин снижения интенсивности дыхания. Чем толще слой слизи, тем меньше поверхность РК, взаимодействующая с водной средой, и интенсивность обмена дыхательных газов [27].

К числу дифференцированных элементов эпителия филамента жабр рыб относятся палочковые клетки (ПК). Они локализируются в межламеллярной зоне первичного эпителия и обладают четкой полярностью (см. рис. 3). В базальной части ПК располагаются ядро и хорошо развитая система гранулярного эндоплазматического ретикула, в апикальной – палочковые гранулы (рис. 9, а). В центре гранулы расположена электронно-плотная палочка, ее окружает периферическая аморфная субстанция, заполняющая так называемый палочковый мешочек (рис. 9, б). Клетка ограничена фибриллярным слоем, толщина и структура которого зависят от ее функционального состояния и стадии развития [7]. В жаберном эпителии времен-

но присутствуют незрелые, созревающие и полностью сформированные ПК [7]. Цикл их развития, прослеженный от начала дифференцировки до заключительной стадии – выведения содержимого клетки во внешнюю среду, типичен для клетки эпителия с секреторной функцией. Действительно, ПК сходны с СК эпителия жабр. В частности, гранулы у клеток обоих типов формируются в зоне комплекс Гольджи–гранулярный эндоплазматический ретикулум, сходен и сам процесс образования гранул [7]. Как СК, так и ПК способны мигрировать от слоя недифференцированных элементов к поверхности эпителия и секретировать палочковые гранулы во внешнюю среду.

Основная функция ПК сходна с таковой СК и в определенной мере дополняет ее. Содержимое периферической субстанции палочковых гранул включает нейтральный, а не кислый, как у СК, гликопротеин и небольшое количество сиаловой кислоты [44]. Оба эти вещества входят в состав пленки слизи, покрывающей поверхность жабр [43] и, вероятно, поступают туда после разрушения палочковых гранул. В результате соединения продуктов секреции СК и ПК может образоваться сложная полианионная субстанция, обладающая отрицательным зарядом, способствующим концентрации катионов в зоне между внутренней и внешней средой. Не исключено, что часть содержимого палочковых гранул используется как строительный материал для гликокаликса, также имеющего полианионную структуру и заряженного отрицательно.

Изменение ионного состава среды (снижение величины рН и жесткости воды, загрязнение ее солями аммония) вызывает увеличение количества и усиление функциональной активности ПК [7]. Это позволяет предположить наличие корреляции между состоянием популяции ПК и ионным составом среды и поддержать высказанную ранее гипотезу [39] о косвенном участии их в процессе осморегуляции. Таким образом, роль ПК в осуществлении основных процессов дыхания и осморегуляции, как и у СК, – вспомогательная и определяется количественным и качественным составом продуцируемого ими секрета.

Многослойный эпителий жаберного филамента рыб представляет собой непрерывно обновляющуюся систему [17, 40, 62]. Для компенсации постоянной утраты части клеток с поверхности эпителия необходимо пополнение клеточной популяции, обеспечивающееся за счет недифференцированных клеток базального слоя, располагающихся над плотной базальной пластинкой в непосредственной близости от центрального венозного синуса. Исследования систем клеточного обновления и дифференцировки компонентов ткани жабр показали, что эпителиальные клетки обновляются вдоль всего филамента [17, 62]. По аналогии с другими эпителиями подобного типа, в частности кожными, можно предположить, что многослойный эпителий жабр основан на клональном принципе организации, при котором в каждом клоне выделяется стволовая клетка и периодически обновляющиеся недифференцированные клетки [3]. Предполагают, что дифференцированные клетки жаберного эпителия происходят из разных зачатков [39, 40].

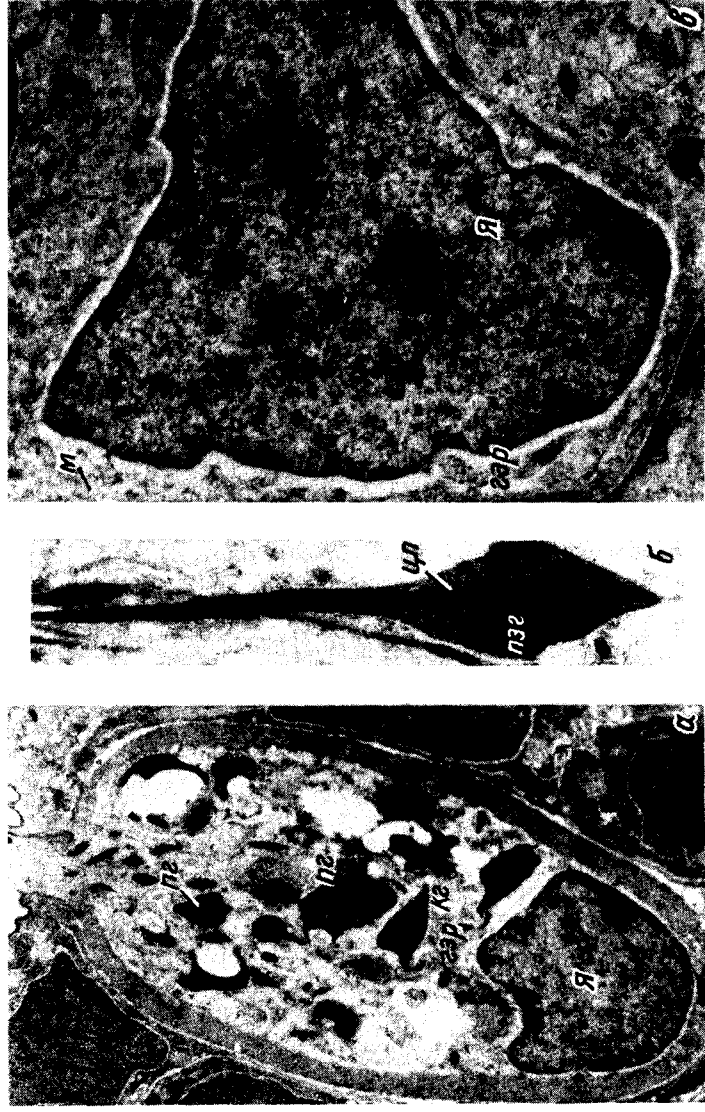
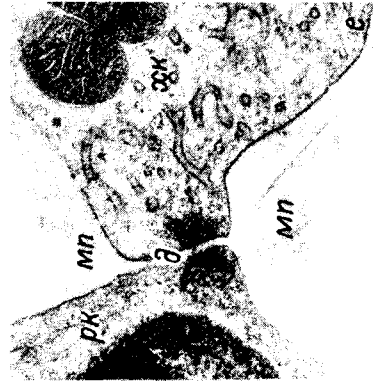
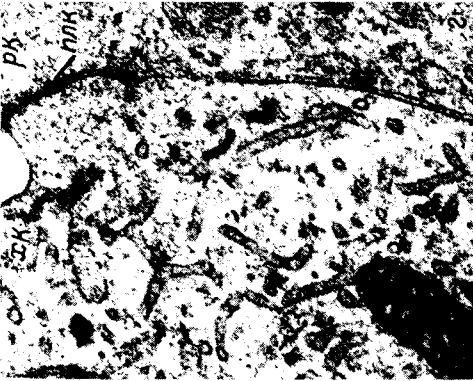


Рис. 9. Ультраструктура палочковых (а, б), недифференцированных клеток (в) и межклеточных соединений (г-ж).

а - окунь, общий вид палочковой клетки; б - окунь, палочковая гранула; в - лещ, недифференцированная клетка; г - карась, межклеточное соединение, норма; д - карась, расширение межклеточных пространств, ПХП 0.25 мг/л, 10.5 ч; е - форель, расширение межклеточных пространств, включающий многочисленные десмосомы, рН 5, 9 ч; ж - семга, соединительный комплекс, включающий палочковую гранулу, пзг - периферическая зона АТ 0.25 мг/л, рН 5.6, 19 сут. д - десмосома, лг - палочковая гранула, лж - центральная палочка. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2, 4, 6 и 8. а - $\times 50000$, б, в - $\times 8300$, г, д, ж - $\times 20\ 000$, е - $\times 26\ 000$.



Недифференцированные клетки, лежащие в основании многослойного эпителиального пласта, имеют общий тип строения. Они характеризуются относительно небольшими размерами (3–5 мкм в диаметре), центрально локализованным очень крупным ядром и узким слоем окружающей его цитоплазмы, насыщенной рибосомами. В цитоплазме выделяются отдельные плоские цистерны гранулярного ретикулула, немногочисленные митохондрии, в отдельных случаях – комплексы Гольджи (рис. 9, в). В процессе созревания общий объем недифференцированных клеток увеличивается, а в цитоплазме выделяются органоиды, характерные для определенных клеточных типов: в молодых ХК – отдельные короткие трубочки тубулярного ретикулула и митохондрии с электронно-плотным матриксом, в СК – первичные секреторные гранулы, в ПК – первичные палочковые гранулы, в РК – комплексы Гольджи и микропузырьки. Клетки на такой стадии зрелости обнаруживают обычно в промежуточных слоях эпителия филамента жабр. По мере созревания клеток цитоплазма их насыщается органоидами, размеры увеличиваются, они мигрируют по направлению к поверхности эпителия и в дистальной его части формируют слой, специализированный для выполнения основных функций: осморегуляции, дыхания, выделения слизистого содержимого.

Процессы клеточного обновления и дифференцировки активизируются при изменении ионного состава воды, в которой обитают рыбы. Так, стимуляция клеточного обновления отмечается сразу же после переноса рыб из пресной воды в соленую [48]. В этой ситуации, однако, отмечаются различия в реакции ХК и РК. Если число ХК у рыб, перемещенных из пресной воды в морскую, увеличивается в 3 раза, то количество РК не изменяется [17].

Усиленное обновление и дифференцировка клеток отмечались нами и при действии на рыб низких значений pH. Так, у окуня из закисленной среды (pH 5) число ХК, меченных ^3H -тимидином, при адаптации возрастало на 30 % по сравнению с контролем, тогда как в количестве РК в эпителии рыб не было достоверных различий. Повидимому, и в случае адаптации рыб к соленой воде [48], и в реакции на действие токсического кислотного фактора эпителии испытывает преимущественную потребность в специализированных ионотранспортирующих клетках, направленно переносящих ионы с гораздо большей интенсивностью, чем в обычной пресной воде. Это регулирует процентное содержание различных типов клеток в эпителии и характеризует эту ткань как систему, построенную по принципу динамического равновесия.

Гетерогенные клетки, образующие поверхностный слой жаберного эпителия, объединяются в единую систему с помощью системообразующих элементов – специализированных межклеточных соединений. У пресноводных костистых рыб они выполняют двоякую функцию: интеграции, обеспечивая прочную механическую связь между клетками, и изоляции, так как представляют собой барьер, отграничивающий внеклеточные пространства от внешней среды [21, 31, 32, 56, 57].

Характер межклеточных соединений в эпителии жабр пресноводных рыб зависит от ионного состава внешней среды. В „жесткой” воде, содержащей большое количество двухвалентных катионов, в частности Ca^{2+} , латеральные поверхности цитоплазматических мембран смежных клеток в апикальных зонах связаны между собой единственным специализированным соединением – плотным контактом. Ниже этого контакта идет обширная зона неспециализированных (простых) соединений (рис. 9, г). Плотные контакты, составляющие около 3 % от общей площади соединений между клетками, имеют глубину 0.5–0.7 мкм. Они представляют собой пятислойную структуру и состоят из 2 плотных внутренних слоев плазмалеммы смежных клеток и среднего слоя, образующегося в результате слияния наружных слоев плазматических мембран и отделенного от внутренних слоев электронно-прозрачными промежутками. В области плотного контакта выявляются тонкие филаменты. Предполагают, что они имеют актиновую природу и обеспечивают сохранность и регуляцию компонентов плотного контакта [13].

Исследования, выполненные с применением методики „замораживания и скальвания”, показали, что плотные контакты, располагающиеся в виде сплошного пояса в апикальных частях клеток жаберного эпителия, образованы 5–9 линиями слияния – связанными между собой гребнями [32, 56, 57]. Такая структура обеспечивает низкую проницаемость плотных контактов и определяет минимальную общую проницаемость эпителиального пласта для ионов и воды [21, 56].

Плотные контакты в жаберном эпителии пресноводных или адаптированных к пресной воде рыб имеют одинаковое строение независимо от того, какие типы клеток они соединяют: смежные респираторные или хлоридные и респираторные [32, 56]. За счет этого создается барьер для диффузии солей через межклеточные пространства. Наличие контактных структур, обладающих такими свойствами, прямо связано с осморегуляторной функцией жабр пресноводных рыб, основанной не только на поддержании активного трансцеллюлярного транспорта ионов, но и на предотвращении их пассивной потери через межклеточники парацеллюлярным путем.

При острых токсических воздействиях (снижение pH до 3.8, присутствие в воде ПХП в концентрациях 0.1–0.25 мг/л) и на ранних этапах адаптивных реакций к действию токсикантов в нижних пределах толерантного диапазона структура межклеточных соединений нарушается [1, 8, 9]. Изменения происходят в зоне неспециализированных соединений, межклеточные пространства значительно расширяются, расхождение клеток наблюдается и в области специализированных контактов – десмосом (рис. 9, д, е). В отдельных случаях может происходить деструкция наиболее прочного плотного соединения. В условиях острого токсического воздействия это приводит к сдвиганию поверхностных слоев клеток и дезагрегации ткани жабр. Это в свою очередь – одна из причин массовой утечки ионов из жаберного эпителия, обессоливания и гибели рыб.

Под действием токсикантов в толерантном диапазоне концентраций в эпителии жабр развиваются компенсаторные реакции. Мы предполагаем, что возникающий в результате токсических воздействий первоначальный дефицит ионов в жабрах вызывает мобилизацию эндогенного кальция, способствующего восстановлению свойств наружных клеточных мембран. Более того, структура межклеточных соединений у таких рыб значительно усложняется, и клетки эпителия взаимодействуют друг с другом с помощью соединительных комплексов, последовательно включающих плотное промежуточное соединение и одну или несколько десмосом (рис. 9, ж). Так как основная функция промежуточного соединения и десмосом состоит в обеспечении межклеточной адгезии и целостности органов [13], появление их в составе соединительного комплекса способствует более прочному и гибкому сцеплению клеток и предотвращает дезагрегацию тканей эпителия жабр, а также уменьшает проницаемость его для ионов в условиях изменения ионного состава внешней среды.

Ламеллярный эпителий

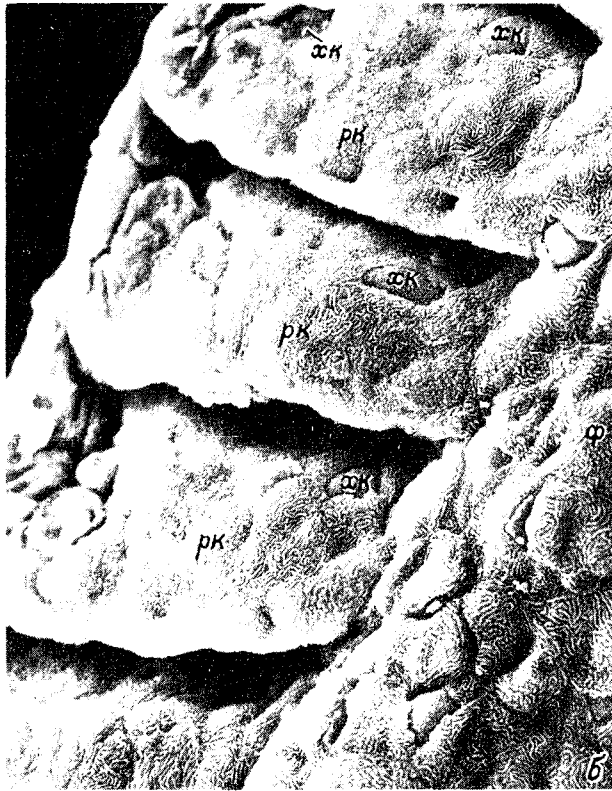
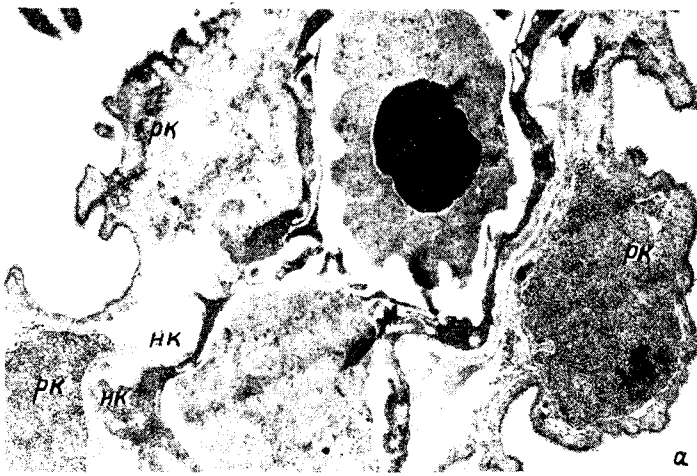
Вторичная ламелла представляет собой функциональную единицу, через которую происходит основной обмен газов в жабрах рыб [28, 36, 37]. Участие ламеллярного эпителия в осуществлении дыхательных функций жабр подтверждается его структурными характеристиками.

Респираторный эпителий, покрывающий вторичную ламеллу, связан с артерио-артериальной кровеносной системой [28, 36, 55] и образован двумя слоями клеток: внутренним (серозным) и наружным (мукозным) (см. рис. 3 и 10, а). Эпителиальные слои разделены внеклеточными (лимфоидными) пространствами, которые у пресноводных рыб весьма незначительны. Внеклеточные пространства ламеллярного эпителия сообщаются с соответствующими внеклеточными пространствами эпителия филамента и вследствие этого с центральным венозным синусом, что играет определенную роль в трансжаберном движении жидкостей [36]. Расширение лимфоидных пространств – компонент общей реакции на действие токсических факторов внешней среды [42, 59]. Оно приводит к набуханию ламеллярного эпителия, увеличению расстояния между внешней средой и кровью и затрудняет газообмен, осуществляемый вторичными респираторными ламеллами.

Структура и ультраструктура организация ламеллярного эпителия однотипна у различных видов рыб. Внутренний серозный слой ламеллярного эпителия непосредственно прилегает к плотной базальной пластинке и состоит из недифференцированных клеток. По свое-

Рис. 10. Ультраструктура респираторных ламелл в норме (а) и при кислотном воздействии (б).

а – окунь, центральный участок ламеллы; б – форель, рН 5, 5 сут.
нк – недифференцированная клетка. Остальные обозначения те же, что и на рис. 4. а – х5000, б – х1000.



му строению они аналогичны соответствующим клеткам эпителия филамента и характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением и электронно-плотной цитоплазмой, насыщенной рибосомами. В некоторых клетках выявляются цистерны гранулярного ретикулума и комплексы Гольджи, что свидетельствует о том, что они находятся на стадии дифференцировки. Дифференцирующиеся в глубоком слое клетки служат для восстановления более поверхностно расположенных РК, а также, возможно, и ХК [8, 17, 37].

Наружный слой ламеллярного эпителия образован преимущественно РК. Лишь в нижней трети респираторной ламеллы внутренний клеточный слой включает и отдельные ХК (см. рис. 3). Ультраструктура их не отличается от таковой у клеток из первичного эпителия, но ХК из вторичных ламелл, за исключением локализованных в месте отхождения ламеллы от филамента, покрыты сверху РК или их отростками и не имеют непосредственного выхода на поверхности эпителия. Благодаря этому при исследовании вторичных жаберных ламелл в сканирующем электронном микроскопе обнаруживается поверхность, выполненная РК. Ультратонкая организация РК ламеллярного эпителия такая же, как у клеток филамента. Различия в рельефе поверхности РК у рыб, относящихся к различным систематическим группам и неодинаковых по своей экологии, вполне определены и коррелируют с таковыми, отмеченными для аналогичных клеток эпителия филамента.

Наименее сложна топография поверхности РК у карповых и сомовых. Отмечается четкая закономерность для всех видов рыб: структура поверхности РК ламеллярного эпителия значительно сглажена по сравнению с таковой эпителия филамента. Микрогребни ламеллярных РК всегда более короткие и плоские, чем в клетке эпителия филамента, шире и разделяющие их желобки. По-видимому, это связано с особенностями функционирования эпителия ламелл и филаментов. Основной газообмен идет через ламеллярный эпителий, и более гладкая поверхность выполняющих его клеток препятствует концентрации на нем слизи, которая могла бы затруднить этот процесс.

Снижение рН и жесткости воды, загрязнение солями аммония и алюминием, ПХП и фосфорином вызывают значительные изменения объема и клеточного состава респираторного эпителия. Его набухание – следствие расширения лимфоидных пространств и увеличения размеров РК. Рельеф поверхности клеток сглаживается, число микрогребней значительно сокращается из-за растяжения наружной цитоплазматической мембраны, а мелкие и широкие микрожелобки переполняются слизью. В составе ламеллярного эпителия появляются многочисленные ХК, по-видимому, мигрирующие из эпителия филамента (рис. 10, б). Это можно рассматривать как важный компонент адаптивной реакции на токсические воздействия, ингибирующие активный транспорт ионов. Включение большого количества ХК в состав респираторного эпителия наряду с увеличением общего числа этих элементов в эпителии филамента способствует поддержанию уровня поглощения ионов, достаточного для выживания рыб в токсической среде.

Таким образом, исследование жабр большой группы пресноводных костистых рыб показало, что жаберный эпителий имеет общий план строения. В нем выделяется эпителий филамента, имеющий сложную структуру и обладающий осморегуляторными функциями, и ламеллярный эпителий, в котором происходит основной газообмен. Жаберный эпителий организован по принципу системы, составные элементы которой взаимосвязаны и образуют целостное единство. Базальные зоны обоих отделов эпителия у всех исследованных рыб представляют собой резервный слой, благодаря деятельности которого пополняются основные типы дифференцированных клеток: респираторных, хлоридных, слизистых и палочковых. Функциональная роль каждого типа клеток четко определена. РК – морфологическая база для газообмена, через ХК происходит активный транспорт ионов, СК и ПК продуцируют секрет, предохраняющий эпителий жабр от повреждений и принимающий косвенное участие в процессах дыхания и осморегуляции. Клетки как гетерогенные функциональные и структурные единицы ткани объединены в систему системообразующими элементами – межклеточными соединениями. Они не только выполняют интегративные функции, но и играют изолирующую роль, препятствуя пассивной потере ионов через эпителий жабр, что является необходимым условием существования пресноводных рыб.

Количественный состав и ультратонкая организация клеток, формирующих жаберный эпителий, во многом зависят от экологии рыб. Характер поверхностного рельефа РК определяется условиями жизни рыб, их пищевой и двигательной активностью. Ультратонкая организация элементов ХК коррелирует с видовыми и экологическими особенностями рыб. Степень развития и функциональная активность СК и ПК также определяются рядом экологических особенностей, основными из которых следует считать способ добывания пищи и среду обитания рыб.

Сравнительный морфофункциональный анализ жаберного эпителия пресноводных рыб показывает, что эта высокоспециализированная ткань является базой для осуществления ряда жизненно важных функций, прежде всего дыхания и осморегуляции. Функциональные возможности ее велики. В условиях изменения ионного состава среды и действия токсических веществ в эпителии жабр развиваются адаптивные реакции, препятствующие гибели рыб. Четко прослеживается системность ответов. На тканевом уровне – это усиление дифференцировки и созревания недифференцированных элементов, дающих начало основным типам специализированных клеток, и последующее увеличение числа ионтранспортирующих хлоридных клеток и железистых слизистых и палочковых, предохраняющих жабры от прямого воздействия токсикантов и косвенно участвующих в процессах газо- и ионообмена. Это более позднее образование новых функциональных единиц – хлоридных комплексов, объединяющих молодые и зрелые клетки, и поддержание на определенном уровне популяции РК, слушающихся с поверхности эпителия. На клеточном уровне –

это развитие органоидов, непосредственно связанных с транспортом ионов в ХК, вариабельность рельефа РК, вызванная увеличением их объема, и усиление функциональной активности СК и ПК. Эта многокомпонентная реакция способствует поддержанию достаточно высокого уровня активного транспорта ионов в жаберном эпителии рыб из токсической среды.

Снижение проницаемости эпителия жабр для ионов и поддержание целостности эпителиальной ткани осуществляется на уровне системобразующих межклеточных соединений. Это общая адаптивная реакция. Она препятствует массовой утечке солей из эпителия жабр, вызванной действием токсических веществ. Сочетание процессов, обеспечивающих, с одной стороны, активный транспорт ионов из окружающей среды, а с другой – ограничивающих их пассивную утечку из эпителия жабр, – один из основных механизмов, лежащих в основе выживания рыб в токсической среде.

Л и т е р а т у р а

1. В и н о г р а д о в Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. Экологические и эволюционные аспекты : Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Л., 1987.
2. В и н о г р а д о в Г.А., К о м о в В.Т. Особенности ионной регуляции окуня *Perca fluviatilis* L. в связи с проблемой закисления водоемов // Вопр. ихтиологии, 1985. Т. 25, вып. 1.
3. З а в а р з и н А.А. Основы частной цитологии и сравнительной гистологии многоклеточных животных. Л., 1976.
4. К р а ю ш к и н а Л.С. Хлоридсекретирующие клетки рыб // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1974. Т. 67, вып. 11.
5. М а т е й В.Е. Сравнительный анализ ультраструктуры жаберного эпителия окуня из водоемов с различным ионным составом // Цитология, 1984. Т. 26, № 7.
6. М а т е й В.Е. Хлоридные клетки – структурная основа ионообменных процессов в жабрах костистых рыб // Цитология, 1986. Т. 28, № 1.
7. М а т е й В.Е. Ультраструктура палочковых клеток на разных стадиях развития из жаберного эпителия костистых рыб // Цитология, 1986. Т. 28, № 7.
8. М а т е й В.Е. Ультраструктура жаберного эпителия ручьевой форели в норме и при закислении воды // Цитология, 1987. Т. 29, № 10.
9. М а т е й В.Е., К о м о в В.Т. Реакция хлоридных клеток жаберного эпителия на изменение кислотности и ионного состава среды // Реакция гидробионтов на загрязнение. М., 1983.

10. Молдавская Т.В. Гистоструктура жабр костистых рыб // Токсикогенетические и экологические аспекты загрязнения окружающей среды. Иркутск, 1982.
11. Наточин Ю.В. Проблемы эволюционной физиологии водно-солевого обмена. Л., 1984.
12. Наточин Ю.В., Крестинская Т.В. Сукцинатдегидрогеназа и активный транспорт натрия в осморегулирующих органах позвоночных животных // Физиол. журн. 1961. Т. 47, № 10.
13. Снигиревская Е.С., Комиссарчик Я.Ю. Ультраструктура специализированных межклеточных контактов // Цитология. 1980. Т. 22, № 9.
14. Турстон Р.В., Виноградов Г.А., Комов В.Т., Матей В.Е. Влияние низких значений рН, солей аммония и обессоливания на активность ферментов, обмен Na^+ в жабрах и ультраструктуру хлоридных клеток у пресноводных рыб. Сообщение 1 // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1979, № 43.
15. Ber ridge M.J., Os hman J.I. Transporting epithelia. New York; London, 1972.
16. Brad ley T. Improved visualization of apical vesicles in chloride cells of fish using an osmium quick-fix technique // J. Exp. Zool. 1981. Vol. 217, N 2.
17. Chretien M., Fisam M. Cell renewal and differentiation in the gill epithelium of fresh- or salt-water-adapted euryhaline fish as revealed by ^3H -thymidine radioautography // Biol. Cell. 1986. Vol. 56, N 2.
18. Eddy F.B., Fraser J.E. Sialic acid and mucus production in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) in response to zinc and seawater // Comp. Biochem. Physiol. C. 1982. Vol. 73, N 2.
19. Epstein F.H., Silva P., Forrest J.N., Solomon R.I. Chloride transport and its inhibition by thiocyanate in gills of seawater teleosts // Comp. Biochem. Physiol. A. 1975. Vol. 52, N 4.
20. Epstein F.H., Silva P., Kormanik G. Rate of Na-K-ATPase in chloride cell function // Amer. J. Physiol. 1980. Vol. 238, N 3.
21. Ernst S.A., Dodson W.C., Karnaky K.J. Structural diversity of occluding junctions in the low-resistance chloride-secreting opercular epithelium of seawater-adapted killifish (*Rundulus heteroclitus*) // J. Cell. Biol. 1980. Vol. 87, N 2.
22. Flik G., van Rij s J.H., Wendel laar Bonda S.E. Evidence for high affinity Ca^{2+} -ATPase activity and ATP-driven Ca^{2+} -trans-

- port in membrane preparations of the gill epithelium of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus* // J. Exp. Biol. 1985, Vol. 119.
23. G i r a r d I.P., P a y a n P. Ion exchanges through respiratory and chloride cells in freshwater - and seawater - adapted teleostean // Amer. J. Physiol. 1980. Vol. 238, N 3.
 24. H o s s l e r F.E. Gill arch of mullet, *Mugil cephalus*. III Rate of response to salinity change // Amer. J. Physiol. 1980. Vol. 238, N 3.
 25. H o u s t o n A.H., M e a r o w K.M. Branchial and renal (Na/K)-ATPase and carbonicanhydrase activities in a eurythermal freshwater teleost, *Carasius auratus* // Comp. Biochem. Physiol. A. 1982. Vol. 71, N 2.
 26. H u g h e s G.M. Scanning electron microscopy of the respiratory surfaces of trout gills // J. Zool. (London). 1979. Vol. 187.
 27. H u g h e s G.M. General anatomy of the gills // Fish. Physiol. 1984. Vol. 10, N 2.
 28. K a r l s o n L. Gill morphology in the zebrafish, *Brachydanio rerio* // J. Fish Biol. 1983. Vol.23.
 29. K a r l s o n-N o r r g r e n L., D i c k s o n W., L j u n g b e r g O., R u n n P. Acid water and aluminium exposure: gill lesions and aluminium accumulation in farmed brown trout, *Salmo trutta* L. // J. Fish Diseases. 1986. Vol. 9.
 30. K a r n a k y K.J., E r n s t S.A., P h i l p o t t C.W. Teleost chloride cell. 1. Response of pupfish *Cyprinodon variegatus* gill Na-K-ATPase and chloride cell fine structure to various high salinity environments // J. Cell. Biol. 1976. Vol. 70.
 31. K a r n a k y K.J., F u l k e r s o n J.E., G a r r e t s o n L.T. Teleost chloride and exhibit shallow or deep tight junctions // J. Cell Biol. 1985. Vol. 101, N 5.
 32. K a w a h a r a T., S a s a k i T., H i g a s h i S. Intercellular junctions in chloride and pavement cells of *Oplegnethus fasciatus* // J. Electron. Microsc. 1982. Vol. 31.
 33. K e r s t e t t e r T.H., K i r s c h n e r L.B. Active chloride transport by the gills of rainbow trout // J. Exp. Biol. 1972. Vol. 56.
 34. K i r s c h n e r L.B. Comparison of vertebrate salt excreting organs // Amer. J. Physiol. 1980. Vol. 238, N 3.
 35. L a n g d o n J.S., T h o r p e J.E. Response of the gill Na⁺-K⁺-ATPase activity, succinic dehydro-

- genase activity and chloride cell to saltwater adaptation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr and smolt // *J. Fish. Biol.* 1984. Vol. 24, N 3.
36. L a u r e n t P. Gill internal morphology // *Fish Physiol.* 1984. Vol. 10, pt.2.
 37. L a u r e n t P., D u n e l S. Morphology of gill epithelia in fish // *Amer. J. Physiol.* 1980. Vol. 238, N 3.
 38. L a u r e n t P., H ô b e H., D u n e l-E r b S. The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish // *Cell Tissue Res.* 1985. Vol. 240, N 3.
 39. L e i n o R.L. Rodlet cells in the gill and intestine of *Catostomus commersoni* and *Perca flavescens*: a comparison of their light and electron microscopic cytochemistry with that of mucous and granular cells // *Can. J. Zool.* 1982. Vol. 60, N 11.
 40. M a c K i n n o n M., E n e s c o H.E. Cell renewal in the gills of the fish *Barbus conchonus* // *Can. J. Zool.* 1980. Vol. 58, N 4.
 41. M a e t z J. Fish gills: mechanisms of salt transfer in freshwater and seawater // *Phil. Trans. Roy. Soc. London A.* 1971. Vol. 262.
 42. M a l l a t J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review // *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1985. Vol. 42, N 4.
 43. M a r s h a l l W.S. On the involvement of mucous secretion in teleost osmoregulation // *Can. J. Zool.* 1978. Vol. 56, N 5.
 44. M a t t e y D.L., M o r g a n M., W r i g h t D.E. Distribution and development of rodlet cells in the gills and pseudobranch of the bass, *Dicentrarchus labrax* (L) // *J. Fish Biol.* 1979. Vol. 15, N 3.
 45. M o r g a n M., T o v e l l P.W. The structure of the gill of the trout, *Salmo gairdneri* R. // *Ztschr. Zellforsch.* 1973. Bd 142, N 2.
 46. M o r r e D.F., K a r t e n b e c k F., F r a n k e W.W. Membrane flow and interconversions among endomembranes // *Biochem. Biophys. acta.* 1979. Vol. 559.
 47. N e u t r a M., L e b l o n d C.P. Synthesis of the carbohydrate of mucus in the Golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose - ^3H // *J. Cell. Biol.* 1966. Vol. 30.
 48. O l i v e r e a u M. Reaction cellulose a chlorures de la branchie apres passage an eau de mer chez l'anquille europeenne // *C.r. séances Soc. biol.* 1970. Vol. 164.

49. P e r r y S.F., W o o d C.M. Kinetics of bran-
chial calcium uptake in the rainbow trout: effects
of acclimation to various external calcium levels //
J. Exp. Biol. 1985. Vol. 116.
50. P h i l p o t t C.W. Tubular system membranes of
teleost chloride cells: osmotic response and trans-
port sites // Amer. J. Physiol. 1980. Vol. 238. N 3.
51. P i s a m M. Membranous system in „chloride cell“
of teleostean fish gill: their modifications in respon-
se to the salinity of the environment // Anat. Rec.
1981. Vol. 200, N 4.
52. P i s a m M., C h r e t i e n M., R a m b o -
u r g A., C l e r m o n t Y. Two anatomical pat-
hways for the renewal of surface glycoproteins in
chloride cells of fish gills // Anat. Rec. 1983,
Vol. 207, N 3.
53. P i s a m M., S a r d e t C., M a e t z J. Po-
lysaccharidic material in chloride cell of teleostean
gill: modifications according to salinity // Amer. J.
Physiol. 1980. Vol. 238, N 3.
54. P o t t s W.T.W. Fish gills // Transport of ions
and water in epithelia. 1977. N 4.
55. R a n d a l l D.J. The circulatory system // Fish
Physiology. New York, 1979. Vol. 4.
56. S a r d e t C. Freeze fracture of the gill epithelium
of euryhaline teleost fish // Amer. J. Physiol. 1980.
Vol. 238, N 3.
57. S a r d e t C., P i s a m M., M a e t z J. The
surface epithelium of teleostean fish gills. Cellular
and functional adaptations of the chloride cell in re-
lation to salt adaptations // J. Cell Biol. 1979. Vol. 80.
58. S a r g e n t J.R., T h o m s o n A.J., B o r -
n a n c i n M. Activities and localization of suc-
cinic dehydrogenase and Na^+/K^+ -activated adeno-
sine triphosphatase in the gills of fresh water and
sea water eels (*Anguilla anguilla*) // Comp. Bio-
chem., Physiol. A. 1975. Vol. 51, N 1.
59. S k i d m o r e J.E., T o v e l P.M. Toxic effects
of zinc sulphate on the gills of rainbow trout //
Water Res. 1972. Vol. 6.
60. S m i t h L.S. Introduction to fish physiology. New
York, 1982.
61. S o l o m o n R.J., S i l v a P., B e n d J.R.,
E p s t e i n F.H. Thiocyanate inhibition of ATP-
ase and its relation to anion transport // Amer.
J. Physiol. 1975. Vol. 229, N 3.
62. Z e n k e r W.G., F e r g u s o n H.W., B a r -
k e r I.K., W o o d w a r d B. Epithelial and pil-

lar cell replacement in gill of juvenile trout, *Salmo gairdneri* Richardson // *Comp. Biochem., Physiol. A.* 1987. Vol. 86, N 3.

63. *Zuchelkowski E., Pinkstaff C.A., Hinto D.A.* Mucosubstance histochemistry in control and acid-stressed epidermis of brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* (LeSueur) // *Anat. Rec.* 1985, Vol. 212, N 144.

В и н о г р а д о в Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных	3
Н е п о м н я ш и х В.А., В а л ю ш о к Л.Н. Инстинктивное поведение личинок ручейников <i>Chaetopteryx villosa</i> Fabr....	29
К о з л о в с к а я В.И., М е н з и к о в а О.В., Ч у й к о Г.М., М а й е р Ф.Л. Холинэстеразы водных животных	42
Р у ж и н с к а я Н.Н., Г д о в с к и й П.А. Ацетилхолинэстераза в обонятельной системе рыб	67
Р у ж и н с к а я Н.Н., Г д о в с к и й П.А., М е н з и к о в а О.В. Влияние anosмии и деэферентации на активность ацетилхолинэстеразы обонятельной луковицы карася	79
П а в л о в Д.Ф., К о з л о в с к а я В.И., Ф л е р о в Б.А. Использование коллагена для оценки токсического действия загрязняющих веществ на рыб	85
Н е п о м н я ш и х В.А., В а л ю ш о к Л.Н. Действие хлорофоса на строительное поведение ручейников <i>Chaetopteryx villosa</i> Fabr	95
М а т е й В.Е. Функциональная морфология жаберного эпителия пресноводных костистых рыб	104

УДК 597-11(28)+592-11(28)

В и н о г р а д о в Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. - Л.: Наука, 1989. - С. 3-28,

Установлены закономерности минерального обмена у рыб и беспозвоночных при изменении ионного состава, минерализации и pH воды. Выявлены особенности функционирования системы ионной регуляции при акклимации водных животных к низким величинам pH внешней среды. Изучено действие аммонийного и пестицидного загрязнения водной среды на ионный обмен в жабрах рыб и беспозвоночных. Библиогр. 67 назв. Ил. 8. Табл. 4.

УДК 595.745-151

Н е п о м н я ш и х В.А., В а л ю ш о к Л.Н. Инстинктивное поведение личинок ручейников *Chaetopteryx villosa* Fabr. // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. - Л.: Наука, 1989. - С. 29-41.

Показано, что инстинктивное поведение личинок при строительстве домиков может рассматриваться как динамическая система с несколькими относительно устойчивыми состояниями. Каждое состояние соответствует определенному стереотипу действия личинок. Библиогр. 13 назв. Табл. 5.

УДК 591.05(204)+574.64

К о з л о в с к а я В.И., М е н з и к о в а О.В., Ч у й к о Г.М., М а й е р Ф.Л. Холинэстеразы водных животных // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. - Л.: Наука, 1989. - С. 42-66.

Рассматриваются холинэстеразы водных животных различных филогенетических групп. Обсуждается их субстратная специфичность, кинетические параметры, чувствительность к ингибиторам, содержание в различных органах и тканях, степень сходства с ацетилхолинэстеразой и холинэстеразой высших позвоночных. Библиогр. 112 назв. Табл. 5.

УДК 597-1.05+597-118.534

Р у ж и н с к а я Н.Н., Г д о в с к и й П.А. Ацетилхолинэстераза в обонятельной системе рыб // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. - Л.: Наука, 1989. - С. 67-78.

У 11 видов пресноводных рыб определена удельная активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в периферическом и центральном отделах обонятельной системы. Доказано, что активность АХЭ в обонятельных центрах может служить показателем степени развития обоняния. Установлено влияние ингибирования активности АХЭ на обонятельную чувствительность рыб. Обсуждается предположение о медиаторной функции ацетилхолина в обонятельной луковице рыб. Библиогр. 23 назв. Ил. 3. Табл. 2.

Ружинская Н.Н., Гдовский П.А., Мензикова О.В. Влияние аносмии и деэферентации на активность ацетилхолинэстеразы обонятельной луковицы карася // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. – Л.: Наука, 1989. – С. 79–84.

Экспериментально установлено, что перерезка обонятельного тракта не влияет на уровень активности ацетилхолинэстеразы в обонятельной луковице карася, тогда как аносмирование приводит к значительному снижению активности фермента. Библиогр. 11 назв. Ил. 1. Табл. 2.

УДК 574.64:597

Павлов Д.Ф., Козловская В.И., Флеров Б.А. Использование коллагена для оценки токсического действия загрязняющих веществ на рыб // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. – Л.: Наука, 1989. – С. 85–94.

Рассмотрены значение и особенности метаболизма коллагена животных. Показано, что содержание этого белка в тканях изменяется под действием токсических веществ разных классов. Обосновывается использование содержания коллагена как теста состояния рыб в водоемах, подвергающихся загрязнению. Библиогр. 49 назв.

УДК 574.64+595.745-151

Непомнящих В.А., Валушок Л.Н. Действие хлорофоса на строительное поведение ручейников *Chaetopteryx villosa* Fabr. // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. – Л.: Наука, 1989. – С. 95–103.

Показана связь чувствительности поведенческих характеристик к действию токсиканта с устойчивостью поведения как динамической системы. Хлорофос действует прежде всего на неустойчивые участки в цепи инстинктивных действий. Библиогр. 6 назв. Табл. 4.

УДК 577.128:591.149:591.428.4:597.5

Матей В.Е. Функциональная морфология жаберного эпителия пресноводных костистых рыб // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. – Л.: Наука, 1989. – С. 104–141.

Приводятся результаты электронно-микроскопического исследования жаберного эпителия 16 видов пресноводных костистых рыб – представителей 8 семейств. Описана ультраструктура основных типов клеток, формирующих эпителий жабр: респираторных, хлоридных, слизистых, палочковых и малодифференцированных в норме и при различных токсических воздействиях. Показаны некоторые механизмы адаптации эпителия к действию повреждающих факторов среды. Библиогр. 63 назв. Ил. 10. Табл. 2.



„НАУКА”
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ