

ФИЗИОЛОГИЯ
ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 594.6:591.05

КАТИОНЫ В ТКАНЯХ МОЛЛЮСКОВ
ПРИ РЕЗКИХ ОТЛИЧИЯХ ОСМОЛЯЛЬНОСТИ ГЕМОЛИМФЫ

© 2006 г. Е. И. Шахматова*, В. Я. Бергер**, Ю. В. Наточин*

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, пр. Горького, 44

**Зоологический институт РАН, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 1

E-mail: Natochin@iephb.ru

Поступила в редакцию 22.06.2005 г.

В опытах на двусторчатых и брюхоногих моллюсках различных видов, обитающих в пресных, солоноватых водах и морской среде различной солености, показана прямая зависимость между осмоляльностью гемолимфы, внеклеточной жидкости и концентрацией в ней ионов натрия. Выявлена прямая корреляция между осмоляльностью внеклеточной среды и содержанием ионов калия и магния в тканях (аддуктор, нога). Обсуждается вопрос о значении данных о физико-химических параметрах среды обитания и формировании клеток эукариот на начальных этапах эволюции животных.

Животные способны адаптироваться и жить в водной среде при очень больших отличиях солености — от пресных вод до ультрагалинных водоемов (Kinne, 1971; Хлебович, 1974, 1981; Бергер, 1986). Концентрация солей в среде обитания моллюсков может отличаться на несколько порядков, в некоторых озерах и реках она составляет доли грамма в литре, в воде океана достигает десятков грамм в литре. Один из основных способов адаптации животных к изменениям солености внешней среды основан на способности к регуляции осмоляльности жидкостей внутренней среды и сохранения физико-химических параметров крови на постоянном уровне (гомойоосмотические животные, человек) (Физиология..., 1993; Горн и др., 1999; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). В основе второго способа приспособления к солености среды обитания (у пойкилоосмотических организмов) лежит волюморегуляция клеток (Gilles, 1998; Lang *et al.*, 1998; Wehner *et al.*, 2004). Механизмы осморегуляции у животных исследованы достаточно подробно (Krogh, 1939; Potts, Parry, 1964; Наточин, 1976, 1999; Comprehensive..., 1996). В этом процессе у гомойоосмотических организмов ведущая роль принадлежит осморегулирующим органам (Хочачка, Сомеро, 1977). У пойкилоосмотических животных в основе эвригалинности лежат клеточные механизмы адаптации. В качестве внутриклеточных осмолитов участвуют ионы и низкомолекулярные органические вещества. Подробно исследованы механизмы регуляции содержания аминокислот в клетках животных при изменениях солености среды (Gilles, 1997; Gilles, Delpire, 1997). Вместе с тем, хотя роль неорганических ионов в процессах клеточной

адаптации к изменяющейся солености была неоднократно предметом изучения (Наточин, Бергер, 1979; Berger, Kharazova, 1997), до сих пор остается без ответа вопрос о соотношении концентрации катионов во внеклеточной жидкости и в тканях, клетках при очень значительных отличиях осмоляльности гемолимфы, околоклеточной жидкости; как соотносятся ионы натрия и калия во внеклеточной среде и в клетках в этих условиях. Ответ на этот вопрос имеет существенное значение и для экологической физиологии, и для выяснения возможных этапов начальной эволюции клеток. Выбор моллюсков в качестве объекта исследования был обусловлен их очень широкими приспособительными возможностями при адаптации к средам с различной соленостью.

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить, какие катионы определяют тканевую адаптацию к меняющейся осмоляльности гемолимфы, каковы минимальные возможные значения тканевой (и в конечном счете, внутриклеточной) концентрации катионов при акклимации моллюсков, особенно у представителей тех видов моллюсков, у которых выявлены наиболее низкие значения осмоляльности гемолимфы, каково соотношение между концентрацией катионов в гемолимфе и в тканях, в оценке доли ионов натрия в осмоляльности гемолимфы, внеклеточной жидкости у моллюсков, адаптированных к жизни в разных условиях существования, в том числе к пресной воде, водоемам с высокой соленостью; выяснении соотношения между осмоляльностью внеклеточной жидкости и содержанием ионов калия в тканях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были брюхоногие и двусторчатые моллюски из морских, солоноватых и пресных водоемов. Мидии *Mytilus edulis* (L.) и литторины *Littorina saxatilis* (Olivi) собраны в июле-августе 2004 г. во время отлива на каменисто-песчаной литорали в губе Чупа Кандакшского залива Белого моря. В местах сбора материала соленость составляла 24-26‰, а температура воды 10-13°C. В лаборатории животные содержались в аквариумах с морской водой при температуре $10 \pm 1^\circ\text{C}$. Контрольные моллюски находились в воде с соленостью 25‰. Моллюски экспериментальной группы акклиматизировались к пониженной солености путем ее ступенчатого снижения (Khlebovich, Kondratenkov, 1973). Каждый из трех шагов акклиматизации (25-14‰, 14-10‰, 10-8‰) занимал от 10 до 14 сут. После ее завершения извлекали жидкость из мантийной полости, гемолимфу, а также ногу, мантию или аддуктор. Мидии *Mytilus trossulus* (Gould) были собраны в ноябре 2004 г. на глубине 4-6 м в Финском заливе Балтийского моря у побережья Финляндии (район биостанции Tvärmine), соленость воды в местах сбора 6.2‰.

Пресноводные моллюски-живородки *Viviparus viviparus* L. и битинии *Bithynia tentaculata* L. были собраны в октябре 2004 г в прудах Санкт-Петербурга и Ленинградской обл. в районе Старого Петергофа. Перловицы *Unio tumidus* Philipsson и *Unio pictorum* L. собраны в то же время в прибрежных водах Финского залива в районе Старого Петергофа (соленость <1‰). Жемчужницы *Margaritifera margaritifera* L. - в сентябре 2004 г. в р. Кереть на севере республики Карелия. Всех пресноводных моллюсков содержали перед опытом в течение нескольких суток в бассейнах в аквариальной комнате в пресной воде при температуре, максимально приближенной к естественной. Кормление моллюсков не производили.

Для исследования содержания ионов натрия, калия, кальция и магния в тканях моллюсков у них изолировали аддуктор, мантию или ногу, помещали на кварцевые подложки и взвешивали на микроаналитических весах (Mettler AJ100, Швейцария). Затем пробы на кварцевых стеклах помещали на штативы и высушивали в термостате при температуре 105°C в течение 24 ч до постоянного веса, вновь взвешивали на тех же весах для расчета количества воды в тканях. Далее пробы на кварцевых стеклах помещали в пробирки, добавляли 0.2 мл концентрированной HNO_3 и проводили озоление в суховоздушной бане при 90°C до полного растворения органических веществ. После этого пробы разводили дистиллированной водой и измеряли концентрацию ионов.

Осмоляльность проб воды, гемолимфы и мантийной жидкости определяли с помощью миллиосмометра МТ-4 (Буревестник, Санкт-Петербург). Концентрация ионов Na^+ и K^+ была измерена на пламенном фотометре (Corning 410, Великобритания) в воздушно-пропановом пламени, концентрация ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} - на атомном абсорбционном спектрофотометре (Hitachi, мод. 508, Япония). Для построения калибровочной кривой были использованы стандарты фирмы Aldrich Chemical Company, Inc. (США). Различия всех показателей оценивались статистически по тесту ANOVA и t-критерию Стьюдента-Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация катионов в гемолимфе и среда обитания моллюсков. У исследованных моллюсков осмоляльность гемолимфы, внеклеточных жидкостей внутренней среды различалась более чем в 20 раз - от 32 мОсм/кг H_2O у пресноводной жемчужницы до >700 мОсм/кг H_2O у беломорских мидий (табл. 1). Исследованные моллюски, подвергшиеся акклиматизации в морской воде со сниженной соленостью или обитающие в пресной воде, имели промежуточные значения осмоляльности внеклеточных жидкостей (табл. 1). Следовало проанализировать изменения концентрации ионов натрия, калия, кальция и магния в гемолимфе и соотнести их с осмоляльностью среды обитания и концентрацией ионов в тканях. С этой целью были сопоставлены концентрации ионов в гемолимфе, мантийной жидкости (в тех случаях, когда малые размеры морских моллюсков не позволяли извлечь достаточное количество гемолимфы), и в тканях (аддуктор, мантия, нога). В тканях содержание ионов рассчитывалось в ммоль/кг сырого вещества.

У мидий, извлеченных из морской воды, осмоляльность мантийной жидкости и гемолимфы была практически одинаковой. В условиях эксперимента с изменением солености морской воды это положение справедливо до тех пор, пока створки раковины остаются открытыми. Смыканием створок раковины руководит осморегулирующий рефлекс: при опреснении внешней среды снижается концентрация электролитов в гемолимфе (Хлебович и др., 1981). В наших опытах на мидиях и литторинах была обеспечена длительная предварительная акклиматизация моллюсков, что позволило постепенно в течение нескольких недель снизить соленость морской воды с 25‰ до 8‰. Оказалось, что при снижении осмоляльности в среде с 708 до 231 мОсм/кг H_2O концентрация ионов натрия уменьшалась в мантийной жидкости с 331 до 103 ммоль/л (табл. 1). Доля ионов Na^+ в суммарной концентрации осмотически активных веществ составляла 47% при исходной соле-

Таблица 1. Содержание ионов в тканях моллюсков, осмоляльность гемолимфы, мантийной жидкости и морской воды ($M \pm SE$)

Объект исследования*	Osm мосм/кг H ₂ O	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H ₂ O кг/кг су- хого вещества
		ммоль/кг сырого вещества				
<i>Mytilus edulis</i>						
Морская вода – 25‰	708	342	7.2	6.2	40	
Мантийная жидкость (20)	703.9 ± 0.7	332 ± 8.8	7.5 ± 0.2	6.5 ± 0.3	38.3 ± 0.8	
Нога (20)		92.7 ± 3.0	79.0 ± 1.3	1.7 ± 0.2	12.0 ± 0.6	3.33 ± 0.08
Абдуктор (20)		122.9 ± 4.6	65.2 ± 1.6	2.7 ± 0.9	13.0 ± 1.1	3.45 ± 0.08
Мантия (20)		132.4 ± 29.5	72.3 ± 1.3	2.2 ± 0.5	14.7 ± 5.0	3.95 ± 0.27
Морская вода – 8‰	231	107	1.65	2.7	15	
Мантийная жидкость (24)	233 ± 0.6	102.5 ± 1.2	3.4 ± 0.17	2.63 ± 0.14	12.8 ± 0.24	
Нога (28)		30.3 ± 1.2	45.7 ± 0.7	3.3 ± 1.3	11.6 ± 0.7	4.57 ± 0.19
Абдуктор (28)		37.3 ± 1.6	31.3 ± 1.1	2.64 ± 0.5	9.2 ± 1.2	4.17 ± 0.09
Мантия (28)		28.3 ± 1.2	37.5 ± 1.2	9.4 ± 3.3	6.5 ± 0.6	6.03 ± 0.26
<i>M. trossulus</i>						
Морская вода – 6.2‰	185	81	1.8	2.8	14	
Мант. жидкость (15)	187.8 ± 0.9	81.1 ± 0.4	2.2 ± 0.1	3.4 ± 0.17	11.2 ± 0.23	
Нога (15)		24.5 ± 1.1	41.4 ± 0.3	1.4 ± 0.5	5.5 ± 0.7	4.06 ± 0.1
Абдуктор (15)		35.3 ± 1.9	33.7 ± 2.6	2.04 ± 0.4	6.9 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Мантия (15)		38.7 ± 1.4	33.5 ± 1.0	1.5 ± 0.3	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.2
<i>Littorina saxatilis</i>						
Морская вода – 25‰	708	342	7.2	6.2	40	
Нога (19)		128 ± 18	76.2 ± 1.5	67.2 ± 16.5	236 ± 22	2.49 ± 0.13
<i>L. saxatilis</i>						
Морская вода – 8‰	231	107	1.65	2.7	15	
Нога (21)		91.5 ± 11.9	38.1 ± 4.2	181 ± 59	61.2 ± 7.0	3.61 ± 0.13
<i>Unio pictorum</i>						
Гемолимфа (6)	51.7 ± 1.6	14.4 ± 0.6	0.47 ± 0.06	1.56 ± 0.16	0.39 ± 0.09	
Нога (6)		9.0 ± 1.1	10.7 ± 1.5	5.2 ± 2.1	6.1 ± 0.1	4.23 ± 0.1
Абдуктор (11)		13.0 ± 2.4	10.3 ± 2.2	3.8 ± 0.68	4.6 ± 0.5	4.16 ± 0.14
<i>U. tumidus</i>						
Гемолимфа (4)	48.5 ± 2.8	12.4 ± 0.8	0.37 ± 0.05	1.32 ± 0.1	0.22 ± 0.04	
Нога (4)		7.8 ± 0.51	7.8 ± 0.7	5.7 ± 3.1	5.30 ± 0.5	4.72 ± 0.21
Абдуктор (4)		11.0 ± 0.7	4.7 ± 0.48	4.5 ± 1.4	58.0 ± 4.6	4.85 ± 0.25
<i>Viviparus viviparus</i>						
Гемолимфа (13)	104.2 ± 3.6	31.8 ± 1.0	1.65 ± 0.1	6.7 ± 0.5	2.7 ± 0.3	
Мышцы (12)		13.5 ± 1.3	28.4 ± 1.9	124 ± 15	50.3 ± 2.8	2.83 ± 0.17
<i>Bithynia tentaculata</i>						
Нога (6)		23.4 ± 5.0	31.7 ± 2.7	247 ± 17	58.0 ± 4.6	2.55 ± 0.12
<i>Margaritifera margaritifera</i>						
Гемолимфа (14)	31.8 ± 1.1	14.7 ± 0.39	0.37 ± 0.02	1.86 ± 0.08	0.41 ± 0.02	
Нога (13)		11.6 ± 1.9	7.6 ± 1.3	3.1 ± 0.8	4.4 ± 0.3	5.3 ± 0.2
Абдуктор (13)		11.3 ± 1.2	8.5 ± 1.6	2.6 ± 0.6	3.8 ± 0.2	4.53 ± 0.08
Мантия (14)		13.8 ± 0.7	4.9 ± 0.5	79.8 ± 18.5	9.0 ± 2.9	3.75 ± 0.32

* В скобках указано количество исследованных образцов.

Таблица 2. Доля ионов натрия в осмоляльности внеклеточных жидкостей моллюсков

Объект	Количество обследованных особей	Концентрация Na ⁺ , % к осмоляльности внеклеточной жидкости
<i>Mytilus edulis</i> . (25‰)	18	47.5 ± 1.4
<i>M. edulis</i> . (8‰)	24	44.0 ± 0.5
<i>M. trossulus</i> . (6.2‰)	15	43.2 ± 0.2
<i>Unio pictorum</i>	6	28.0 ± 0.8
<i>Unio tumidus</i>	4	25.5 ± 0.6
<i>Viviparus viviparus</i>	13	30.8 ± 1.1
<i>Margaritifera margaritifera</i>	12	46.3 ± 2.1

ности морской воды, равной 25‰. После длительной акклимации к морской воде с меньшей соленостью (8‰), т.е. при снижении осмоляльности в 3.3 раза концентрация ионов натрия уменьшилась, но их доля в осмоляльности гемолимфы осталась почти такой же и составляла 44% при снижении солености до 8‰ (табл. 2). У мидий *M. trossulus*, обитающих в Балтийском море, где соленость воды была 6.2‰ (осмоляльность 185 мосм/кг Н₂О), доля натрия в общей солености также близка к приведенным выше значениям - 43.2% (табл. 2). Следовательно, при уменьшении солености морской воды на 3/4 доля ионов натрия в суммарной осмоляльности гемолимфы снижалась всего на 9%. Таким образом, у моллюсков

ионы натрия доминировали среди осмотически активных компонентов внеклеточной жидкости в очень широком диапазоне солености внешней среды и при всех условиях сохранялась их высокая доля в общей осмоляльности окооклеточной среды.

Представляло интерес сопоставить осмоляльность и долю в ней ионов Na⁺ у моллюсков, обитающих в пресных водах и на суше. Из изученных животных наименьшая осмоляльность внеклеточной жидкости выявлена у жемчужницы, в гемолимфе которой осмоляльность составляла 32 мосм/кг Н₂О, а доля ионов Na⁺ - 46.3%, практически столько же, что и у морских моллюсков (табл. 1, 2).

У пресноводных моллюсков (перловица, живородка) осмоляльность гемолимфы была несколько выше, чем у жемчужницы - от 49 до 104 мосм/кг Н₂О. При этом в их гемолимфе доля ионов натрия в общей осмоляльности внеклеточных жидкостей оказалась ниже, чем у жемчужницы, литторины, мидий обоих видов и составила около 29.1%. Таким образом, исследованных моллюсков можно разделить на две группы: в одной доля иона натрия в осмоляльности гемолимфы составляла 45.6 ± 0.67% (*n* = 71), у другой - 29.1 ± 0.8% (*n* = 23). Причина столь значительных отличий не ясна.

При акклимации морских моллюсков к пониженной солености, концентрация разных ионов в гемолимфе, естественно, падала. Сопоставление суммарной осмоляльности и концентрации ионов натрия позволяло оценить стратегию адаптации. Данные, представленные на рис. 1, показывают, что имеется прямая зависимость с очень высоким коэффициентом корреляции (*r* = 0.99, *p* < 0.01) между осмоляльностью гемолимфы, внеклеточной жидкости у моллюсков и концентрацией в них ионов натрия. Концентрация ионов калия, кальция и магния в гемолимфе моллюсков всегда ниже, чем ионов натрия, эти величины у исследованных животных различались на порядок и более (табл. 1). Сопоставление концентраций ионов калия и натрия в гемолимфе у разных видов моллюсков в разных условиях также показало наличие прямой положительной корреляции между ними (*r* = 0.96, *p* < 0.01; рис. 2) в условиях резких отличий концентрации натрия и осмоляльности в жидкостях внутренней среды. Следовательно, в гемолимфе у исследованных моллюсков в исходном состоянии и при акклимации к сниженной солености сохранялось близкое к исходному соотношение между катионами.

Соотношение концентрации катионов в тканях и гемолимфе. Термин адаптация к изменению солености относится к выяснению содержания катионов, которое обеспечивает волюморегуляцию клеток в ответ на изменение

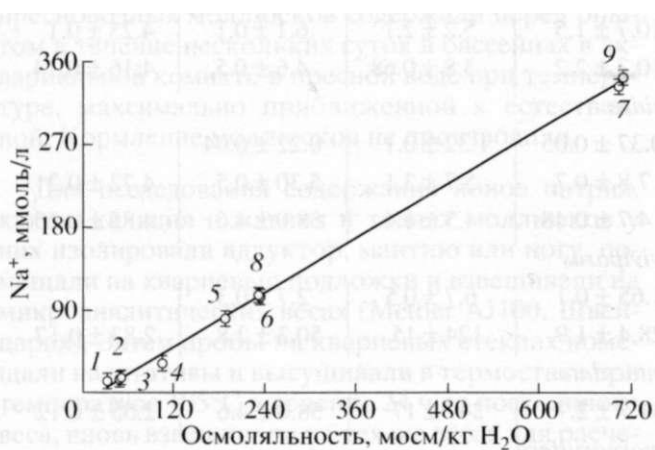


Рис. 1. Осмоляльность гемолимфы и концентрация в ней ионов натрия у различных видов моллюсков при снижении солености среды, условные обозначения для рис. 1—4: 1 - *Margaritifera margaritifera*; 2 - *Unio tumidus*; Я - *U. pictorum*; 4 - *Viviparus viviparus*; 5 - *Mytilus trossulus*; 6 - *M. edulis*, 8‰; 7 - *M. edulis*, 25‰; 8 - *Littorina saxatilis*, 8‰; 9 - *L. saxatilis*, 25‰.

осмоляльности внешней среды. Требовалось разработать подход для кумулятивной оценки содержания ионов в тканях у особой мелких организмов. Мы исходили из положения, что у многоклеточных беспозвоночных осмотическое давление внутри клетки и вне ее практически одинаковое, но определяется разными ионами, преимущественно, ионами натрия во внеклеточной жидкости, а в клетках - иными, возможно ионами калия. Степень связывания ионов с белками гемолимфы при таких концентрациях мала, поэтому ионы могут служить определяющими факторами стабилизации осмоляльности гемолимфы и основными факторами волюморегуляции клеток. Для оценки адекватности высказанного соображения была сопоставлена концентрация ионов Na^+ в гемолимфе и содержание ионов K^+ в тканях.

У исследованных моллюсков при всех условиях акклимации особей выявлена прямая корреляция между осмоляльностью гемолимфы и концентрацией ионов калия в воде мышц (рис. 3; $r = 0.96$, $p < 0.01$). Оказалось, что, чем выше концентрация Na^+ в гемолимфе, тем относительно большее содержание магния при расчете на тканевую воду выявляется в аддукторе (рис. 4). В отличие от морских моллюсков, у которых для волюморегуляции клеток наряду с катионами в цитозоле накапливаются органические осмолиты (Бергер и др., 1984; Gilles, 1997; Deaton *et al.*, 2001), у пресноводных моллюсков (табл. 1) и живущих в пресной воде животных других систематических групп осмоляльность внутриклеточной жидкости практически полностью определяется концентрацией электролитов.

Прежде чем продолжить анализ полученных результатов следует обсудить вопрос о том, почему нами избран подход, основанный на сопоставлении тканевых, а не внутриклеточных концентраций ионов. Методически трудно определить внутриклеточную концентрацию ионов у мелких животных. Современные методы исследования позволяют отдельно определять содержание ионов в клетках и внеклеточных жидкостях. Для изучения локализации ионов в клетках используют рентгеновский микроанализ, цитохимическое выявление ионов в компонентах клеток (Govardovskij *et al.*, 1976). С помощью инулинового метода или иного маркера внеклеточной жидкости можно определить ее объем в ткани и организме. Животному вводят инулин или иное вещество, распределяющееся только во внеклеточной жидкости, измеряют его концентрацию, а потом рассчитывают содержание ионов в тканях и клетках. Однако этот метод трудно применим для мелких беспозвоночных животных даже при использовании инулина- C^{14} . Методическая трудность заключается в том, что нужно обеспечить постоянное введение в кровь строго определенного количества

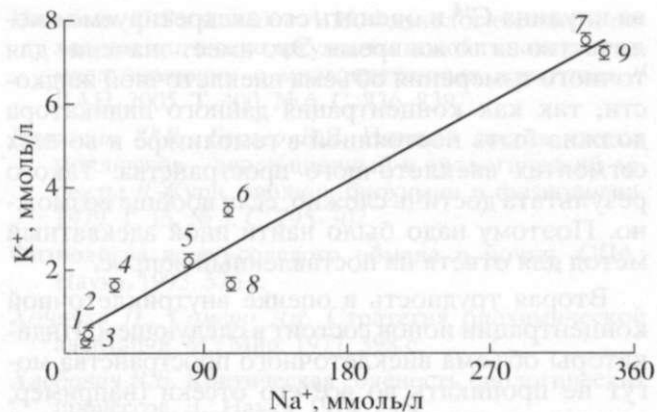


Рис. 2. Соотношение между концентрацией ионов натрия и калия в гемолимфе у различных видов моллюсков и при снижении солености среды.

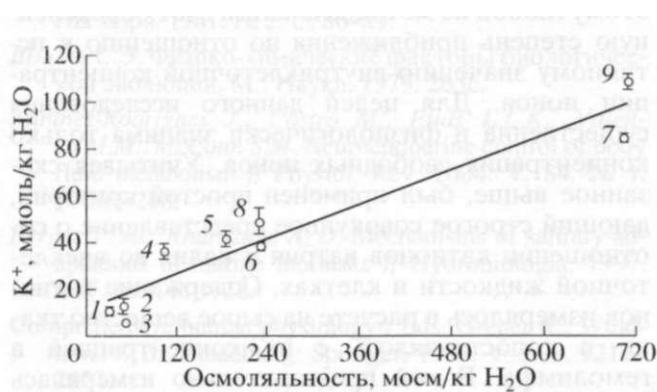


Рис. 3. Осмоляльность внеклеточной жидкости и содержание ионов калия в тканях аддуктора у различных видов моллюсков и при снижении солености среды.

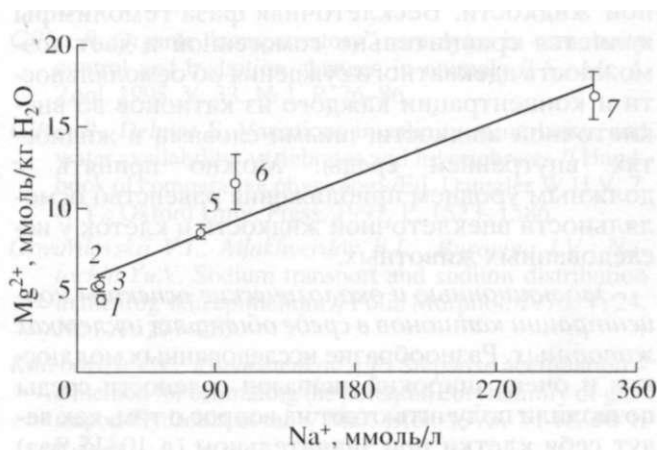


Рис. 4. Концентрация ионов натрия в гемолимфе и содержание ионов магния в тканях аддуктора у различных видов моллюсков и при снижении солености среды.

ва инулина C^{14} и оценить его экскретируемое количество за то же время. Это имеет значение для точного измерения объема внеклеточной жидкости, так как концентрация данного индикатора должна быть постоянной в гемолимфе и во всех сегментах внеклеточного пространства. Такого результата достичь сложно, если вообще возможно. Поэтому надо было найти иной адекватный метод для ответа на поставленный вопрос.

Вторая трудность в оценке внутриклеточной концентрации ионов состоит в следующем. Индикаторы объема внеклеточного пространства могут не проникать во все его отсеки (например, инулин по сравнению с сахарозой, имеет иной объем распределения). Кроме того, внутри клетки ионы распределены гетерогенно. Их содержание различно в цитозоле, митохондриях, ядре. Часть катионов, как вне клетки, так и внутри нее, связана с анионами, а другая часть свободна. Поэтому любой из методов анализа дает определенную степень приближения по отношению к истинному значению внутриклеточной концентрации ионов. Для целей данного исследования существенна и физиологически значима только концентрация свободных ионов. Учитывая сказанное выше, был применен простой критерий, дающий строгое совокупное представление о соотношении катионов натрия и калия во внеклеточной жидкости и клетках. Содержание катионов измерялось в расчете на сырое вещество ткани и сопоставлялось с их концентрацией в гемолимфе. В ней предварительно измерялась концентрация белка для оценки значимости этого фактора, она оказалась у моллюсков очень низкой и потому не было необходимости вносить поправку на связывание одновалентных катионов белком. Примененный подход позволял выявить тенденции изменения содержания катионов в воде тканей по отношению к внеклеточной жидкости. Бесклеточная фаза гемолимфы является сравнительно гомогенной и дает возможность адекватного суждения об осмоляльности и концентрации каждого из катионов во внеклеточной жидкости, иными словами в жидкостях внутренней среды. Можно принять с должным уровнем приближения равенство осмоляльности внеклеточной жидкости и клеток у исследованных животных.

Эволюционные и экологические аспекты концентрации катионов в среде обитания и клетках животных. Разнообразие исследованных моллюсков и очень широкий диапазон солёности среды позволили получить ответ на вопрос о том, как ведут себя клетки при значительном (в 10-15 раз) изменении осмоляльности внеклеточной жидкости. Оценка минимальных значений концентрации катионов в жидкостях внутренней среды моллюсков, выяснение какой из катионов доминирует в

тканевой жидкости (фактически цитоплазме клеток), а какой - определяет осмоляльность внеклеточной жидкости и окружающей внешней среды, изучение этого соотношения в широком диапазоне солёностных адаптаций моллюсков, - эти данные имеют значение для обсуждения одного из центральных вопросов биологии, касающегося эволюции клеток эукариот. Речь идет о среде происхождения клеток, начальных этапах эволюции жизни на Земле, когда происходило формирование протоклеток.

Результаты настоящей работы и данные литературы позволяют обсудить эти вопросы. Когда анализируется проблема эволюции эукариот, возникновения животных, большое внимание уделяют происхождению ядра, митохондрий (Маргелис, 1983) Это, безусловно, важнейший вопрос эволюции представителей различных царств живых существ. Однако от концентрации неорганических компонентов среды обитания зависела сама возможность эволюции первых клеток (Шноль, 1979), путь от молекул органических веществ к первым клеткам, путь эволюции, который привел к появлению протоклеток. Каков был физико-химический состав среды обитания этих доклеточных форм жизни на начальных этапах эволюции, когда появились прокариоты, возникли клетки эукариот, произошло разделение живых организмов на различные царства, последующая их эволюция. Прямого ответа на эти вопросы нет. Естественно, исследованные нами организмы занимают довольно высокое положение на древе эволюции, но некоторые соображения в отношении поставленного вопроса могут быть высказаны. Очевидно, что физико-химическая основа первичных клеток сформировалась на более ранних этапах развития и была той матрицей, на которой развивались последующие этапы жизни.

Полученные в нашей работе данные показывают, что у исследованных организмов, живущих в пресной воде и имеющих очень низкую осмоляльность, и у морских моллюсков в естественных условиях высокой солёности и акклиматизированных к низкой солёности - во всех случаях доминирующим катионом внеклеточной жидкости остается ион натрия, а в клетках ему противостоит ион калия. Можно предполагать, что такие отношения ионов натрия и калия сформировались у исходных форм протоклеток, обладавших плазматической мембраной с высокой ионной селективностью и далее происходило развитие клеток эукариот и сохранение такого соотношения ионов в течение сотен миллионов лет эволюции. Однако ионселективной плазматической мембраны не могло быть у первых живых организмов, они могли обладать на начальных этапах эволюции клеточной оболочкой, плазматическая мембрана возникла позднее и стала одним из ключе-

вых этапов эволюции клетки (Наточин, 2005). Средой возникновения жизни могли быть калиевые водоемы, поскольку внутриклеточные процессы требуют преобладания ионов калия. Формирование ионселективной плазматической мембраны могло осуществиться на более поздних этапах развития и стимулом стало изменение ионного состава среды обитания, водоемы, где преобладающее значение приобрели ионы натрия (Наточин, Ахмедов, 2005). У подавляющего большинства организмов доминирующими катионами внеклеточной жидкости являются ионы натрия (Natochin, Chernigovskaya, 1997). Существование животных с калиевой гемолимфой установлено лишь у некоторых видов насекомых и может рассматриваться как вторичная адаптация (Natochin, Parnova, 1987).

Проведенные исследования служат аргументом единой стратегии формирования клеток у моллюсков, основанной на преобладании ионов натрия вне цитоплазмы и калия внутри клеток в очень широком диапазоне изменений осмоляльности окооклеточной среде. При адаптации к возрастанию солености морской воды в клетках двустворчатых моллюсков растет не только концентрация калия, аминокислот, но и ионов натрия. Эти приспособительные реакции обеспечивают условия для стабилизации объема клеток моллюсков.

Авторы выражают признательность за помощь в сборе моллюсков А.М. Горбушину, Д.К. Дирину, П.П. Стрелкову и И.А. Тихимирову. Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда ведущих научных школ (НШ.2106.2003.4) и Программы № 25 (подпрограмма 1) Президиума РАН "Проблемы зарождения и эволюции биосферы".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бергер В.Я.* Адаптации морских моллюсков к изменениям солености среды. Л.: Наука, 1986. 214 с.
- Бергер В.Я., Жирмунский А.В., Наточин Ю.В., Харазова А.Д., Ярославцева А.М.* Механизмы адаптации морских моллюсков к изменениям солености. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1984. 68 с.
- Горн М.М., Хейтц У.И., Сверинген П.Л.* Водно-электролитный и кислотно-основной баланс. СПб.; М.: Невский диалект, Бином, 1999. 320 с.
- Маргелис Л.* Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. 352 с.
- Наточин Ю.В.* Ионорегулирующая функция почки. Л.: Наука. 1976. 267с.
- Наточин Ю.В.* Эволюция осморегуляции у позвоночных // Рос. физиол. журн. 1999. Т. 85. № 4. С. 582-593.
- Наточин Ю.В.* Роль ионов натрия как стимула в эволюции клеток и многоклеточных животных // Палеонтол. журн. 2005. № 4. С. 19-24.
- Наточин Ю.В., Ахмедов А.М.* Физиологические и палеогеохимические аргументы новой гипотезы стимула эволюции и многоклеточных животных // ДАН. 2005. Т. 400. № 6. С. 836-839.
- Наточин Ю.В., Бергер В.Я.* Ионный состав клеток моллюсков - эволюционный и экологический аспекты // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1979. Т. 15. № 3. С. 295-302.
- Физиология водно-солевого обмена и почки.* СПб.: Наука, 1993. 576 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж.* Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 398 с.
- Хлебович В.В.* Критическая соленость биологических процессов. Л.: Наука, 1974. 235с.
- Хлебович В.В.* Акклимации животных организмов. Л.: Наука, 1981. 135 с.
- Хлебович В.В., Яковишина Л.А., Комендантов А.Ю.* Изменение содержания электролитов в мантийной жидкости и гемолимфе беломорских мидий при длительной опреснении внешней среды // Биология моря. 1981. № 2. С. 86-89.
- Шноль С.Э.* Физико-химические факторы биологической эволюции. М.: Наука, 1979. 263с.
- Antunes-Rodrigues J., Castro M., Elias L.L.K., Valenca M.M., McCann S.M.* Neuroendocrine control of body fluid metabolism // *Physiol. Rev.* 2004. V. 84. № 1. P. 169-208.
- Berger V. Ja., Kharazova A. D.* Mechanisms of salinity adaptations in marine mollusks // *Hydrobiologia.* 1997. V. 7. № 1, P. 1-12.
- Comprehensive human physiology / Eds. Greser R., Windhorst U.B.; Heidelberg: Springer. 1996. V. 2. P. 1217-2527.*
- Deaton L.E.* Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of betaine and alanine // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2001. V. 260. № 2. P. 185-197.
- Gilles R.* Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates // *Current topics in membranes and transport/Eds. Gilles R., Kleinzeller A., Bolis L. N.Y.: Acad. Press. 1997. P. 205-247.*
- Gilles R.* Organic "compensatory" osmolytes in osmolarity control and hydration changes in animals // *S. Afr. J. Zool.* 1998. V. 33. № LP. 76-86.
- Gilles R., Delpire E.* Variations in salinity, osmolarity, and water availability: vertebrates and invertebrates // *Handbook of comparative physiology/Ed. Dantzer W.H V. 2. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1997. P. 1523-1586.*
- Govardovskij V.I., Allakhverdiv B.L., Burovina I.V., Natochin Yu.V.* Sodium transport and sodium distribution in the frog skin epithelium // *Folia Morphol.* 1976. V. 24. №. 3. P. 277-283.
- Khlebovich V.V., Kondratenkov A.P.* Stepwise acclimation - a method for estimating the potential euryhalinity of gastropod *Hydrobia ulvae*// *Mar. Biol.* 1973. V. 18. № 1. P. 6-8.
- O. Kinne* Salinity - animals - invertebrates // *Mar. ecol.* 1971. V. 1. № 2. P. 820-995.
- Krogh A.* Osmotic regulation in aquatic animals. Cambridge, 1939. 242 p.

- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volki H., Waldegger S., Gubits E., Hassinger D.* Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // *Physiol. Rev.* 1998. V. 78. № 2. P. 247-306.
- Natochin Yu.V., Parnova R.G.* Osmolality and electrolyte concentration of hemolymph and the problem of ion and volume regulation of cells in higher insects // *Comp. Biochem. Physiol.* 1987. V. 88A. № 3. C. 563-570.
- Natochin Yu.V., Chernigovskaya T.V.* Evolutionary physiology: history, principles // *Сотр. Biochem. Physiol.* 1997. V. 118A. № 1. P. 63-79.
- Potts W.T.W., Parry G.* Osmotic and ionic regulations in animals. Oxford: Pergamon, 1964. 424 p.
- Wehner F., Olsen H., Tinel H., Kinne-Saffran E., Kinne R.* Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2004. V. 148. P. 1-80.

Cations in Molluscan Tissues at Sharply Different Hemolymph Osmolality

E. I. Shakhmatova*, V. Ya. Berger**, and Yu. V. Natochin*

* *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Thoreza pr. 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

** *Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab. 1, St. Petersburg, 194034 Russia*
e-mail: Natochin@iephb.ru

Abstract—Experiments on different bivalve and gastropod species living in fresh, brackish, and sea water of different salinity demonstrated a direct correlation between the osmolality of the hemolymph and interstitial fluid and the concentration of sodium ions in it. A direct correlation between the osmolality of the interstitial fluid and the content of potassium and magnesium ions in the tissues (adductor and foot) was revealed. The significance of physicochemical indices of the environment and formation of eukaryotic cells at the initial stages of animal evolution are discussed.