

**МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ К РАЗЛИЧНЫМ СОЛЕНОСТЯМ
У ПСЕВДОФИЛЛИДНЫХ ЦЕСТОД****Г. А. Виноградов, В. Г. Давыдов, Б. И. Куперман**

Институт биологии внутренних вод АН СССР, Борок, Ярославская область

Изучены закономерности адаптации к различным соленостям у цестод *Triaenophorus nodulosus* и *Eubothrium rugosum* — паразитов пресноводных рыб. Поступление воды в организм происходит по изолированным каналам, впервые выявленным при ультраструктурном исследовании. Объемная регуляция *T. nodulosus* осуществляется благодаря изменению размеров субтегументальных клеток, а *E. rugosum* — межклеточных пространств. Субтегументальные клетки *E. rugosum* реагируют на изменение солености в меньшей степени, чем таковые у *T. nodulosus*.

Вопрос об адаптационной пластичности организмов непосредственно связан с изучением фенотипической адаптации, определением нормы реакции вида. Однако если эти проблемы достаточно полно освещены для свободноживущих организмов, то относительно паразитических червей сведения весьма ограничены (Марков, 1958; Smyth, 1969; Хлебович, 1974; Давыдов, 1975; Хлебович, Михайлова, 1976). В этой связи нами были изучены реакции двух видов цестод, обладающих различной устойчивостью к изменениям солености внешней среды (Виноградов и др., 1982). В настоящей работе мы попытались выяснить причины этих различий и изучить закономерности адаптации цестод, паразитирующих в кишечнике пресноводных рыб, имеющих различное систематическое положение и происхождение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В экспериментах использовали половозрелых червей *Triaenophorus nodulosus* из кишечника щуки и *Eubothrium rugosum* из кишечника налима — представителя семейства тресковых, перешедшего из морских вод в пресные. В опытах применяли нормальный раствор Рингера для пойкилотермных животных с концентрацией NaCl — 6.5 г/л, KCl — 0.14 г/л, CaCl₂ — 0.12 г/л, NaHCO₃ — 0.2 г/л. Для получения более высоких или низких концентраций по отношению к нормальному Рингеру, количество солей пропорционально уменьшалось или увеличивалось. Цестод извлекали из кишечника рыб, промывали и помещали в растворы Рингера с концентрациями от 1 до 20 г/л NaCl при экспозициях 20 мин, 40 мин, 1—3, 6, 24 и 48 ч. В эти же сроки и при тех же концентрациях брали пробы червей для гистологического и электронно-микроскопического исследований, методики которых подробно описаны в предыдущей статье (Виноградов и др., 1982). Контролем служили физиологические и морфологические показатели обоих видов цестод, извлеченных непосредственно из кишечника хозяев. Для определения скорости общей потери натрия и калия паразитов помещали на 10—60 мин в определенный объем дистиллированной воды и затем измеряли концентрации этих ионов во внешней среде методом фотометрии в пламени. Полученные данные обрабатывали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Помещение *E. rugosum* в пресную воду вызывает вначале интенсивную утечку натрия и значительно меньшую — калия. После 40—60 мин инкубации червей величина скорости выхода натрия снижается на порядок и становится сравнимой с таковой для калия (рис. 1). В отличие от *E. rugosum* у *T. nodulosus* величина скорости потери натрия и калия в пресной воде изменяется в течение первого часа незначительно (рис. 1).

Скорость выхода натрия у *E. rugosum* зависит от солености предварительной среды акклимации и увеличивается в 1.5 раза при изменении содержания натрия во внешней среде в 4 раза (от 3 г/л до 12 г/л). Как известно, скорость

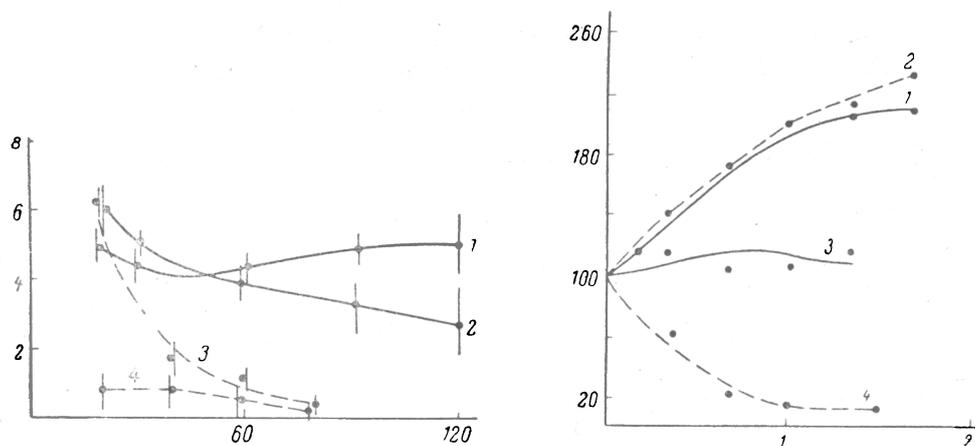


Рис. 1. Динамика скорости потери натрия и калия в пресной воде у цестод, акклимированных в растворе Рингера (6.5 г/л NaCl).

По оси ординат — скорость потери в $\frac{\mu\text{M}}{\text{час}}$; по оси абсцисс — время (t), в мин. Скорость потери калия у *T. nodulosus* (1), скорость потери натрия у *T. nodulosus* (2), скорость потери натрия у *E. rugosum* (3), скорость потери калия у *E. rugosum* (4).

Рис. 2. Динамика изменения веса червей и проницаемости их покровов в пресной воде.

По оси ординат — изменение веса и проницаемости, в процентах от исходной; по оси абсцисс — время акклимации, в часах. Изменение веса у *T. nodulosus* (1), у *E. rugosum* (2). Изменение проницаемости покровов у *T. nodulosus* (3), у *E. rugosum* (4).

потери солей зависит от величины проницаемости покровов тела для них и градиента концентрации между внутренней и наружной средой. В пресной воде градиент для натрия практически соответствует его концентрации во внутренней среде. Как правило, при адаптации к опреснению у водных беспозвоночных наблюдается снижение проницаемости покровов. Если принять во внимание, что скорость выхода натрия изменяется мало у *E. rugosum*, акклимированных к различным соленостям, то, очевидно, эти данные свидетельствуют о способности *E. rugosum* поддерживать концентрацию натрия во внутренней среде на постоянном уровне в широком диапазоне соленостей.

Динамика изменения веса в пресной воде у обоих видов существенно не различается (рис. 2). Это свидетельствует о равной скорости поступления воды в организм у этих видов. Уменьшение содержания ионов натрия и калия в тканевой жидкости у червей, помещенных в пресную воду, за счет утечки солей из организма, по нашим данным, не превышает 10%. При расчете динамики изменения проницаемости покровов в пресной воде эта величина не учитывалась. Мы принимали, что при помещении червей в гипотоническую среду первоначальное изменение концентрации внутренней среды соответствовало скорости поступления воды в организм, т. е. было пропорционально увеличению веса червей. Проницаемость покровов для натрия рассчитывали из отношения скорости потери натрия к градиенту концентраций между внутренней и наружной средой. Первоначальное значение градиента концентраций принимали

за 100%. Полученные результаты показывают, что покровы тела *E. rugosum* реагируют на резкое разбавление внешней среды снижением проницаемости для натрия, а у *T. nodulosus* подобной реакции не наблюдается (рис. 2).

Устойчивость тканей к обезвоживанию у обоих видов цестод в толерантном диапазоне концентраций гипотонической среды не превышает 50% снижения веса. При минимально переносимой солёности (2 г/л NaCl) у *T. nodulosus* наблюдается увеличение веса на 73%, а у *E. rugosum* лишь на 44%. Как в низких, так и в высоких солёностях отчетливо выражен фазный характер изменения веса у обоих видов цестод. После увеличения или уменьшения веса происходит в зависимости от солёности среды его частичная или полная нормализация. Характер изменения их веса в различных концентрациях солей свидетельствует о наличии у них объёмной регуляции (рис. 3, а, б).

Полученные данные по динамике выхода солей, а также способность удалять избыточную воду из организма в гипотонической среде дают основание предполагать непосредственное участие покровов в осморегуляции исследованных

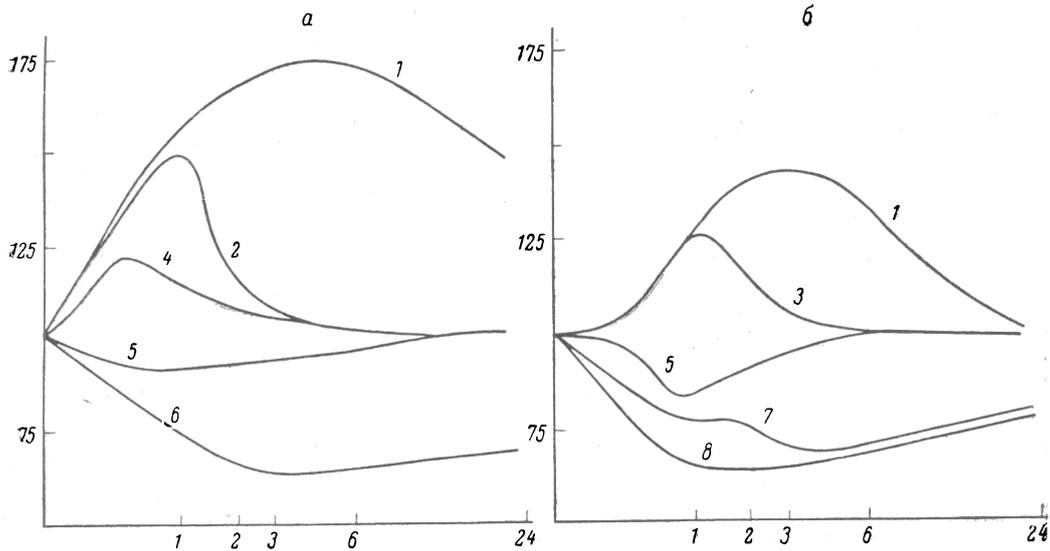


Рис. 3. Динамика изменения веса *T. nodulosus* (а), и *E. rugosum* (б) в растворах Рингера с различной концентрацией.

По оси ординат — вес червей в процентах от исходного; по оси абсцисс — экспозиция, в часах. 1 — раствор Рингера с концентрацией NaCl у 2 г/л, 2 — 3 г/л, 3 — 4 г/л, 4 — 6 г/л, 5 — 8 г/л, 6 — 10 г/л, 7 — 15 г/л, 8 — 20 г/л.

цестод. В этой связи важно проследить морфологические изменения покровных тканей, сопровождающие адаптацию изучаемых цестод к средам с различными концентрациями солей.

Исследование *T. nodulosus* при содержании в пресной воде показало, что в течение первых 20 мин часть клеток субтегумента значительно увеличивается в размерах за счет сильной вакуолизации их цитоплазмы. В дальнейшем этот процесс захватывает все большее число клеток, происходит разрыв цитоплазматических клеточных мембран, количество клеток значительно уменьшается и через 1 час в покровах наступают необратимые изменения, приводящие червей к гибели.

При действии низких концентраций солей (2 г/л) в течение 3 ч выявлены существенные изменения в ультраструктуре субтегументальных клеток *T. nodulosus*. Цитоплазма их разрежена, просветлена и содержит небольшое количество органоидов. Наиболее характерные изменения в клетках касаются митохондрий. Количество их возрастает, они утрачивают обычную правильную форму, становятся полиморфными, размеры их при этом значительно увеличиваются. У большинства митохондрий кристы неправильной формы, расширены, без четкой ориентации или вообще редуцированы, матрикс просветлен,

с небольшим количеством гранул (рис. 4, б; см. вкл.). Особо следует отметить набухание наружной камеры митохондрий, увеличение в связи с этим межмембранного пространства и появление в нем отдельных мультивезикулярных телец. Подобные тельца встречаются в значительном количестве в цитоплазме.

В цитоплазме присутствуют каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума, сближенного с митохондриями. Количество свободных рибосом невелико. В некоторых клетках обнаружены липидные гранулы. Дистальная цитоплазма тегумента в отличие от субтегумента в течение первых 6 ч инкубации все больше сжимается, в последующие сроки этот процесс несколько стабилизируется. Она сильно уплотнена, насыщена везикулами, вакуолями, гранулами и ламеллярными тельцами, тесно сближенными между собой (рис. 4, а). На основании этих данных концентрацию солей 2 г/л можно считать нижней границей выживаемости для *T. nodulosus*.

Содержание червей в солевой концентрации 3 г/л также вызывает набухание и вакуолизацию цитоплазмы клеток, однако это не приводит к их разрушению, и покровы не теряют своей целостности. Тегументальный слой уменьшается в размерах, но не так сильно, как при инкубации в среде с соленостью 2 г/л. Матрикс цитоплазмы субтегументальных клеток уплотненный, содержит вакуоли и крупные ламеллярные тельца. Митохондрии по своей структуре близки к контролю.

Воздействие высоких концентраций солей (9 г/л) на *T. nodulosus* приводит к уплотнению и сжатию цитоплазмы клеток субтегумента, начинающихся с их базальных частей. После 12 ч пребывания в растворе такой концентрации субтегумент представляет собой сильно уплотненный клеточный слой. Цитоплазма субтегументальных клеток содержит хорошо выраженный гранулярный эндоплазматический ретикулум с большим количеством рибосом. Митохондрии набухшие, характер изменений в них аналогичен наблюдавшемуся при воздействии низких концентраций солей (2 г/л) (рис. 4, в). Размеры тегумента значительно возрастают, достигая максимума на 6-м часу эксперимента. В дистальной цитоплазме тегумента наблюдается появление многочисленных канальцев, служащих, вероятно, для транспорта воды и солей (рис. 4, в). Характер физиологических и морфологических изменений свидетельствует о том, что данная концентрация солей приближается к максимально переносимой для *T. nodulosus*.

Реакция субтегументального слоя *E. rugosum* в процессе адаптации к средам различной тоничности существенно отличается от таковой у *T. nodulosus*. Инкубация червей в растворе с концентрацией солей 2 г/л показала, что начиная с первых 20 мин и до 6 ч происходит постоянное увеличение межклеточных пространств, в то время как размеры клеток изменяются незначительно. Впоследствии межклеточные пространства и размеры клеток начинают уменьшаться и к 48 ч приближаются к контролю.

Изучение ультраструктуры покровов *E. rugosum* при низкой концентрации солей выявило характерные изменения в слое дистальной цитоплазмы тегумента. В пределах 6 ч инкубации червей этот слой значительно уменьшается в размерах, уплотняется, что сопровождается отслоением его от подстилающей базальной пластинки, в результате чего образуются обширные полости (рис. 5, а). Связь между слоем цитоплазмы и базальной пластинкой сохраняется в виде цитоплазматических мостиков. В последующие сроки происходит увеличение размеров тегументального слоя, а к 48-му часу они не отличаются от контроля.

В цитоплазме субтегументальных клеток не обнаруживаются существенных изменений, она содержит большое количество митохондрий, каналы гранулярного эндоплазматического ретикулума, свободные рибосомы, аппараты Гольджи. Строение митохондрий в основном близко к контролю, однако встречается небольшое число набухших, с редуцированными кристами.

Исследование динамики изменения структуры покровов *E. rugosum* при содержании в высоких солевых концентрациях (18 г/л) показало, что на протяжении всего опыта идет постепенное уменьшение размеров субтегументального слоя за счет сжатия межклеточных пространств. Однако этот процесс лишь в незначительной степени затрагивает сами клетки. Характерны измене-

ния в цитоплазме и ядре субтегументальных клеток в среде с высокой концентрацией солей. Вся цитоплазма насыщена многочисленными, чрезвычайно сильно развитыми каналами гранулярного эндоплазматического ретикулула с большим числом рибосом на них и содержит много свободных рибосом (рис. 5, з). Ядро многолопастное, сильно инвагинированное. Цитоплазма тегумента в первые часы опыта сильно разбухает, увеличивая его размеры. После 6 ч акклимации наблюдается тенденция к уменьшению размеров тегумента. При ультратонком изучении удалось выявить большое количество сильно разветвленных расширенных канальцев, пронизывающих весь слой дистальной цитоплазмы тегумента. Наряду с ними в тегументе встречаются митохондрии с просветленным матриксом и частично редуцированными кристами и крупные вакуоли, образующиеся, по-видимому, из митохондрий (рис. 5, б, в). На основании характера объемной регуляции и структурных изменений при содержании *E. rugosum* в концентрации солей 18 г/л можно заключить, что компенсаторная реакция у них выражена в незначительной степени. Вероятно, эта солевая концентрация приближается к максимально переносимой для данного вида цестод.

ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты, проведенные на цестодах в средах с высокими и низкими концентрациями солей, позволили выявить ряд особенностей в адаптации *E. rugosum* и *T. nodulosus*. Исследование веса червей при акклимации к опреснению показало, что его изменения носят фазный характер. Аналогичные изменения наблюдали ранее у скребней при акклимации к низкой солености (Хлебович, Михайлова, 1976). Отклонение веса от первоначальных значений у псевдофиллидных цестод сопровождается полным или частичным возвращением его к норме. На границах толерантного диапазона соленостей среды компенсаторная фаза процесса адаптации выражена в меньшей степени, чем в более оптимальных соленостях. На первом этапе адаптации к понижению солености у *T. nodulosus* и *E. rugosum* наблюдается интенсивное поступление воды в организм. Результаты опытов показывают, что тегумент у обоих видов цестод легко проницаем для воды и солей. Этим данным, однако, противоречит тот факт, что тегумент сжимается в гипотонической среде и набухает в гипертонической. Вероятно, это противоречие объясняется отсутствием в цитоплазме тегумента осмотически активной воды (воды растворителя), а имеются лишь отдельные, изолированные от цитоплазмы компоненты тегумента — каналы, проницаемые для воды и солей. Поступающая через эти каналы вода скапливается первоначально над поверхностью базальной пластинки, что свидетельствует о ее более низкой проницаемости для воды, чем тегумента, и вызывает сжатие последнего. В дальнейшем процессы, протекающие у *E. rugosum* и *T. nodulosus*, различны.

У *E. rugosum* вода, проникая через базальную пластинку, быстро распространяется по межклеточным пространствам, увеличивая их объем и снижая концентрацию растворенных веществ. Это хорошо согласуется с преимущественным выходом натрия по отношению к калию в первые минуты после помещения цестод в пресную воду, поскольку натрий — основной внеклеточный катион. Быстрое падение проницаемости покровов для натрия и постоянно низкий уровень проницаемости его для калия — основного внутриклеточного катиона — у *E. rugosum* можно объяснить следующим образом. На первом этапе взаимодействия покровов с гипотонической внешней средой ионы диффундируют из межклеточного пространства через базальную пластинку и тегумент, которые хорошо проницаемы для солей и воды. На втором этапе поступление воды лимитируется низкой проницаемостью цитоплазматических мембран субтегументальных клеток, о чем свидетельствует незначительное изменение объема этих клеток в гипотонической среде, а также очень низкий уровень выхода натрия и калия у гидратированных червей.

У *T. nodulosus* субтегумент реагирует на понижение солености иначе. Высокий уровень потери калия у гидратированных червей и быстрое увеличение объема клеток свидетельствуют о хорошей проницаемости их цитоплазматических мембран для воды и солей. Вероятно, различие в проницаемости мембран

субтегументальных клеток и определяет тот факт, что в гипотонической среде у *E. rugosum* происходит гипергидратация и увеличение объема межклеточных пространств, а у *T. nodulosus* — клеток.

В гипертонических растворах тегумент *E. rugosum* и *T. nodulosus* увеличивается в размерах, при этом в нем выявляются многочисленные каналы, через которые осуществляется водно-солевой обмен между организмом и средой. По-видимому, в этих компартментах тегумента протекают процессы, связанные с избирательным активным поглощением веществ, поскольку АТФ-азная активность, как это было показано в нашей предыдущей работе (Виноградов и др., 1982), выявляется лишь в тегументе.

Субтегументальные клетки *T. nodulosus* реагируют на повышение тоничности среды уменьшением размеров и значительным развитием гранулярного эндоплазматического ретикулума с большим количеством рибосом, что указывает на активацию синтетической деятельности в этих клетках. Вероятно, высокая проницаемость клеточных мембран для воды и отсутствие механизмов, способных эффективно удалять против градиента концентрации избыток электролитов, не позволяет *T. nodulosus* переносить соленость выше 10‰.

Размеры субтегументальных клеток *E. rugosum* в гипертонической среде изменяются незначительно. Состояние субтегументальных клеток характеризуется в первую очередь очень сильным развитием гранулярного эндоплазматического ретикулума и, вероятно, свидетельствует в пользу того, что поддержание ионного и осмотического гомеостаза в гипертонической среде, так же как и у многих свободноживущих форм, осуществляется благодаря активности транспорта натрия против градиента концентрации.

Регуляция объема у свободноживущих форм пойкилоосмотических беспозвоночных осуществляется в основном за счет регуляции внутриклеточного содержания продуктов белкового метаболизма и главным образом аминокислот и таурина (Lange, 1968; Хлебович, 1974). В гипотонической среде происходит снижение внутриклеточной концентрации низкомолекулярных органических соединений, а в гипертонической — увеличение их концентрации.

Этот механизм внутриклеточной осмотической регуляции обеспечивает поддержание относительного постоянства концентрации неорганических ионов. У *T. nodulosus* компенсаторная фаза адаптации к гипотонической среде связана с процессом нормализации объема субтегументальных клеток, а у *E. rugosum* — межклеточных пространств. Вероятно, изменения, наблюдаемые в структуре субтегументальных клеток в этот период акклимации, связаны с регуляцией уровня содержания низкомолекулярных органических соединений. Однако остается невыясненным благодаря каким механизмам удаляется избыточная жидкость у цестод в период нормализации их веса. Мы полагаем, что восстановление оптимального объема после его первоначального отклонения от нормы у *T. nodulosus* и *E. rugosum* связано со способностью тегумента создавать гидростатическое давление, направленное внутрь в гипотонической среде и наружу в гипертонической. Вслед за снижением или выравниванием осмотических концентраций между внутренней и наружной средой на первом этапе акклимации происходит вытеснение или насыщение жидкости через легкопроницаемый тегумент и базальную пластинку. Очевидно, это связано с упругими свойствами покровов и прежде всего со способностью тегумента нормализовать свои размеры после снятия деформирующих сил.

Характер структурных изменений в тканях, связанных с осморегуляцией, у паразитических и свободноживущих организмов имеет много сходных черт, что указывает на общность их реакции на изменение тоничности среды (Berridge, Oschman, 1972; Kessel, Beams, 1962; Shirai, Utida, 1970; Ozirskaya, Natochin, 1975).

Л и т е р а т у р а

- Виноградов Г. А., Давыдов В. Г., Куперман Б. И. Морфофизиологические особенности водно-солевого обмена у некоторых псевдофиллидных цестод. — Паразитология, 1982, т. 16, вып. 3, с. 188—193.
- Давыдов О. Н. К осмотической регуляции у некоторых цестод рыб. — Гидробиол. журн., 1975, т. 11, № 4, с. 75—79.

- Марков Г. С. Физиология паразитов рыб. — В кн.: Основные проблемы паразитологии рыб. ЛГУ, 1958, с. 122—143.
- Хлебович В. В. Критическая соленость биологических процессов. Л., Наука, 1974. 235 с.
- Хлебович В. В., Михайлова О. Ю. Осмотическая толерантность и адаптация к гипотоническому воздействию у *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala, Echinorhynchidae). — Паразитология, 1976, т. 10, вып. 5, с. 444—448.
- Berridge M., Oschman J. Transporting epithelia. New York, London. Acad. Press., 1972. 91 p.
- Kessel H., Beaams J. Electron microscopic studies on the gill filaments of *Fundulus heteroclitus* from the sea water and fresh water with special reference to the ultrastructure organisation of the «chloride cells». — J. Ultrastructure Res., 1962, N 4, p. 77—87.
- Langé R. Isoosmotic intercellular regulation. — Nytt. mag. zool., 1968, vol. 16, N 1, p. 1—13.
- Ozirskaia E. V., Natochin Yu. V. Membrane structures of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) nephron cells during magnesium secretion. — Experientia, 1975, N 31, p. 972—973.
- Shirai S., Utida S. Development and degeneration of the chloride cell during sea water and fresh water adaptation of the Japanese eel. — Z. Zellforsch., 1970, N 103, p. 247—264.
- Smyth J. D. The physiology of Cestodes. — Freeman. San Francisco, 1969, 280 p.

MORPHOPHYSIOLOGICAL INVESTIGATION OF ADAPTATION
MECHANISMS TO VARIOUS SALINITIES IN PSEUDOPHYLLIDEAN CESTODES

G. A. Vinogradov, V. G. Davydov, B. I. Kuperman

S U M M A R Y

Mechanisms of adaptation to various salinities in cestodes *Triaenophorus nodulosus* and *Eubothrium rugosum*, parasites of freshwater fishes, were studied. It was shown that the outer cytoplasm of tegument of these cestodes is unpermeable for water. Its entrance occurs through isolated canals in the tegument first discovered during ultrastructural investigation. Volume regulation of *T. nodulosus* is accomplished due to changing of volumes of subtegumental cells, while that of *E. rugosum* due to changing of the intercellular space. The subtegumental cells of *E. rugosum* are permeable for water and salts to a lesser extent than those of *T. nodulosus*.

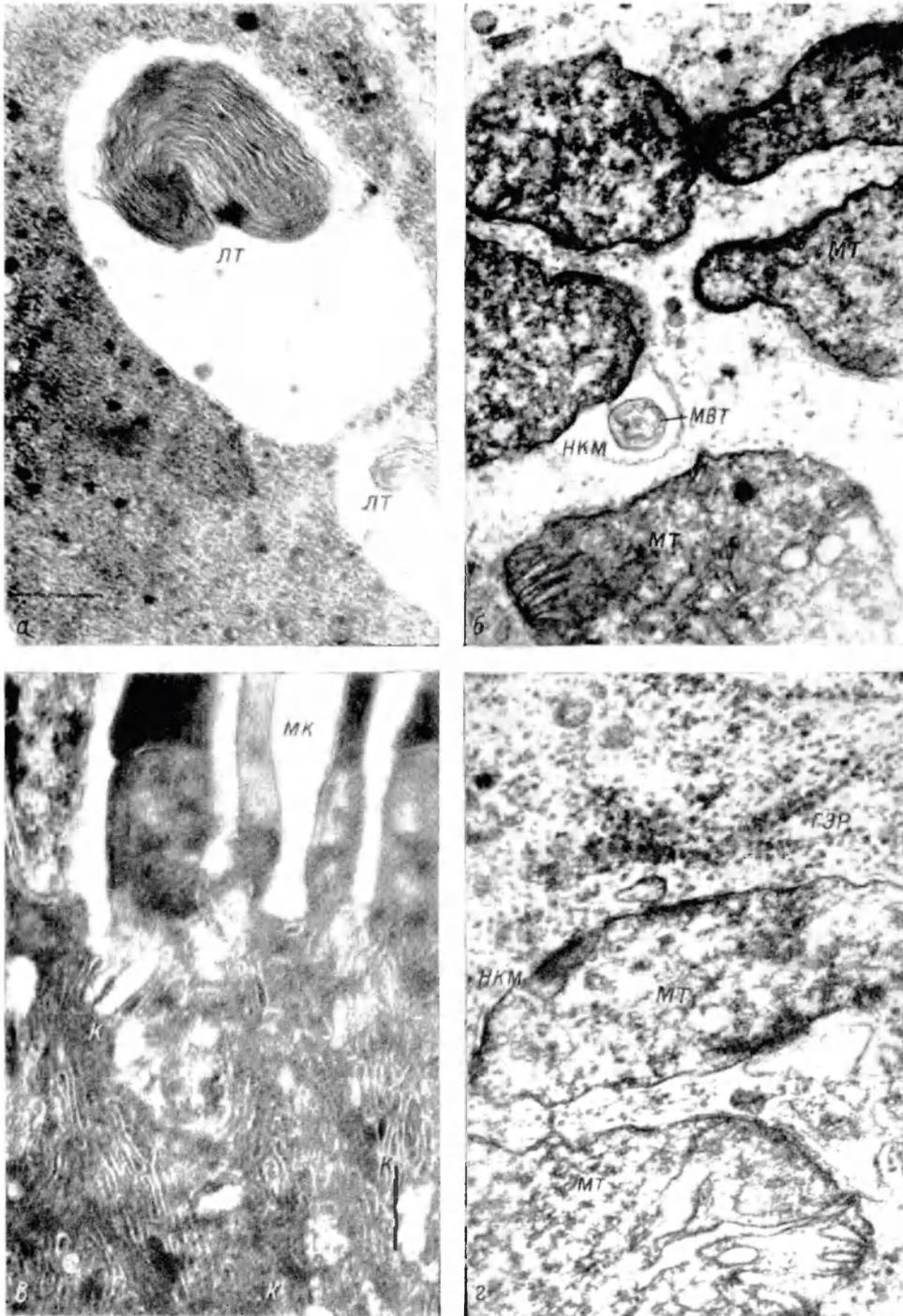


Рис. 4. Изменения в ультраструктуре покровов *Trienophorus nodulosus* при действии различных концентраций солей.

а — крупные ламеллярные тельца в тегументе в средах с низкими концентрациями солей ($40\ 000\times$), б — изменения в структуре митохондрий субтегументальных клеток в средах с низкими концентрациями солей ($45\ 000\times$), в — каналцы в тегументе при длительной экспозиции в средах с высокой концентрацией солей ($65\ 000\times$), г — изменения цитоплазмы субтегументальных клеток в средах с высокой концентрацией солей ($65\ 000\times$). ГЭР — гранулярный эндоплазматический ретикулум, К — каналцы в тегументе, ЛТ — ламеллярные тельца, МВТ — мультивезикулярное тельце, МК — микротрихии, МТ — митохондрии, НКМ — наружная камера митохондрий.

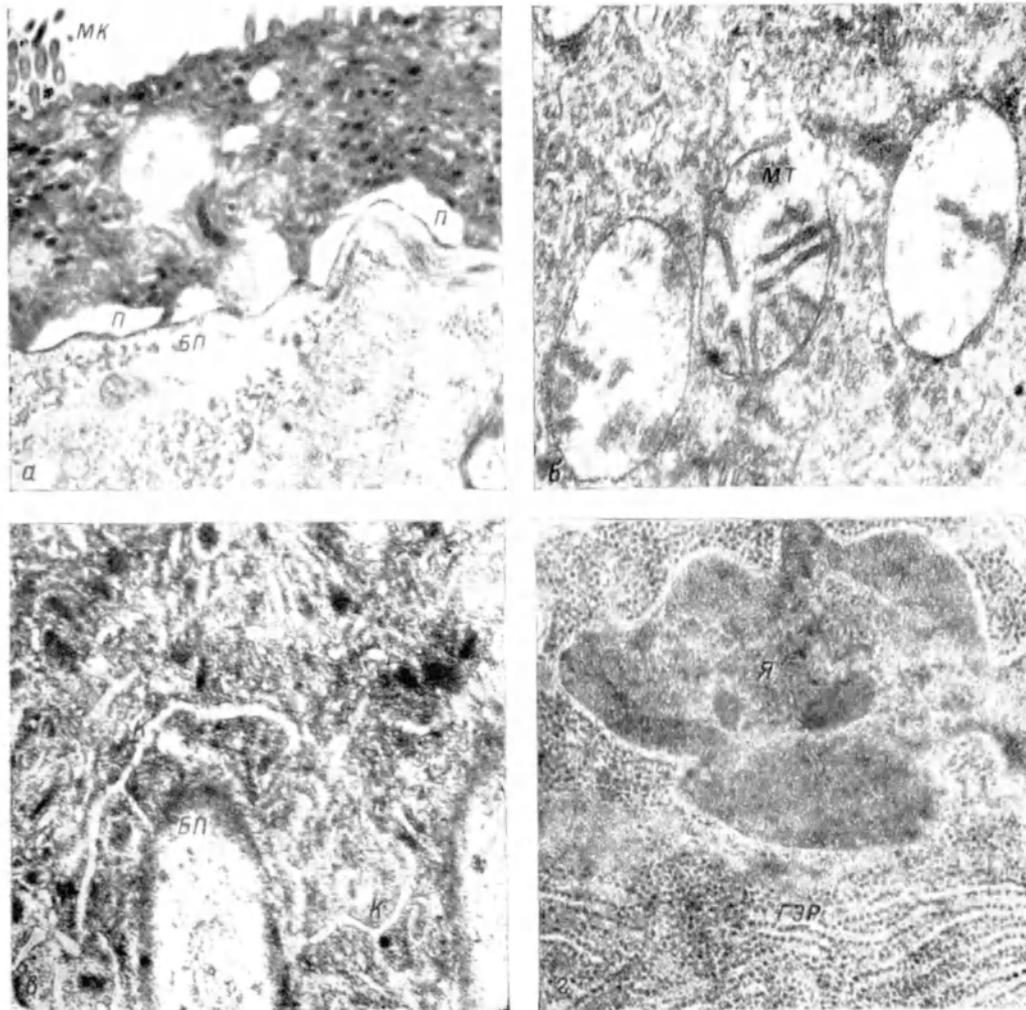


Рис. 5. Изменения в ультраструктуре покровов *Eubothrium rugosum* в средах с различными концентрациями солей.

а — образование полостей в тегументе при действии низких концентраций солей (20 000^г), *б* — изменения структуры митохондрий в тегументе при действии высоких концентраций солей (60 000^г), *в* — многочисленные каналцы в тегументе при продолжительном действии высоких концентраций солей (65 000^г), *г* — гранулярный эндоплазматический ретикулум в цитоплазме субтегументальных клеток при действии высоких концентраций солей, *БП* — базальная пластинка, *П* — полости, *Я* — ядро.
Остальные обозначения те же, что на рис. 4.