

© А. А. Максимович, В. П. Гнубкина, 2012
УДК 612.843:[612.014.426+612.014.44]:597.553.2

А. А. Максимович и В. П. Гнубкина

РЕАКЦИЯ СЕТЧАТКИ МОЛОДИ СИМЫ (*ONCORHYNCHUS MASOU*) НА СЛАБОЕ МАГНИТНОЕ ПОЛЕ И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

Лаборатория физиологии (зав. — канд. биол. наук С. Л. Кондрашев), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН», г. Владивосток

На воздействие ультрафиолетовым излучением (УФИ) в различных комбинациях с постоянным магнитным полем (МП) (80 Гс) на фоторецепторы сетчатки 6-месячной молоди тихоокеанского лосося (*Oncorhynchus masou*) отвечали особым, ранее не описанным образом. После 2-часового воздействия УФИ (1-й эксперимент) пигментный индекс (ПИ) ретиномоторной реакции возрастал с $0,30 \pm 0,10$ до $1,31 \pm 0,20$. Палочки находились в пигментном слое, а колбочки были экранированы пигментом только частично. В целом сетчатка демонстрировала сумеречную (мезопическую) реакцию. После 2-часового воздействия УФИ и последующего 2-часового воздействия МП постоянного магнита (2-й эксперимент) ПИ возрастал до $2,08 \pm 0,10$, увеличивалась средняя высота миоидов и средний диаметр двойных колбочек. Сетчатка демонстрировала фотопическую реакцию. В 3-м эксперименте (2 ч МП, затем 2 ч УФИ) значение ПИ было минимальным — $1,28 \pm 0,12$. Средняя высота миоидов снижена, средний диаметр колбочек не изменен. Реакция сетчатки была скотопической (как в условиях темноты). На основании собственных результатов и данных литературы авторы пришли к выводу, что МП искажает влияние УФИ и приводит к необычным реакциям сетчатки. Полученные результаты подтверждают предложенный нами ранее вариант модели светозависимой магниторецепции у позвоночных.

Ключевые слова: сетчатка глаза рыб, ретиномоторная реакция, светозависимая магниторецепция, магнитное поле, тихоокеанские лосося

Изучение ориентации животных, особенно птиц, во время миграции показало, что зрительная система и геомагнитное поле связаны. При исследованиях, выполненных на человеке, также было обнаружено влияние геомагнитного поля на светочувствительность его зрительной системы [15]. Таким образом, модели светозависимой магниторецепции получают все больше экспериментальных подтверждений [14]. Они характеризуются взаимодействием магнитного поля с теми или иными магнитными частицами, локализованными в пигментном эпителии (ПЭ) и возбужденными состояниями молекул зрительного пигмента фоторецепторов. Такие исследования, выполненные на рыбах, очень редки, хотя особенно актуальны для лососей.

Наши исследования светозависимой магниторецепции у рыб касались изучения ретиномоторной реакции (РМР) на изменение слабых магнитных полей (в том числе геомагнитного поля). Они проводились на фоне различающихся условий освещения: полная темнота (скотопические условия), полный свет (фотопические условия), сумерки (мезопические условия) [4, 5], а также в комбинации с красным светом [2]. Цель

настоящей работы — исследование РМР у молоди лососей при различных комбинациях действия слабого магнитного поля и ультрафиолетового (УФ) излучения.

Материал и методы. В экспериментах использовали дикую молодь симы (*Oncorhynchus masou*) 6-месячного возраста (длина по Смиту — 9–11 см, масса — 8–10 г), которая была выловлена в р. Барабашевка (Южное Приморье). В течение нескольких суток до начала экспериментов рыб содержали в пресноводном аквариуме с оборотным водоснабжением.

Первый эксперимент. После 2-часовой адаптации к полной темноте в 13 ч группу молоди помещали в отдельный аквариум с пресной водой (температура воды 15 °С) и вносили УФ-лампу со светофильтрами, отсекающими видимую часть спектра. Лампу помещали над открытым сверху аквариумом на расстоянии 1 м, эксперимент продолжался 2 ч. Использовали УФ-лампу tube В-15,1, 220 В, 50 Гц, 0,3 А (Medicolor, Венгрия).

Второй эксперимент. Аквариум с адаптированными к темноте рыбами в течение 2 ч держали под УФ-лампой, а затем помещали в поле постоянного магнита на 2 ч в полной темноте. Использовали подковообразный магнит с напряженностью поля у полюсов 80 Гс, высота бруска магнита — 50 мм, расстояние между полюсами — 40 мм. Магнит на время эксперимента крепили внутри аквариума с рыбами.

Третий эксперимент. Адаптированных к полной темноте рыб помещали на 2 ч в поле постоянного магнита. Затем на

Сведения об авторах:

Максимович Александр Александрович (e-mail: olmaxoy2008@mail.ru), Гнубкина Валентина Петровна, лаборатория физиологии, ФГБУН «Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН», 690059 Владивосток, ул. Пальчевского, 17

2 ч вносили УФ-лампу. Эксперименты выполняли в хорошо аэрируемых аквариумах цилиндрической формы диаметром 24 см, высота слоя воды — 36 см. После каждого эксперимента рыб анестезировали в 0,008% растворе MS-222 в течение 2 мин в темноте. В качестве контроля использовали молодь симы после 2-часовой адаптации к полной темноте. Время адаптации в течение 2 ч считается достаточным для того, чтобы пигмент в ПЭ занял место вблизи тел пигментоцитов, а фоторецепторы (палочки и колбочки) заняли позицию между наружной пограничной мембраной и слоем ПЭ [6]. Энуклеированные глаза фиксировали в 2% параформ-глутаральдегиде на холоде в течение нескольких суток, затем дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия. Отмывали от фиксатора в 0,2 М какодилатном буфере, вырезали вентральный участок сетчатки, промывали, обезвоживали и заключали в смесь эпона—аралдита. Полутонкие (толщиной 1 мкм) срезы сетчатки получали на ультрамикротоме (Ultracut E, Reichert, Германия), окрашивали метиленовым синим, заключали в канадский бальзам, изучали и фотографировали, используя световой микроскоп ВН-2 (Olympus, Япония). Морфометрические исследования выполняли как на препаратах, так и на фотографиях. Пигментный индекс (ПИ) РМР рассчитывали по формуле $PI = P/T$, где P — толщина слоя пигмента на сагиттальных срезах сетчатки, T — толщина слоя палочек и колбочек от наружной пограничной мембраны до слоя пигмента. Статистическую обработку результатов измерений проводили в выборке от 5 рыб в каждом эксперименте на 10 срезах каждого глаза, по 10 измерений на каждом срезе. Всего в работе использовали 40 особей молоди симы.

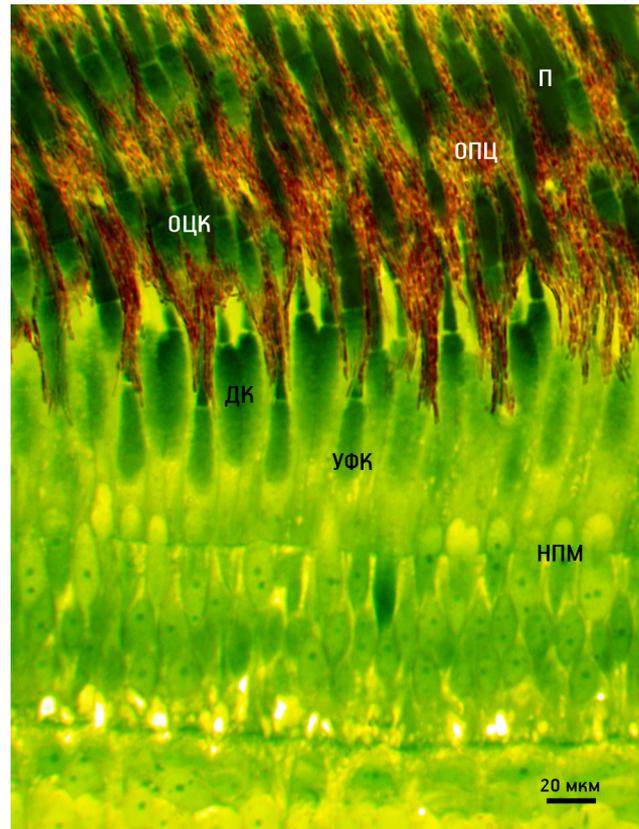
Результаты исследования. В контроле ПИ РМР сетчатки составлял $0,30 \pm 0,10$. Пигмент находился в гранулярном состоянии.

У адаптированных к темноте особей симы после 2-часового воздействия УФ-излучением ПИ реакции сетчатки возрастал до $1,31 \pm 0,20$. Пигмент в ПЭ находился в двух состояниях — гранулярном в телах пигментоцитов и палочковидном в их отростках. Средняя высота миоидов фоторецепторов равнялась $7,50 \pm 0,21$ мкм, средний диаметр двойных колбочек — $2,51 \pm 0,10$ мкм. Их наружные сегменты только частично были экранированы пигментом пигментоцитов. В наружном ядерном слое сетчатки присутствовали крупные овальные ядра колбочковых нейронов, между ними располагались более многочисленные мелкие ядра палочковых нейронов. Реакция на УФ-излучение соответствовала мезопическим условиям освещения.

После 2-часового воздействия УФ-излучением и магнитным полем на сетчатку адаптированных к темноте особей молоди симы (второй эксперимент) ПИ возрастал до $2,08 \pm 0,10$. Реакция соответствовала фотопическим условиям освещения. Высота миоидов фоторецепторов составляла $10,50 \pm 0,10$ мкм, а диаметр двойных колбочек — $6,31 \pm 0,20$ мкм. Пигмент находился в двух состояниях — гранулярном в телах пигментоцитов и палочковидном в их отростках (рисунки).

После 2-часового воздействия магнитным полем и затем 2-часового УФ-облучения (третий эксперимент) пигмент был в основном палочковидным, он не прикрывал фоторецепторы, располагаясь в телах пигментоцитов и частично в их отростках. Значение ПИ в этом эксперименте оказалось минимальным — $1,28 \pm 0,12$. Высота миоидов составляла $4,40 \pm 0,10$ мкм, что значительно меньше предыдущих значений, диаметр колбочек равнялся $6,10 \pm 0,15$ мкм. Ядра фоторецепторных клеток в наружном ядерном слое были все округлые и одинакового размера. Реакция сетчатки соответствовала ее адаптации к темноте с некоторыми особенностями, связанными с реакцией пигмента на магнитное поле.

Обсуждение полученных данных. Большинство исследований показывают, что лососевые рыбы имеют колбочковые нейроны для восприятия УФ-света до возраста скатывания (смолты), но по мере того как рыбы растут, эти клетки постепенно исчезают [10, 12, 13]. На ранних этапах жизни диета лососевых состоит



Сагиттальный срез сетчатки молоди лосося после воздействия ультрафиолетовым излучением и магнитным полем.

Пигмент палочковидной формы находится в отростках пигментоцитов (ОПЦ) между сегментами фоторецепторов; П — палочки; ОЦК — одиночные центральные колбочки; ДК — двойные колбочки; УФК — ультрафиолетовые колбочки; НПМ — наружная пограничная мембрана. Окраска метиленовым синим.

из зоопланктона и других мелких организмов, которые отражают УФ, но по мере того как рыбы становятся больше, они переходят на другую пищу. Это считается главной причиной, почему у рыб свыше 2-летнего возраста УФ-рецепторы не обнаруживаются [8, 9]. Одиночные колбочковые нейроны у гавайских рифовых рыб на основании изучения зрительных пигментов были классифицированы в зависимости от значений λ_{\max} как УФ- (347–376 нм), фиолетово- (398–431 нм) или сине- (439–498 нм) чувствительные. Восемь видов рыб обладали УФ-чувствительными колбочковыми нейронами, а 14 видов — фиолетово-чувствительными. Таким образом, 47% исследованных видов демонстрировали фоточувствительность в коротковолновой области спектра.

Мы идентифицировали четыре типа фоторецепторных клеток в сетчатке исследованных нами рыб: палочковые нейроны, одиночные колбочковые, двойные колбочковые и УФ-колбочковые, причем двойные колбочковые нейроны преобладали над колбочковыми с одним наружным сегментом [2]. Вероятно, такое соотношение требуется для повышения контрастности зрения в мутной водной среде или в рано наступающих сумерках. Мы обнаружили, что на изменяющиеся условия реагируют не только УФ-колбочковые нейроны, но и другие фоторецепторы, о чем свидетельствуют меняющийся показатель высоты миоидов и диаметр колбочек, а также изменения в наружном ядерном слое. По литературным данным, миоиды фоторецепторов при дневном освещении максимально малы, так как колбочки приближаются к наружной пограничной мембране, занимая эту позицию при реакции на свет [1, 7]. В данном случае все наоборот, миоиды необычно высокие. Расположение пигмента не соответствует норме. В третьем эксперименте ядра фоторецепторных клеток — одинакового размера и формы. По данным М. А. Али [6], ядра колбочковых нейронов, как правило, крупнее, а пигмент в ПЭ, как правило, — гранулярный или дисперсный. В наших экспериментах он в отростках пигментоцитов всегда палочковидный, что наводит на мысль о реакции меланина (он слипается в палочковидную форму в постоянном магнитном поле). Мы предполагаем, что такая форма пигмента — ответ на магнитное поле. Одним из механизмов регуляции чувствительности сетчатки является РМР — перемещение палочек и колбочек, а гранул пигмента в отростки пигментоцитов, относительно друг друга и наружной пограничной мембраны сетчатки. Чем шире диапазон освещенности, тем быстрее происходит РМР, которая зависит также от температуры и продолжительности предвари-

тельной адаптации к условиям освещения и биологических ритмов животного [3, 11]. Поэтому в нашей работе мы использовали рыб одного возраста, а эксперименты выполняли в одно и то же время суток (в 13 ч), поскольку М. А. Али [7] показал на ювенильных атлантических лососях (*Salmo salar*), что кривая биоритма РМР, возрастающая в утренние часы, в течение суток колеблется с очень малой амплитудой. Наблюдается адаптация РМР, которая заключается в том, что если условия освещения не меняются, РМР, достигнув определенного значения, не изменяется до тех пор, пока не поменяются условия освещения. В первом эксперименте после воздействия только УФ-излучения состояние сетчатки характеризовалось ПИ, равным $1,31 \pm 0,20$. Это низкое значение было очевидным ответом на малую освещенность, подобную сумеркам или ранним утренним часам. Фоторецепторные нейроны располагались на некотором расстоянии от наружной пограничной мембраны, а их миоиды были удлинены так, что наружные сегменты фоторецепторных нейронов погружались в ПЭ. Если судить по реакции сетчатки, на УФ реагируют не только дополнительные (УФ) колбочковые нейроны, специализированные к восприятию УФ-излучения, но и двойные, и центральные колбочковые нейроны, которые изменяют свои параметры в ответ на УФ. Физиологически, по-видимому, сетчатка воспринимает УФ-излучение как незначительное дневное освещение. Поэтому можно предположить, что, поскольку после воздействия на молодую симы УФ-излучением, а затем полем постоянного магнита, сетчатка отвечала увеличением значения ПИ до $2,08 \pm 0,10$, т.е. мы наблюдали реакцию, как на дневное освещение. Ранее нами было показано, что сетчатка на измененное магнитное поле отвечает так же, как на небольшое освещение [1]. Поэтому в данном случае воздействие на сетчатку магнитным полем и УФ складывается. Морфологически же это не совсем обычная картина. Миоиды обычных палочковых и колбочковых нейронов, ответственных за спектральный диапазон 500–700 нм, еще больше вытягивались к ПЭ, что противоречит типичной реакции на свет. При воздействии на фоторецепторы света миоиды колбочковых нейронов укорачиваются, в результате они приближаются к наружной пограничной мембране, а миоиды палочковых нейронов значительно удлиняются, и палочки уходят под защиту ПЭ [7]. Можно предположить, что названные фоторецепторные клетки компенсируют удлинением миоидов реакцию ПЭ на неадекватное действие «светового» раздражителя в условиях влияния магнитного поля, в качестве которого

выступает УФ. Фоторецепторные клетки в данном случае достигают правильного положения по отношению к ПЭ, значительно удлиняя миоиды. Наружные сегменты палочковых нейронов прикрыты пигментом. Связь ПЭ и фоторецепторных нейронов в данном случае хорошо прослеживается. При обратном порядке предъявления стимулов сначала магнитное поле, а затем УФ, количественного ответа сетчатки практически не последовало ($PI=1,28\pm 0,12$). Возможно, такое сочетание магнитного поля и коротковолнового излучения воспринимается как пороговое, либо действие УФ-излучения и магнитного поля взаимно компенсируют друг друга, что не воспринимается зрительной системой или ощущается как очень слабый свет в 1–2 лк. Об этом свидетельствует тот факт, что даже в условиях укороченных миоидов размерные параметры колбочковых нейронов не изменяются, что говорит об их нормальном состоянии [1]. Ранее мы изучали РМР молоди лососей на действие магнитного поля и красного света и их сочетания [2]. Было установлено, что при действии только красным светом реакция сетчатки, как и в случае с УФ в настоящей работе, была мезопическая, а комбинация красный свет и магнитное поле вызывала суммирование этих двух влияний. После адаптации рыб к магнитному полю в темноте, а затем к красному свету (т.е. в обратном порядке) отчетливая реакция сетчатки отсутствовала. Из этих результатов, на наш взгляд, следует, что экспозиция воздействия магнитным полем влияла на взаимодействие ПЭ и фоторецепторов после применения как коротковолнового (УФ), так и длинноволнового (красный свет) излучений, усиливая реакцию сетчатки до степени фотопической, а при обратном порядке предъявления стимулов реакция отсутствовала. Мы пришли к выводу, что магнитное поле изменяет влияние УФ-излучения, что приводит в этих условиях к необычным реакциям сетчатки. В целом, полученные результаты подтверждают предложенный нами ранее [4] вариант модели светозависимой магниторецепции у позвоночных. Поскольку в реакции участвуют не только УФ-колбочки, но и все фоторецепторы отвечают тем или иным способом, видимо, ответ сетчатки на невидимую часть спектра и на магнитное поле является реакцией на их электромагнитную, волновую составляющую. Нужно заметить, что реакция слоя палочек и колбочек и наружного ядерного слоя сетчатки молоди симы на измененное магнитное поле идентична как при условии длинноволнового излучения — красный свет, так и при коротковолновой экспозиции — УФ-излучения. Поскольку мы доказали существование «механи-

ческой» реакции сетчатки — движение фоторецепторов и пигмента в отростках пигментцитов на воздействие постоянным магнитным полем, теперь и на УФ-излучение, можно предполагать наличие физиологических, химических процессов, позволяющих приблизиться к разгадке проблемы ориентации лососей, в частности, по магнитному полю.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гнубкина В. П. и Максимович А. А. Ретиномоторная реакция сетчатки молоди кеты (*Oncorhynchus keta*) при адаптации к свету и постоянному магнитному полю. Морфология, 2007, т. 132, вып. 5, с. 43–47.
2. Загальская Е. О., Гнубкина В. П. и Максимович А. А. Морфологические изменения в сетчатке молоди симы (*Oncorhynchus masou*) при экспериментальном изменении магнитного поля. Морфология, 2004, т. 125, вып. 2, с. 47–51.
3. Загальская Е. О., Гнубкина В. П. и Максимович А. А. Морфологические особенности ретиномоторной реакции у молоди симы (*Oncorhynchus masou*) в магнитном поле и красном свете. Морфология, 2004, т. 126, вып. 6, с. 32–36.
4. Максимович А. А. и Загальская Е. О. Влияние слабых магнитных полей на фоторецепторы сетчатки рыб. Биофизика, 2007, т. 52, № 5, с. 916–923.
5. Максимович А. А., Кондрашев С. Л. и Гнубкина В. П. Морфологические изменения в сетчатке молоди тихоокеанских лососей (*Oncorhynchus masou*) в ответ на компенсацию геомагнитного поля в условиях нормального освещения. Морфология, 2007, т. 132, № 4, с. 44–51.
6. Ali M. A. Les réponses retinomotrices caracteres et mechanisms. Vision Res., 1958, v. 11, p. 1225–1288.
7. Ali M. A. Histophysiological studies on the juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) retina. Responses to light intensities, wavelengths, temperatures and continuous light or dark. Can. J. Zool., 1961, v. 39, p. 511–526.
8. Beaudet L., Flamarique I. N. and Hawryshyn C. W. Cone photoreceptor topography in the retina of sexually mature Pacific salmonid fishes. J. Comp. Neurol., 1997, v. 383, p. 49–59.
9. Bowmaker J. K. and Kunz Y. W. Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in the brown trout (*Salmo trutta*): age-dependent changes. Vision Res., 1987, v. 27, p. 2101–2108.
10. Deutschlander M. E., Greaves D. K., Haimberger T. J. and Hawryshyn C. W. Functional mapping of ultraviolet photosensitivity during metamorphic transitions in a salmonid fish (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exper. Biol., 2001, v. 204, p. 2401–2413.
11. Douglas R. H. and Wagner H. J. Endogenous patterns of photomechanical movements in teleost: their relation to activity rhythms. Cell Tissue Res., 1982, v. 226, p. 133–144.
12. Flamarique I. N. Partial re-incorporation of corner cones in the retina of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). Vision Res., 2002, v. 42, № 25, p. 2737–2745.
13. Flamarique I. N. and Hawryshyn C. W. Retinal development and visual sensitivity of young Pacific sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). J. Exp. Biol., 1996, v. 199, p. 869–882.
14. Johnsen S., Mattem E. and Ritz T. Light-dependent magnetoreception: quantum catches and opponency mechanisms of

possible sensitive molecules. *J. Exp. Biol.*, 2007, v. 210, № 18, p. 3171–3178.

15. Thoss F. and Bartsch B. The geomagnetic field influences the sensitivity of our eyes. *Vision Res.*, 2007, v. 47, № 8, p. 1036–1041.

Поступила в редакцию 17.02.2012
Получена после доработки 17.05.2012

RESPONSE OF THE RETINA OF PACIFIC SALMON FRY TO MAGNETIC FIELD AND ULTRAVIOLET RADIATION

A. A. Maksimovich and V. P. Gniubkina

Retinal photoreceptors of six-month-old Pacific salmon fry (*Oncorhynchus masou*) (masu salmon) were found to respond to the ultraviolet radiation (UVR) in different combinations with constant magnetic field (MF) (80 G) in a special, previously undescribed manner. After exposure to UVR for 2 hours (1st experiment) the pigment index (PI) of retinomotor response increased from 0.30 ± 0.10 to 1.31 ± 0.20 . The rods were located within the

pigment layer, while cones, including double ones, were only partially screened with pigment. The whole retina demonstrated twilight (mesopic) response. After exposure to UVR for 2 hours and subsequent 2 hours-long exposure to MF (2nd experiment), PI rose to 2.08 ± 0.10 , while an average myoid height, and an average double cone diameter were increased. The whole retina demonstrated photopic response. In the 3rd experiment (2 hours of MF exposure, followed by 2 hours of a UVR exposure) value was minimal — 1.28 ± 0.12 . Average myoid height was decreased, while an average cone diameter was unchanged. The whole retina response was scotopic (as under conditions of darkness). On the basis of authors' own results and the data from the literature, the conclusion is drawn that MF distorts influence of UVR, resulting in the unusual responses of the retina. The results obtained confirm the previously proposed variant of light-dependent magnetoreception model in the vertebrates.

Key words: *fish retina, retinomotor response, light-dependent magnetoreception, magnetic field, Pacific salmon*

Laboratory of Physiology, A. V. Zhirmunskiy Institute of Marine Biology, RAS Far-Eastern Section, Vladivostok