

УДК 597.555.5 : 577.1 (045)

Особенности распределения и химического состава слизистых клеток в эпидермисе атлантической трески *Gadus morhua* L.

Е.А. Козыренко¹, О. Оттесен², А. Амин²

¹ Биологический факультет МГТУ, кафедра биоэкологии

² Факультет биологических наук и аквакультуры, Университетский колледж г. Будо, Норвегия

Аннотация. В данной работе рассмотрено строение, химический состав и расположение слизистых клеток в эпидермисе атлантической трески *Gadus morhua* L. в возрасте 5 месяцев, 1 года и полутора лет. Морфологическая характеристика слизистых клеток дана на основе трансмиссивной электронной микроскопии. С помощью различных красителей определен химический состав содержимого клеток. Строение и расположение слизистых клеток свидетельствуют об их секреторной функции. Химический состав клеток отражает особенности экологии трески как эпибентосно-пелагического вида.

Abstract. Morphological, chemical structure and mucous cells distribution in the epidermis of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. have been studied in the given work. The studied fish were at the age of 5 month, 1 and 1.5 years old. Morphological characteristic of mucous cells has been given based on transmission electron microscope. Chemical composition of the cells has been investigated with different stains. Mucous cells structure and distribution illustrate their secretory function. The chemical composition reflects Atlantic cod ecology as an epibenthic-pelagic species.

Ключевые слова: слизистые клетки, эпидермис, атлантическая треска, секреторный материал
Key words: mucous cells, epidermis, Atlantic cod, secretory material

1. Введение

Атлантическая треска на протяжении многих десятилетий является ценным промысловым объектом в странах североатлантического региона, а с конца XX века начало активно развиваться и искусственное выращивание данного вида рыб. Ввиду активного промышленного освоения северных районов, в том числе Арктического, вопрос сохранения и изучения биоразнообразия остается крайне актуальным.

Кожные покровы, являясь защитным барьером организма рыб от внешнего воздействия, представляют большой интерес для оценки состояния здоровья рыб и влияния негативных факторов окружающей среды.

Эпидермис рыб не кератинизирован, за исключением некоторых видов, по сравнению с высшими позвоночными (Whitear, 1986). Защитная функция кератина у рыб частично компенсируется выделением слизи на поверхность эпидермиса (Mittal, Banerjee, 1980). Слизистые клетки свойственны большинству животных. Они встречаются во внутреннем эпителии рыб и других позвоночных и секретируют слизь на поверхность кожи (Whitear, 1986).

Регулярная секреция и отторжение слизи защищают рыб от паразитов и губительных бактерий, а разные антипатогенные вещества, такие как иммуноглобулины, комплементы, лизозимы, С-реактивный белок, антибактериальные пептиды, протеазы, лектин и гемолизин могут способствовать защите (Ellis, 2001). Во многих случаях защитная функция слизи может быть отнесена к одним из его компонентов – мукополисахаридам (Ingram, 1980). Выделения слизистых клеток некоторых видов рыб содержат также феромоны, которые обеспечивают химическое взаимодействие между индивидами (Bullock, Roberts, 1974). Более того, слизистый слой уменьшает трение тела о воду (Rosen, Cornford, 1971), защищает от абразивных повреждений (Whitear, 1986) и делает захват рыбы более сложным для хищников (Bullock, Roberts, 1974).

Продуктами секреции слизистых клеток преимущественно являются гликопротеины (Harris et al., 1973), среди которых выделяют нейтральные, карбоксилированные, содержащие сиаловую и гиалуроновую кислоты, и сульфомуцины, содержащие сиаловую кислоту и сульфаты (Bancroft et al., 1994).

Цель данного исследования – изучить особенности строения и распределения слизистых клеток в эпидермисе атлантической трески, а также выявить их химический состав.

2. Материалы и методы

Объектом исследования являлась атлантическая треска. В работе анализировалась кожа трески в возрасте 5 месяцев, 1 года и 1.5 года. Рыбы были анестезированы в растворе MS-222 и убиты быстрым ударом в голову. Затем с определенных участков на теле были взяты кусочки кожи рыб и зафиксированы для световой и электронной микроскопии.

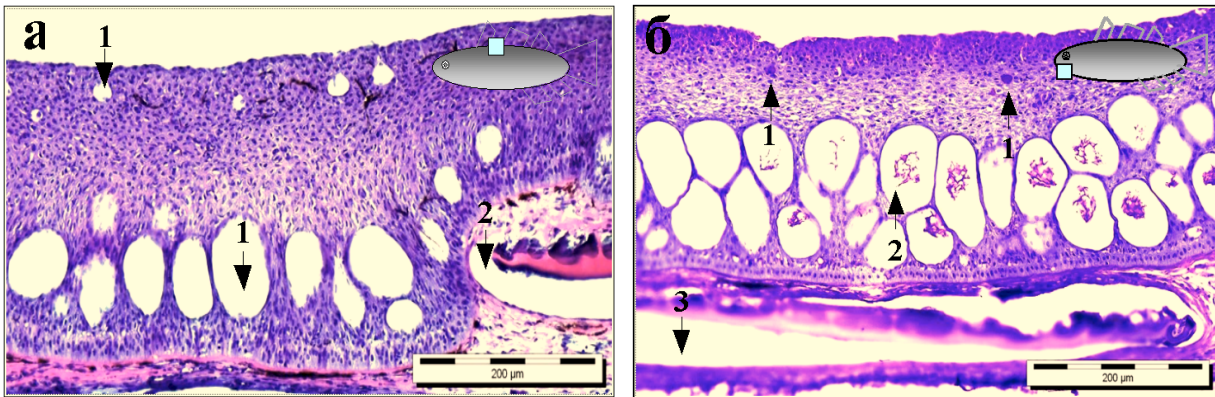


Рис. 1. Эпидермис молоди атлантической трески. Возраст: 1.5 года. (а) Окраска гематоксилином-эозином не выявила слизистых клеток; 1 – мешковидная клетка; 2 – чешуйный карман; (б) окраска Шик-реакцией; 1 – слизистая клетка; 2 – мешковидная клетка; 3 – чешуйный карман

Ультратонкие (70-75 нм) срезы для трансмиссивной электронной микроскопии (ТЭМ) были окрашены с помощью уранил-ацетата. Полутонкие (250-300 нм) срезы для световой микроскопии были окрашены с помощью толуидинового синего. Срезы для световой микроскопии (3 мкм) были окрашены с помощью гематоксилина и эозина, альцианового синего с разными рН, реакции Шиффа с периодной кислотой (Шик-реакция), основного коричневого и высоко-железного диамина.

Фотографии полутонких и тонких срезов были сделаны при помощи цифровой фотокамеры Olympus DP71 (Olympus, Tokyo, Japan), соединенной с микроскопом Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan). Анализ ультратонких срезов и их фотографии были сделаны на трансмиссивном электронном микроскопе JEOL JEM-1010 (JEOL, Peabody, MA, USA).

С использованием программы Cell[^]V (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany) было определено число слизистых клеток в эпидермисе исследовавшихся рыб. Для этого в каждом срезе вдоль эпидермиса были случайно выбраны три области длиной около 400 мкм, на которых было посчитано среднее число этих клеток.

3. Результаты и обсуждение

Слизистые клетки были обнаружены в коже молоди трески всех изученных возрастов. Форма клеток была круглой или овальной, а их наибольшая длина составляла около 10 мкм. Слизистые клетки встречались преимущественно в верхней 1/3 части эпидермиса (рис. 1б), хотя отдельные клетки были обнаружены в средней и нижней 1/3 частях.

Окрашивание гематоксилином-эозином не выявило этих клеток (рис. 1а), в то время как Шик-реакция окрасила их в пурпурный цвет (рис. 1б) в эпидермисе молоди рыб всех изученных возрастов, выявив в цитоплазме слизистых клеток компактно упакованные гранулы, связанные с мембраной. Это свидетельствует о наличии в слизистых клетках нейтральных мукополисахаридов и/или гликогена. Обработка срезов кожи молоди рыб диастазой (человеческой слюной) перед окрашиванием Шик-реакцией не повлияла на положительное окрашивание слизистых клеток. Это свидетельствует о том, что слизистые клетки трески содержат не только гликоген.

Комбинация альцианового синего при разных уровнях рН и Шик-реакции, используемая для выявления кислых и нейтральных гликопротеинов, была применена к образцам кожи молоди трески. Данный метод окрасил большинство слизистых клеток в ярко-голубой цвет, индицируя наличие кислых мукополисахаридов (рис. 2а), в то время как одна Шик-реакция, примененная к образцам кожи с тех же позиций на теле рыб, окрасила клетки в пурпурный цвет, подтверждая наличие нейтральных мукополисахаридов. Клеток с явным сочетанием этих двух цветов после окрашивания комбинацией альцианового синего (рН 2.5) и Шик-реакции выявлено не было.

Шубич (*Shubich*, 1961) обнаружил, что специфичность альцианового синего прекращается через 10-40 секунд воздействия на клетки, после чего другие структуры, не содержащие кислых мукополисахаридов, начинают очень быстро поглощать краситель. В настоящей работе при окрашивании срезов с помощью альцианового синего (рН 2.5)-Шик-реакции, где воздействие альцианового синего длилось в течение 30 секунд, появилось лишь голубое окрашивание слизистых клеток. Это может свидетельствовать о том, что альциановый синий способен соединяться не только с кислыми мукополисахаридами, но также и с другими веществами. Необходимо отметить, что слизистые клетки в коже молоди атлантической трески могут содержать как нейтральные, так и кислые мукополисахариды, однако за счет большей интенсивности голубая окраска альциановым синим могла

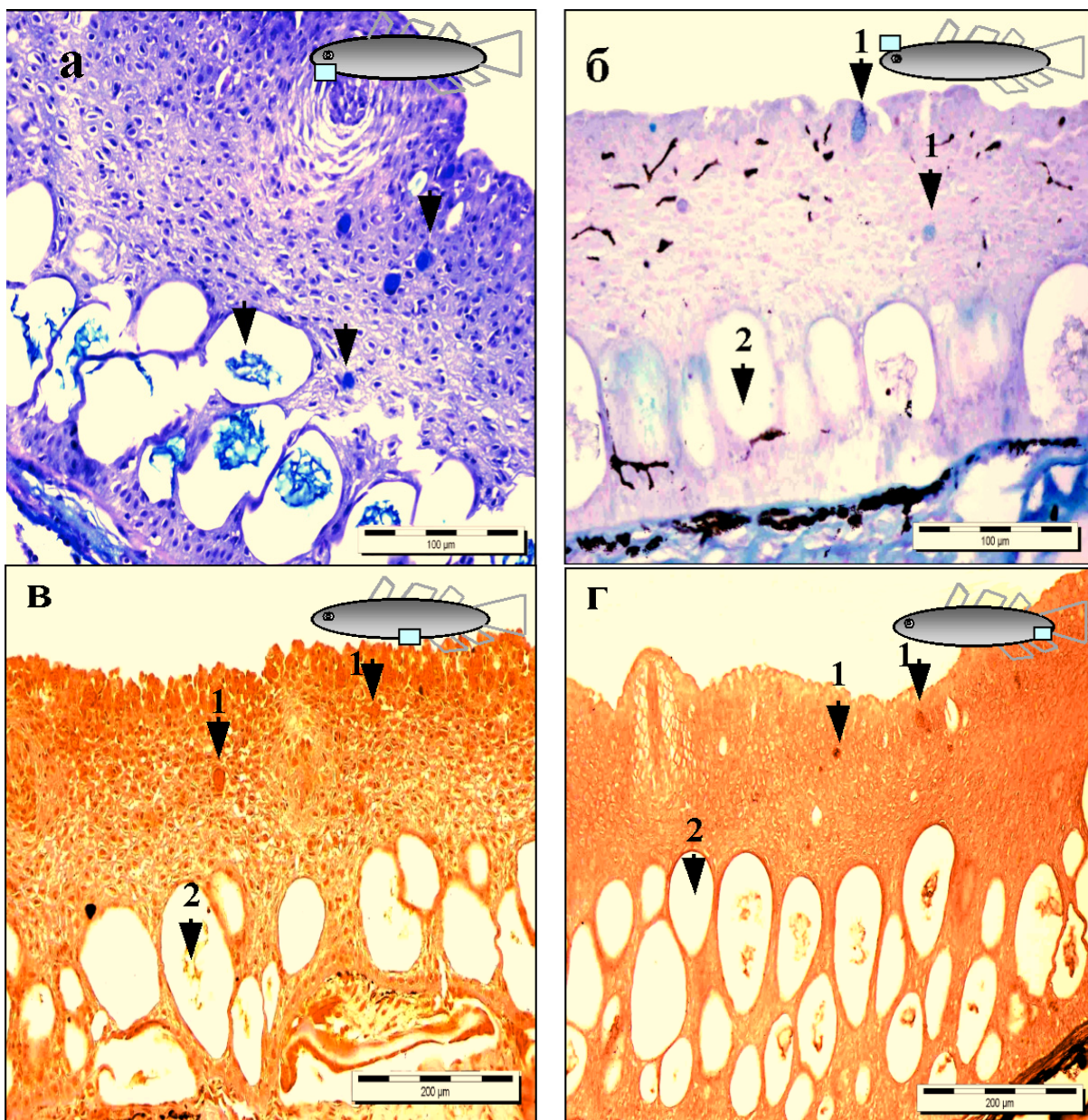


Рис. 2. Слизистые клетки в эпидермисе молоди атлантической трески, окрашенные разными красителями. 1 – слизистая клетка; 2 – мешковидная клетка. (а) Головной отдел. Возраст: 1.5 года (альциановый-синий (рН 2.5) и Шик-реакция). (б) Головной отдел. Возраст: 1 год (альциановый-синий (рН 1.0) и ядерный красный). (в) Головной отдел. Возраст: 1 год (основной коричневый). (г) Хвостовой отдел. Возраст: 1.5 года (высоко-железный диамин)

замаскировать пурпурную окраску Шик-реакцией. Данное предположение может объяснить отсутствие в настоящей работе слизистых клеток, окрашенных двумя красителями одновременно.

Выборочное окрашивание образцов кожи рыб исследуемых групп с помощью альцианового синего (рН 0.5) и альцианового синего (рН 1.0) в основном имело отрицательный результат для слизистых клеток. Лишь в некоторых образцах кожи трески в возрасте 1 года слизистые клетки окрасились в светло-голубой цвет (рис. 2б), что свидетельствует о незначительном количестве кислых мукополисахаридов с сульфатными группами в их секрете. Необходимо отметить, что чешуя в образцах из групп рыб в возрасте 1 года и 1.5 лет, хрящи и слизистые клетки пищевода в образцах из группы рыб в возрасте 5 месяцев окрасились в ярко-голубой цвет, что может являться контролем окрашивания.

Выборочное окрашивание образцов кожи атлантической трески в возрасте 1 года с помощью основного коричневого выявило слизистые клетки в эпидермисе. Они окрасились в желто-коричневый цвет (рис. 2в). Необходимо отметить, что в данном случае не производилось контрольное окрашивание, поэтому

результаты окраски с Бисмарк коричневым не следует рассматривать как абсолютно точные, тем не менее, положительная окраска свидетельствует о наличии в слизистых клетках кислых мукополисахаридов.

Окрашивание с помощью высоко-железного диамина, примененное к образцам кожи молоди рыб из всех трех групп дало положительное темно-коричневое окрашивание только некоторым рыбам в возрасте 1 года и 1.5 лет (на участках кожи хвостового отдела и боковой линии), хотя окрашивание было довольно бледным (рис. 2г). Кожа личинок атлантического палтуса (около 6 недель после выклева), окрашенная положительно с помощью альцианового синего (рН 0.2), использовалась как контроль для высоко сульфатных гликопротеинов при данном окрашивании. Наличие положительного окрашивания с помощью этого красителя говорит о присутствии в слизистых клетках взрослых рыб сульфомукополисахаридов.

Изучение слизистых клеток при помощи ТЭМ выявило, что у молоди трески они были в основном овальной формы с большим количеством компактных глобул неправильной формы, заполненных электронно-прозрачным материалом (рис. 3а, б). Ядра и ЭПР были смещены на периферию клеток. Наибольшая длина слизистых клеток варьировала от 8 до 15 мкм и не зависела от возраста рыб. В коже трески были обнаружены слизистые клетки, находящиеся на разных стадиях развития (рис. 3а, б). Слизистые клетки были в основном расположены у поверхности эпидермиса, что может быть объяснено выделительной функцией этих клеток. Зрелые слизистые клетки у трески были часто открыты на поверхность эпидермиса, что служит признаком выделения их содержимого на поверхность кожи рыб (Henrikson, Matoltsy, 1967). Расположение слизистых клеток глубоко в эпидермисе, как это было обнаружено в коже молоди в возрасте 1 года и 1.5 лет, может свидетельствовать о начальных стадиях мукогенеза.

В данной работе в слизистых клетках кожи молоди атлантической трески был обнаружен хорошо развитый шероховатый ЭПР. Синтез слизи в слизистых клетках происходит за счет деятельности аппарата Гольджи, роль которого – производство углеводного компонента слизи, в то время как шероховатый ЭПР вовлечен в образование ее белкообразных прекурсоров, как сообщали Н्यूтра и Леблонд (Neutra, Leblond, 1966), а также Фримэн (Freeman, 1966). Белки из шероховатого ЭПР транспортируются к мембранам комплекса, где все указанные продукты смешиваются.

Анализ числа слизистых клеток в эпидермисе молоди атлантической трески показал, что содержание этих клеток выше в передних отделах тела по сравнению с задними. Сходная зависимость была найдена в коже золотой рыбки *Carassius auratus* (Henrikson, Matoltsy, 1967), кумжи *Salmo trutta* и арктического гольца *Salvelinus alpinus* (Pickering, 1974), а также у американского угря *Anguilla rostrata* (Leonard, Summers, 1976). Предполагается, что такое распределение слизистых клеток может обеспечивать равномерный слой слизи на поверхности тела рыбы, так как проксимально образованный мucus распределяется дистально за счет движения рыбы (Pickering, 1974). Кроме того, благодаря такому свойству рыбы могут экономить свою энергию, в связи с отсутствием лишних выделений слизистыми клетками задней части тела рыб.

Известно, что сульфомуцины препятствуют развитию патогенных микроорганизмов на поверхности кожи рыб (Solanki, Benjamin, 1982). Так, донные рыбы, за некоторым исключением, производят исключительно сульфогликопротеины, в то время как пелагиальные виды производят только карбоксилированную слизь (Whitaker, 1986). Сравнительное изучение Баллока (Bullock, 1980) рыб семейства тресковых выявило отсутствие сульфогликопротеинов в слизистых клетках глубоководных видов морских рыб; их выделения могут содержать сиаловые кислоты, либо быть нейтральными, при этом слизистые клетки были немногочисленны. Флетчер (Fletcher, 1978) установил, что слизистые клетки состоят на 11.3 % из сульфомуцинов у европейской камбалы, 11 % у камбалы, 8 % у ската, 7.5 %

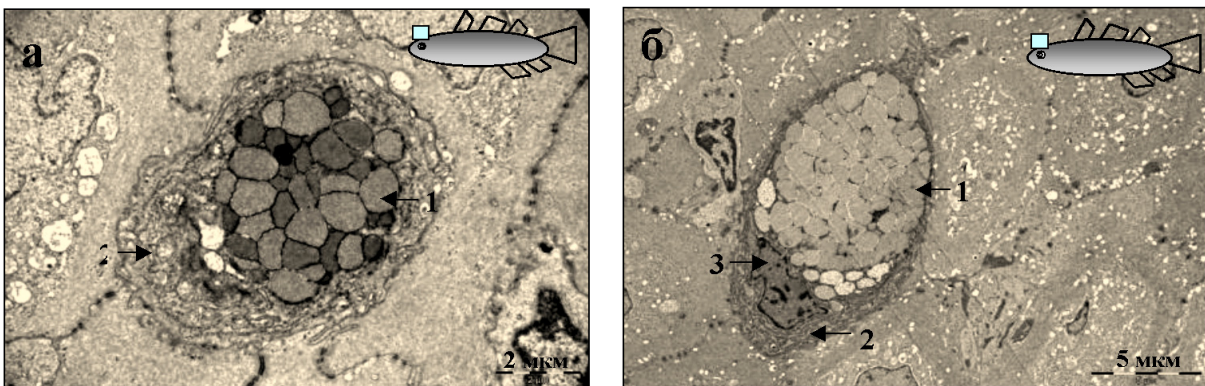


Рис. 3. Слизистые клетки в эпидермисе головного отдела молоди атлантической трески. Возраст: 1.5 года. Клетки выглядят различно, но обе клетки (а) и (б) имеют компактно распределенные гранулы (1) с объединенными мембранами и ЭПР, смещенный к основанию клетки (2); (б) 3 – ядро. (ТЭМ)

у лиманды, 4 % у морской форели и 0 % или 6.2 % у трески. Поэтому увеличение степени сульфатации гликопротеинов может являться следствием раздражения кожи пелагических рыб биологическими или механическими источниками.

Атлантическая треска – это эпибентосно-пелагический вид (Coad, Reist, 2004). Молодь и взрослые особи обитают в пелагиали и питаются пелагическими видами рыб, такими как сельдь, мойва, западноевропейская сельдь, скумбрия, серебристый хек, молодая пикша и другими, и, кроме того, могут искать пищу на дне, поедая мидии и других моллюсков, так же как крабов, лобстеров и морских ежей (Smith et al., 2007).

Поэтому, возможно, низкое содержание сульфомуцинов в слизистых клетках атлантической трески может быть объяснено ее слабой активностью на дне по сравнению с бентосными видами рыб. Кроме того, большое количество сульфомуцинов, имеющих низкую вязкость, может быть невыгодным для трески, которая частично обитает и в пелагиали, где небольшое трение о воду является преимуществом (Ottesen, Olafsen, 1997). Стоит также отметить, что изучаемая молодь трески выращивалась в садках, где условия содержания отличались от естественных для данного вида рыбы; это может являться другой причиной низкой сульфатации слизистых клеток.

Состав выделений слизистых клеток может также меняться на разных стадиях онтогенеза рыб. К примеру, сразу после вылупления мальки кумжи *Salmo trutta* обладают многочисленными слизистыми клетками, однако количество сульфомуцинов уменьшается, когда они покидают место нереста (Blackstock, Pickering, 1982). Личинки атлантического палтуса *Hippoglossus hippoglossus* являются пелагическими, и их кожные слизистые клетки содержат больше нейтральных мукополисахаридов, однако состав меняется в сторону сульфомуцинов, когда молодь палтуса переходит от пелагического к бентосному образу жизни (Ottesen, Olafsen, 1997).

Характер воды также влияет на химический состав слизистых клеток у рыб. Девятииглая колюшка в пресной воде имела преимущественно слизистые клетки с сульфомуцинами и небольшое число слизистых клеток с нейтральными гликопротеинами; перевод рыб в морскую воду привел к синтезу преимущественно сialiрированных гликопротеинов (Solanki, Benjamin, 1982). Слизистые клетки с сульфатными эфирами другой пресноводной рыбы мацацембелуса перламутрового *Mastacembelus pancalus* более активно участвовали в синтезе секреторного содержимого слизистых клеток, чем такие же клетки с нейтральными гликопротеинами (Mittal et al., 1995). Таким образом, химический состав слизистых клеток может служить индикатором состояния окружающей водной среды.

Что касается нейтральных гликопротеинов, они могут контролировать кислотность выделений слизи, как это сообщали Цукисе и Ямада (Tsukise, Yamada, 1981). Кроме того, нейтральные гликопротеины у млекопитающих принимают участие в распознавании клеток и физиологически активных элементов и восприятию химической информации (Hughes, 1975).

4. Выводы

Слизистые клетки – это клетки круглой или овальной формы с секреторными гранулами внутри цитоплазмы, в синтезе которых принимают активное участие аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. В основном этот вид клеток располагался у поверхности кожных покровов трески, что свидетельствует об их секреторной функции.

Размер слизистых клеток находился в пределах от 8 до 15 мкм и не зависел от возраста рыб. Наибольшее количество этих клеток было обнаружено в эпидермисе передних отделов тела рыб, что обеспечивает равномерный слой слизи на поверхности тела рыбы при движении.

Результаты окрашивания в данной работе продемонстрировали, что слизистые клетки в эпидермисе молоди атлантической трески содержали совокупность нейтральных мукополисахаридов, гликоген и, вероятно, кислые мукополисахариды. Некоторые из слизистых клеток в коже рыб в возрасте одного и полутора лет могли содержать небольшое количество сульфогликопротеинов, так как эти клетки слабо окрашивались альциановым синим (рН 0.5 и 1.0) и высоко-железным диаминном в некоторых образцах кожи.

Химический состав цитоплазмы слизистых клеток отражает особенности экологии трески как эпибентосно-пелагического вида.

Проведенный анализ слизистых клеток атлантической трески может быть полезным для дальнейшего изучения трески, а также для оценки состояния окружающей водной среды, что представляется особенно актуальным на фоне увеличивающегося интереса к проблеме экологической безопасности при разработке месторождений нефти и газа в северо-арктическом регионе.

Литература

- Bancroft J.D., Cook H.C., Stirling R.W., Turner D.R.** Carbohydrates. In: *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. Churchill Livingstone, New York, p.131-172, 1994.
- Blackstock N., Pickering A.D.** Changes in the concentration and histochemistry of epidermal mucous cells during the alevin and fry stages of the brown trout *Salmo trutta*. *J. Zool.*, N 197, p.463-471, 1982.
- Bullock A.M.** A comparative study of the epidermal morphology of fishes of the order Anacanthini with reference to their ecology and distribution. *Oceanographic Marine Biology Annual Review*, N 18, p.251-315, 1980.
- Bullock A.M., Roberts R.J.** The dermatology of marine teleost fish. I. *The normal integument*. *Oceanographic Marine Biological Annual Review*, N 13, p.383-411, 1974.
- Coad B.W., Reist J.D.** Annotated list of the arctic marine fishes of Canada. *Canadian MS Report of Fish Aquatic Science*, N 2674, p.112, 2004.
- Ellis A.E.** Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, N 25, p.839, 2001.
- Fletcher T.C.** Defence mechanisms in fish. In: *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. Academic Press, London, New York, p.189-222, 1978.
- Freeman J.A.** Goblet cell fine structure. *Anatomical Record*, N 154, p.121-148, 1966.
- Harris J.E., Watson A., Hunt S.** Histochemical analysis of mucous cells in epidermis of brown trout *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.*, N 5, p.345-357, 1973.
- Henrikson R.C., Matoltsy A.G.** Fine structure of teleost epidermis. 2. *Mucous cells*. *J. of Ultrastructure Research*, N 21, p.213-221, 1967.
- Hughes R.C.** Complex carbohydrates of mammalian-cell surfaces and their biological roles. *Essays in Biochemistry*, N 11, p.1-36, 1975.
- Ingram G.A.** Substances involved in the natural-resistance of fish to infection - a review. *J. Fish Biol.*, N 16, p.23-60, 1980.
- Leonard J.B., Summers R.G.** Ultrastructure of integument of American eel *Anguilla Rostrata*. *Cell and Tissue Research*, N 171, p.1-30, 1976.
- Mittal A.K., Banerjee T.K.** Keratinization versus mucus secretion in fish epidermis. In: *The skin of vertebrates*. Academic Press, London, p.1-12, 1980.
- Mittal A.K., Fujimori O., Ueda H., Yamada K.** Carbohydrates in the epidermal mucous cells of a fresh-water fish *Mastacembelus pancalus* (Mastacembelidae, Pisces) as studied by electron-microscopic cytochemical methods. *Cell and Tissue Research*, N 280, p.531-539, 1995.
- Neutra M., Leblond C.P.** Synthesis of carbohydrate of mucus in Golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose-H³. *J. of Cell Biology*, N 30, p.119-136, 1966.
- Ottesen O.H., Olafsen J.A.** Ontogenetic development and composition of the mucous cells and the occurrence of saccular cells in the epidermis of Atlantic halibut. *J. Fish Biol.*, N 50, p.620-633, 1997.
- Pickering A.D.** Distribution of mucous cells in epidermis of Brown trout *Salmo trutta* L. and char *Salvelinus alpinus* L. *J. Fish Biol.*, N 6, p.111-122, 1974.
- Rosen M.W., Cornford N.E.** Fluid friction of fish slimes. *Nature*, N 234, p.49-54, 1971.
- Shubich M.G.** A method of elective staining of acid (sulfated) mucopolysaccharides with basic brown. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, N 51, p.247-250, 1961.
- Smith B.E., Ligenza T.J., Almeida F.P., Link J.S.** The trophic ecology of Atlantic cod: Insights from trimonthly, localized scales of sampling. *J. Fish Biol.*, N 71, p.749-762, 2007.
- Solanki T.G., Benjamin M.** Changes in the mucous cells of the gills, buccal cavity and epidermis of the nine-spined stickleback *Pungitius pungitius* L. induced by transferring the fish to sea water. *J. Fish Biol.*, N 21, p.563-576, 1982.
- Tsukise A., Yamada K.** The histochemistry of complex carbohydrates in the scrotum of the boar. *Histochemistry*, N 72, p.511-521, 1981.
- Whitear M.** The skin of the fishes including cyclostomes. Epidermis. In: *Biology of the integument*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p.8-38, 1986.