

Караванський Ю.В.

Старший викладач кафедри гідробіології та загальної екології

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 65082, м. Одеса, вул. Дворянська, 2
E-mail: tetra2000@ukr.net

ФОРМУВАННЯ ЦИРКАДІАННИХ РИТМІВ У ПЕЧЕРНОЇ РИБИ ASTYANAX MEXICANUS

FORMATION OF CIRCADIAN RHYTHMS IN CAVE FISH ASTYANAX MEXICANUS

Біологічний годинник у організмів з'явився та еволюціонував як пристосування до ритмічного життя на планеті. Він синхронізує всі фізіологічні процеси із природнім циклом темрява-світло. Біологічні ритми завчасно готовують організм до змін різноманітних умов навколошнього середовища та надають таким чином перевагу у боротьбі за виживання. Циркадні ритми є пристосуванням саме до зміни дня і ночі, що дозволяє кожному виду зайняти визначену часову екологічну нішу. Ритми визначаються та регулюються специфічними генами та білками.

Як і всі інші, пічерні організми мають пристосування до природних ритмів. В усьому світі на даний час відомо близько 80 різноманітних видів пічерних риб, які еволюціонували від тих, які мешкали на поверхні. У більшості випадків попередні форми вимерли. Мексиканська сліпа пічерна риба (*Astyanax fasciatus mexicanus*) є одним із рідкісних видів, коли зрячий предок існує до сих пір. І хоча сліпа та зряча форми за фенотипом дещо відрізняються, присутність попередніх і вихідних форм полегшує вивчення еволюції виду. Останніми дослідженнями встановлено сумісну еволюцію генетичних та поведінкових особливостей, які дозволили компенсувати пічерним рибам відсутність зору та ефективно орієнтуватися у просторі і знаходити їжу.

Такі види, як *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853) є одними з найкращих моделей для еволюційних, екологічних досліджень, вивчення механізмів поведінки організмів. Їх використання дозволить вирішити багато завдань сучасної біології та медицини, має не тільки теоретичне, але й практичне значення. Подібний науковий напрям в тому числі може допомогти вирішити проблему окремих форм порушення зору людини.

Мета даної роботи полягала в вивчені впливу зовнішніх факторів у формуванні циркадних ритмів молоді *Astyanax mexicanus* (De Filippi, 1853) в лабораторних

умовах.

1.1. Що таке циркадні ритми

Виникнення ритмів в організмах пов'язане з процесами їх адаптації до навколошнього середовища в процесі еволюційного розвитку. Стабільність періодичності змін освітленості, температури, вологості, геомагнітного поля та інших параметрів навколошнього середовища, обумовлених рухом Землі і Місяця навколо Сонця, дозволила живим системам в процесі еволюції виробити стійкі до зовнішніх впливів біологічні програми. Відомо, що такі ритми закріплені в генетичній структурі, виходячи з даних, що у відсутності зовнішнього впливу періоди таких ритмів не відрізняються від періодів відповідних ритмів навколошнього середовища.

Один з відомих вчених в галузі вивчення біоритмів, американський біолог Ю. Ашофф, стверджував, що в організмі людини немає жодного органу і жодної функції, що не виявляли добової ритмічності.

На думку Ю. Ашоффа, біологічними ритмами є періодично повторювані зміни інтенсивності біологічних процесів та явищ, які властиві живій матерії на всіх рівнях її організації – від молекулярних і субклітинних, до біосфери в цілому.

Визнаний авторитет у цій галузі, Дж. Л. Клауделі-Томпсон назвав три головні тези:

- 1) біологічні ритми набуваються в результаті навчання;
- 2) біологічні ритми є вродженими;
- 3) біологічні ритми пов'язані з реакцією організму на подразники космічного походження.

Діапазон періодів біоритмів широкий: від мілісекунд до кількох років. Їх можна спостерігати як в окремих клітинах, так і в цілому в організмах чи популяціях.

Найбільш поширенна класифікація біоритмів за Ф. Халбергом [1964], по частотам коливань, тобто по величині, зворотній довжині періодів ритмів. Ритми тривалістю більше доби є інфрадіяними ритмами (28 годин – 3 доби), ритми тривалістю менше доби – ультрадіяни (0,5–20 годин), циркадні ритми мають добову тривалість (20–25 годин).

В природі чітко виражені і відповідно найбільшою мірою вивчені ритми з періодом близько 24 години (область від 20 до 25 годин), названі Ф. Халбергом циркадіяними (лат. сірса – приблизно, dies – день). Циркадні ритми існують на всіх рівнях організації.

Дж. Шиманський в 1914 році довів, що активність звичайної золотої рибки (*Carassius auratus*) має виражений добовий ритм, який зберігається при незмінних

умовах.

При вивченні ритмічних явищ в живих системах завжди важливо з'ясувати, чи відображає ритм, спостережуваний в даній біологічній системі, реакцію на зовнішній по відношенню до цієї системи періодичний вплив (екзогенний ритм), або ж він породжується всередині самої системи (ендогенний ритм).

В даний час дослідження механізмів циркадних ритмів засвідчило, що в основі добового ритму лежать спадково закріплени ендогенні цикли фізіологічних процесів, відносно незалежні від зовнішніх періодичних факторів. Ендогенні циркадні ритми виявлені практично у всіх досліджених видів тварин, починаючи з найпростіших.

Відомий американський хронобіолог К. Піттендрай [1964] сформулював умови, яким повинні відповідати ендогенні біологічні ритми:

- 1) ритми повинні спостерігатися в середовищі, більшість параметрів яких постійні;
- 2) фаза ритму повинна регулюватися відповідним втручанням, але при цьому нова фазова структура ритму повинна зберігатися при відсутності змін середовища;
- 3) для ініціювання ритму досить одного сигналу;
- 4) фаза ритму повинна затримуватись при пригніченні метаболізму

Експериментальні дослідження засвідчили, що цим умовам відповідають циркадні ритми. В основі концепції про тимчасову організацію біологічних систем лежать добові та сезонні ритми, що становлять в загальній структурі біологічного часу важливу ланку, необхідну для інтеграції діяльності цілісного організму при адаптації до мінливих умов навколошнього середовища. Тому основний сенс тимчасової організації полягає в узгодженості перебігу ритмічних процесів в межах організму, а також з ритмами поза ним.

Відносна роль ендогенних і екзогенних механізмів регуляції добових циклів у різних видів неоднакова. Так, у форелі при утриманні в темряві добовий цикл активності повністю порушувався, що показує переважне значення екзогенної регуляції. Аналогічні дані отримані в дослідах з стерляддю: при нормальному режимі освітлення риби вдень тримаються виключно в придонних шарах води, а вночі їх розподіл в товщі води рівномірний. При цілодобовому освітленні риби тримаються тільки на дні, а при цілодобовому затемненні поводяться, як вночі [Федота та ін., 2015].

1.2. Групи тварин, що мешкають у печерах

Серед великої кількості наземних біотопів досить чітко виділяються підземелля (печери). Завдяки цілому ряду факторів, серед яких на першому місці стоять специфічні закономірності формування мікроклімату, відсутність освітлення, особливий характер зв'язків з іншими наземними екосистемами, підземелля створюють унікальне середовище для існування фауни.

Печери є місцем оселення унікальної троглобіонтної і трогрофільної фауни. Територія України включає кілька великих карстових районів, найвідомішими з яких є Закарпаття, Поділля. Печери цих регіонів характеризуються високою відносною вологістю та низькими і сталими температурами повітря. Печери формувалися впродовж мільйонів років, їхня біота включає роди і види, які не мають аналогів у наземних фаунах або ж є типовими саме для підземних місцезнаходжень.

Серед представників підземної фауни можуть зустрічатися як тварини, що здатні жити у різних біотопах і не потребують певних специфічних умов, характерних саме для підземних порожнин, так і представники досить відокремленої групи організмів – троглобіонти, не здатні існувати в іншому середовищі.

Троглобіонти (від гр. “trogle” – печера + біонт) – це організми, які пристосовані до життя в умовах печер. Троглобіонти в широкому розумінні – організми, що постійно живуть у печерах та підземних водах.

Дослідження морфологічних та екологічних особливостей троглобіонтів у порівнянні з позапечерними групами дозволяє зробити певні висновки щодо імовірних шляхів їх еволюції. Наразі очевидним є кілька фактів: незалежне формування пристосувань до підземного життя у стиго- і троглобіонтів, численні паралелізмі у формуванні трогломорфних ознак, викликані подібністю умов існування, наявність численних родинних форм у суміжних середовищах.

Відомо, що специфіка підземної біоти накладає на її мешканців своєрідний адаптивний відбиток. Нерідко у типових троглобіонтів можна спостерігати зникнення сезонної періодичності в життєвих циклах, спрощення будови або ж, навпаки, пічерний гігантізм та якісь інші, зовні помітні перетворення.

Основними морфологічними ознаками адаптації тварин до підземного середовища, порівняно зі спорідненими поверхневими формами, є редукція очей і депігментації покривів. У дрібних форм, таких як ракоподібні, спелеобіонтність супроводжується втратою кутикули, збільшенням розмірів тіла, видовженням кінцівок, вусиків, видовженням та потоншанням кігтів, гіперрозвитком сенсорних структур. Втрата зору і обмежений слух компенсиуються розвитком хемокомунікаційних, сеймосенсорних

і ехолокаційних систем, нижчими стають температури фізіологічного оптимуму.

Підземні екосистеми представлені великим біорізноманіттям: від найпростіших, бактерій і водоростей до членистоногих і хребетних.

Серед троглобіонтів багато видів ракоподібних, набагато рідше серед них зустрічаються молюски, п'явки, поліхети і комахи. У деяких природних печерах в районах з теплим кліматом живуть окремі види комах, а також риб і земноводних.

Організми, які зустрічаються тільки в підземних середовищах існування, розвинули аналогічний набір морфологічних, фізіологічних і поведінкових адаптацій, званих трогломорфій. Різні таксони, які співіснують в одній і тій же пічерної системі, можуть мати подібні трогломорфні адаптації та аналогічні рівні трогломорфії.

Історично першим описаним пічерним хребетним є північна сліпа риба (*Amblyopsis spelaea*).

В якості особливого підрозділу троглобіонтів можна виділити так званих стігобіонтів – тварин, що мешкають виключно в підземних водах. До них можна віднести багато видів вищих (амфіподи, ізоподи) і нижчих (остракоди, копеподи) ракоподібних, деяких молюсків (*Zospeum tholussum*), риб (*Amblyopsis*, *Tiphlichthys*, *Chologaster*). Спільною рисою для всіх цих організмів є феномен регресивної еволюції: депігментація покривів тіла, ослаблення або повна редукція органів зору, гіпертрофія кінцівок. На даний час тільки дві групи хребетних успішно колонізували пічери та інші підземні середовища існування. Пічерні риби і пічерні саламандри розвили пристосування для життя в постійній темряві з обмеженими енергетичними ресурсами. Зокрема, пічерні риби являють собою одну з найбільш вивчених груп підземних організмів.

Пічерні риби являють собою широке філогенетичне і просторове різноманіття: 10 загонів і 22 родини зустрічаються на всіх континентах, окрім Антарктиди. Найбільша різноманітність пічерних риб доводиться на Cypriniformes (78 видів) і Siluriformes (57 видів). Найбільше видове різноманіття зустрічається в Китаї, за ним слідують Бразилія і Мексика.

Північна пічерна риба (*Amblyopsis spelaea*), мексиканська пічерна риба (*Astyanax mexicanus*), сомалійська пічерна риба (*Phreatichthys andruzzii*) або китайська пічерна риба (*Sinocyclocheilus*) – одні з найбільш відомих і вивчених видів.

Адаптація до пічери призводить до унікальних спеціалізацій, таких як збільшення кількості смакових рецепторів, підвищене накопичення жиру, більший розмір яєць і чутливіші невізуальні сенсорні модальності. Однак найбільш помітними регресивними рисами пічерних адаптованих тварин є втрата пігментації і втрата

очей. Регресивна еволюція очей і пігментації печерних риб була детально розглянута на дослідженнях печерної мексиканської риби (*Astyanax mexicanus*) і сомалійської печерної риби (*Phreatichthys andruzzii*)

У *Astyanax mexicanus* ознаки дегенерації очей починаються на ранній стадії розвитку. Дегенерація очей розпочинається з апоптозу кришталика, який потім поширюється на сітківку. Нові клітини сітківки продовжують виникати зі стовбурових клітин в маргінальній зоні вій, але згодом, перш ніж вони диференціюються, видаляються апоптозом, що призводить до зупинки зростання очей.

Порівняльне дослідження дегенерації очей у сомалійською печерної риби (*Phreatichthys andruzzii*) показує іншу динаміку. Вважається, що ці печерні риби були ізольовані понад 2 млн. років тому, про що свідчить не тільки повна втрата очей і пігментації, а й повна втрата луски. Проведеними дослідженнями було виявлено, що в тканинах кришталика було менше ознак апоптозу, що суперечить відомим механізмам, які лежать в основі дегенерації очей у печерних риб *Astyanax*.

P. andruzzii втрачають очі за іншим механізмом. Диференціація типів клітин сітківки зупиняється в розвитку, і гангліозні клітини сітківки не можуть посилати проекції на покрив зорового нерва.

Відсутність первинної продуктивності в темних печах і періодична доступність поживних речовин ззовні привели до розвитку унікальних стратегій виживання в багатьох популяціях печерних риб. Паралельно з регресією очей у печерних риб розвинувся більш великий нюховий епітелій, органи чуття, що спеціалізуються на виявленні молекул, пов'язаних з харчуванням і розмноженням. Поведінкові аналізи продемонстрували нюхові здібності печерних риб. Деякі популяції печерних риб розвинули поведінку вібраційного тяжіння (VAB), опосередковане невромастамі бічної лінії, особливо тими, які розташовані в суборбітальній області очі. Збільшення кількості нюхових органів, смакових рецепторів і черепних невромастів допомагає печерним рибам виявляти їжу в темному середовищі. Печерні риби відчувають вібрації, використовуючи поведінку вібраційного тяжіння, і таким чином знаходять здобич. У періоди достатку їкі печерні риби здатні відкладати жир для використання в періоди голоду. Низький рівень метаболізму і стійкість до втрати ваги допомагають печерним рибам вижити в періоди низької доступності їжі.

Зменшення або втрата пігментації шкіри – ще одна важлива регресивна особливість печерних мешканців. У тварин, що мешкають на поверхні, пігментація використовується для захисту від сонячного світла, маскування, мімікрії, а також розрізнення видів та статі; все це не має значення в темному печерному середовищі.

Astyanax має три типи пігментних клітин: чорні меланофори, срібні ірідофори і помаранчеві ксантофори. Світла шкіра печерних риб обумовлена меншою кількістю меланофорів і зменшенням або втратою пігменту меланіну. Більшість печерних риб альбіоси, у них відсутня пігментація меланіну в тілі і очах. У печерних риб-альбіосів присутні безбарвні меланофори або їх попередники.

Саламандри – єдині четвероногі, що мешкають виключно в печерах. Описано понад 700 саламандр з 10 сімейств але тільки 14 видів з двох сімейств вважаються справжніми підземними облігатами. Описано 11 підземно-облігатних видів з сімейства Plethodontidae, всі з карстових регіонів центральної та східної частини Північної Америки. Вид олм (*Proteus anguinus*) з сімейства Proteidae (олми і водяні собаки) відомий з Динарського карсту Боснії і Герцеговини, Хорватії, Італії та Словенії в Південно-Східній Європі.

Як і у досліджених печерних риб, початковий розвиток очей печерної саламандри *Proteus anguinus* є нормальним, але потім зростання сповільнюється, відбувається інволюція рогівки, і кришталик піддається важким літичним процесам, в результаті чого око значно зменшується і виявляється втягнутим в орбіту, закриті під шкірою фоторецепторні клітини в сітківці проявляють ознаки дегенерації, причому зовнішні сегменти повністю відсутні в багатьох популяціях.

1.3. *Astyanax mexicanus* як об'єкт для вивчення біологічних ритмів

Поняття трогломорфів поширюється лише на постійних мешканців підземель, і його неможливо застосувати до тих істот, що є випадковими мешканцями або які опиняються у печерах виключно через схожість умов їхнього існування з суміжними з печерами місцевознаходженнями (наприклад, підстилка, нори, дупла). Життя без продуцентів, сонячного світла і тепла, у стисненому просторі, в умовах незначного і непостійного надходження органіки – все це викликає однотипні зміни в екоморфології спелеобіонтів. Вважається, що трогломорфи, незалежно від їх систематичного положення, самостійний екоморфологічний тип, життева форма, що характеризується певним набором унікальних морфологічних і екологічних ознак [Загороднюк, 2004].

Організми, адаптовані до печер, є цінними дослідними системами для вивчення циркадної ритмічності, оскільки печерне середовище не тільки позбавлене циклічних світлових сигналів, але також характеризується відносно постійною температурою і вологістю.

Печерні риби надзвичайно привабливі в дослідницьких системах через те, що

вони хребетні, населяють широкий спектр географічних регіонів і представляють не менше 86 видів з 18 різних таксономічних родин. На сьогоднішній день деякі аспекти циркадіанної ритміки були оцінені у 13 видів. Велика частина опублікованих досліджень була зосереджена на трьох основних видах: *Nemacheilus evezardi*, *Phreatichthys andruzzii* і *Astyanax mexicanus*.

Мексиканська тетра (*Astyanax mexicanus*) являє собою унікальний модельний організм, який добре підходить для вивчення адаптації до печерного життя, включаючи вивчення циркадіанних ритмів троглобіонтів.

Astyanax mexicanus водіє багатьма особливостями, що підходить для лабораторних досліджень. На відміну від багатьох печерних тварин, їх можна легко утримувати і розводити в лабораторії, час генерації становить від чотирьох до шести місяців.

Печерні популяції *Astyanax mexicanus* спіймані в 1990-х роках з декількох печер на північному сході Мексики. Протягом десятиліття після первісної наукової характеристики Хаббсом і Іннесом в 1936 році, *Astyanax* був предметом ряду досліджень, спрямованих на вивчення чутливості і поведінкових реакцій на світло, визначення того, чи проявляла печерна риба *Astyanax* циркадіанну ритмічність. У 1982 році Еркенс і Мартін вивчали циркадну ритмічність у цього виду, представлені ними результати були досить деталізовані.

У *Astyanax mexicanus* виявлено два добре диференційованіх морфотипа – поверхнева риба і печерна риба. До теперішнього часу в вапнякових печерах в районі Съєрра-де-Ель-Абра на північному сході Мексики виявлено 29 популяцій печерних риб.

Були проведені порівняльні дослідження між поверхневим морфотипом і печерним. У порівнянні з поверхневими рибами печерні риби проявляли чутливість до світла, а також більш високий рівень активності і відмінності в просторовому використанні. І поверхнева, і печерна риба демонстрували значну циркадну ритмічність.

Другий з добре вивчених видів *P. andruzzii* водіє годинниками, які залежать від періодичної доступності їжі, відображають тривалий інфрадіаний період і не мають температурної компенсації. Лабораторні дослідження показали, що ні центральні, ні периферичні годинники *P. andruzzii* не можуть бути задіяні світлом. Однак *P. andruzzii* мають функціональні біологічні годинники, які ґрунтуються на збереженні генів основних годин (Clk1a, Clk2, Per1 та Per1b). Подальші дослідження показали, що біологічні годинники *P. andruzzii* можуть бути задіяні невізуальними цейтгеберами.

Третій з добре вивчених видів печерних риб, для яких були досліджені зразки активності, є індійський гольц (*N. evezardi*). Як і у *A. mexicanus*, трогломорфізм у *N. evezardi* сильно розрізняється. В різних популяціях існують поверхневі форми, мікрофтальмологічні форми і передбачувані анофтальмологічні форми. Мікрофтальмологічні форми демонструють складну мінливість поведінки, на яку впливають денний час, статус годування, освітленість джерела їжі (світла чи темна область) і інтенсивність світла. Дані вказують на збереження функціонального зору, а також збереження біологічного годинника. Печерний індійський гольц демонструє вільну циркадну ритмічність.

Крім *A. mexicanus*, *P. andruzzi* і *N. evezardi*, існує значна кількість адаптованих до печер видів гольців і сомів, які були досліджені на предмет циркадної поведінки. У всіх цих випадках спостерігалися ознаки вільного циркадного ритму або змінених ритмів. Один з найбільш примітних ритмів активності відзначений у гірського в'юна *Schistura oedipus*. Анофтальмічний морфотип цього виду нечутливий до змін світла і темряви, але виявляє 38,5-годинний інфрадіяний ритм активності.

Аналіз накопиченого до теперішнього часу дослідного матеріалу дає змогу вважати, що біоритми всіх організмів є результатом тривалого еволюційного процесу, що протікає під впливом численних факторів навколошнього середовища. Втрата очей сліпими печерними рибами є результатом інтенсивного природного відбору. Виходячи із загальних екологічних уявлень можна стверджувати, що пристосувальна роль біоритмів очевидна: вони дозволяють координувати процеси життєдіяльності організму з періодично мінливих умов середовища проживання.

Вивчення троглобіонтів як модельних організмів може допомогти вирішити проблему деяких форм сліпоти у людини. Дані щодо обміну речовин риб можуть дозволити визначити причини ожиріння та діабету людини. Багато з мутацій, виявлених у таких модельних видів, як *A. mexicanus*, вивчаються на тих самих генах, які відповідають за окремі хвороби людини. Вивчення еволюційних шляхів подібних видів дозволить відслідкувати мутації та гени, які присутні в популяції, та ефективно проводити селекційний відбір на посилення чи послаблення їх експресії.

Група вчених продемонструвала зв'язок генетичних особливостей печерних риб з адаптивною поведінкою, яка надає їм перевагу у пошуку їжі у відсутності світла. Подібна поведінка виявляється як у диких риб, так і лабораторних.

Основне питання для сучасних досліджень печерних видів риб – чи зберігаються стандарти циркадіанні ритми у тих організмів, еволюція яких протікає у постійній темряві? Примітно, що адаптаційні зміни подібні у всіх видів, які мешкають у

печерах різних регіонів світу. З молекулярної точки зору пічерні риби реагують так, ніби скоріше знаходяться під постійною дією світла, аніж постійної темряви. На декількох видах троглобіонтів виявлено, що суточні ритми можуть як збільшуватися, так і скорочуватися за впливу різноманітних факторів – температури води, їжі. Тобто у пічерних риб внутрішні біологічні годинники можуть підлаштовуватися під умови існування. До сих пір повністю не виявлено специфічні тканинні фоторецептори, які відповідають за включення ритмів.

Дослідження диких видів риб встановлюють реакції, аналогічні особинам, які були вирощені в лабораторних умовах.

Вивчення пічерних риб, таких як *A. mexicanus* дає можливість виявити, наскільки сонячне світло вплинуло на еволюцію організмів. Подібні дослідження актуальні та мають велике теоретичне та практичне значення.