

УДК 597.2/5:591.3

А. Г. ШЕРЕЛО, Н. Ю. ЕВТУШЕНКО

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ И ОБЩИХ ЛИПИДОВ НА СТАДИЯХ ЭМБРИОГЕНЕЗА У КАРПА (*CYPRINUS CARPIO*)

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, e-mail: nich7@ukr.net

(Поступила в редакцию 16.09.2014)

Введение. Эффективность эмбрионального развития рыб в значительной мере определяется химическим составом желтка, в котором сосредоточены все питательные вещества, необходимые для нормального развития эмбриона. За счет накопленных в желтке питательных веществ происходит развитие зародыша, формируются соответствующие органы и структуры, которые обеспечивают функционирование различных систем организма, в том числе и его метаболические функции, до перехода вылупившихся предличинок на экзогенный тип питания.

Важнейшим показателем качества икры разных видов рыб является количество содержащегося в ней белка. Подтверждением этому служит открытая учеными связь между количеством белка в зрелой икре рыб и выживанием эмбрионов и личинок, которые развиваются из нее [4, 5].

Различают три основных источника желточных белков в оогенезе – синтез в самом яйце, синтез в окружающих яйцо клетках, синтез в отдаленных частях организма и поступление в ооцит с кровью. Эндогенный белок считается продуктом деятельности эндоплазматического ретикулула и аппарата Гольджи, тогда как из литературы известно, что белки желтка синтезируются также в печени рыб. В преднерестовый период гонадотропины гипофиза рыб, влияя на стероидную ткань яичников, индуцируют синтез эстрогенов, которые отвечают за синтез в печени вителлогенина – предшественника желточных белков ооцита [20]. Проникая в ооциты путем микропиноцитоза, вителлогенин распадается на фосфитин и липовителлин – основные компоненты кристаллического желтка [13], а также на другие мелкие β-компоненты [12, 16, 23, 24].

Известно, что эмбриогенез сопровождается двумя противоположно направленными процессами – синтезом и катаболизмом белков. Согласно литературным данным, протеолитические ферменты принимают участие не только в процессах распада белков, но и в их синтезе [5].

Согласно литературным данным, интенсивность процессов синтеза белка после оплодотворения икринки повышается на стадии дробления. По данным некоторых авторов, в эмбриогенезе вьюна, начиная с поздней гаструлы, происходит интенсивное образование белоксинтезирующих структур. На примере икры пинагора показано, что от оплодотворения до формирования кровеносной системы желточного мешка скорость роста зародышей невысокая. После завершения формирования кровеносной системы желточного мешка скорость белкового роста постоянно возрастает [6].

Во время эмбриогенеза происходит полная обработка белков желтка. Липовителлин расщепляется на свободные аминокислоты, которые служат субстратом для аэробной энергии и синтеза белка зародыша [21]. Очевидно, разнообразие форм липовителлина влияет на гетерогенность яиц. Часть липовителлина расщепляется во время эмбрионального развития, а часть остается в кишечнике для обеспечения личинок энергией, пока они не найдут благоприятные кормовые условия [14]. Фосфитин дефосфорилируется во время развития эмбриона и личинок, а β-компоненты обрабатываются на более поздних этапах развития [17, 20].

Одним из основных биохимических показателей качества икры (ее зрелости и готовности к оплодотворению) является количество в ней липидов, а соотношение в ней отдельных фракций является показателем жизнестойкости потомства [18, 22, 25].

Исследования липидного обмена в эмбриогенезе показали, что, несмотря на влияние множества факторов на выживание личинок, липидное обеспечение в критический переход на внешнее питание является крайне важным [15].

Интенсивное деление клеток в начале эмбриогенеза требует быстрого образования клеточных мембран [7]. Известно, что липиды ооцитов рыб обеспечивают потребности зародыша в структурных компонентах и метаболической энергии [2]. Пластическая функция липидов заключается в том, что они входят в состав клеточных и внутриклеточных мембран, образуя вместе с белками сложные липопротеидные комплексы, которые рассматриваются как структурные и функциональные единицы биологических мембран [1]. Известно, что некоторое количество липидов транспортируется в гонады в составе вителлогенина, а именно – липовителлина, который под влиянием половых гормонов синтезируется в печени рыб, переносится кровяным руслом в ооциты и откладывается в желтке [2, 8]. Липиды играют ключевую роль в транспорте ионов через клеточные мембраны, переносе электронов, а также в проведении нервных импульсов в нейронах и протекании ферментативных реакций в клетке [3].

Процессы роста и развития эмбрионов рыб необходимо изучать с биохимической точки зрения, а именно как динамику накопления и использования в их тканях белка – основного структурного компонента клеток эмбриона. Актуальны также вопросы энергетического обеспечения этих процессов во время эмбриогенеза.

Цель работы – установить особенности динамики белков и общих липидов во время эмбрионального развития карпа.

Материалы и методы исследований. Отбор и первичная обработка собранного материала осуществлены в 2013 г. на базе Белоцерковской гидробиологической станции Института гидробиологии НАН Украины. Зрелые половые продукты у самок средней массы (4–4,2 кг) получали заводским способом после инъектирования гонадотропным гормоном гипофиза. Оплодотворение икры проводили сухим методом, молоками, полученными от 3–5 самцов карпа. Икру обесклеивали цельным молоком на протяжении 40–45 мин, используя для помешивания гусиное перо. Инкубацию икры проводили в аппаратах Вейса. Для исследований отбирали неоплодотворенную икру, а также на стадиях мелкоклеточной морулы, желточной пробки, отделения хвостовой части, пульсации сердца, а также предличинки, поскольку в эти периоды происходит смена метаболизма эмбрионов и наблюдается их повышенная гибель. На каждой из указанных стадий подсчитывали процент выживания эмбрионов.

Биохимический анализ отобранных проб осуществляли в лаборатории воспроизводства рыб Института гидробиологии НАН Украины. Исследования выполняли в пяти повторностях. На каждой стадии развития икры определяли количество общего белка и липидов. Белок определяли методом Лоури [19]. Измерение проводили на концентрационном фотоэлектроколориметре КФК-2МП при длине волны 750 нм. Количество общих липидов определяли с помощью коммерческих наборов стандартных растворов. Измерения проводили также на фотоэлектроколориметре при длине волны 530 нм.

Статистическую обработку цифрового материала проводили при помощи программ Statistica 10 и Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и их обсуждение. Поскольку белок является субстратом для построения тела зародыша, его динамика в эмбриогенезе свидетельствует о протекании метаболических процессов и интенсивности роста эмбриона. Известно, что основными источниками энергии во время эмбрионального периода развития рыб являются углеводы и частично липиды, тогда как белок – основной субстрат для построения зародыша. Следует также отметить, что в зависимости от вида рыб белок в той или иной степени способен исполнять функции энергетического субстрата для метаболических преобразований [6].

Динамика количества белка исследованной икры карпа показана на рис. 1. У карпа, как и у большинства видов рыб, набухание оплодотворенных яиц в первые часы развития отражает

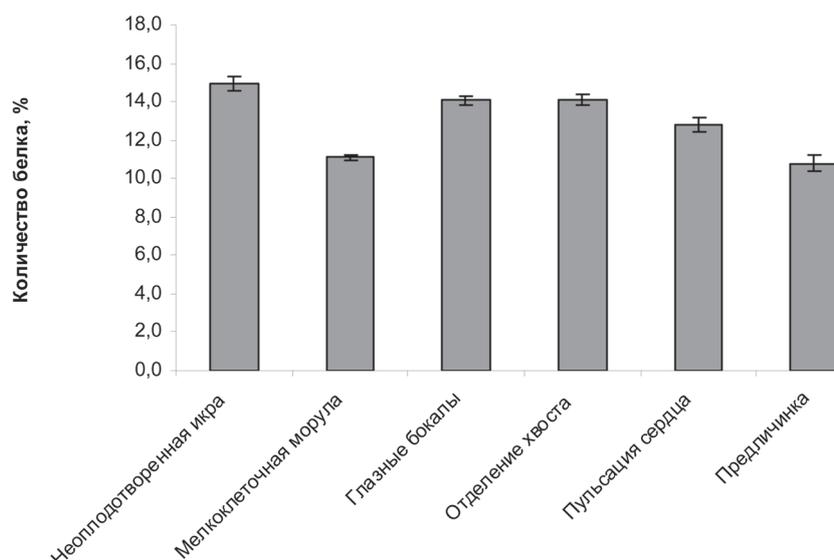


Рис. 1. Динамика количества белка на разных стадиях развития икры карпа ($P < 0,05$)

процессы интенсивного поступления воды в биколлоиды яйцевых оболочек, перивителлиновой жидкости и собственно яйца [10]. Исследования динамики количества белка на разных стадиях развития икры карпа показали, что после обводнения икры (что создает оптимальные условия для протекания метаболических процессов) количество белка существенно снижается, что указывает на временное расщепление белка до свободных аминокислот, которые мигрируют в зародыш. Повышение количества белка на стадиях глазных бокалов и отделения хвоста указывает на преобладание процессов синтеза белка зародыша над процессами диссимиляции белков желтка. Возрастание белковой массы на этих стадиях, очевидно, связано с интенсивным органогенезом.

Тенденция к снижению количества белка, которая наблюдается на стадии пульсации сердца, не противоречит литературным данным, которые указывают, что на стадиях, предшествующих вылуплению личинок, происходит незначительное снижение его количества [6, 10].

Согласно литературным данным, динамика количества белка на протяжении эмбрионального развития не всегда является типичной и зависит от степени обводнения яиц, а также от затрат накопленного запаса белка и его пополнения на каждом из этапов. Причиной неравномерного темпа развития икры может быть нестабильность температурных и других условий инкубации. Разное качество эмбриогенеза объясняется также неполноценностью зрелых половых продуктов и неблагоприятными условиями инкубации [10].

Общая картина метаболизма белков в раннем онтогенезе рыб, очевидно, определяется реализацией генетической программы их синтеза и распада на последовательных этапах развития и влиянием на нее внешних условий развития половых клеток, зародышей и личинок [10].

Оплодотворение и набухание икры способствует снижению количества компонентов икры, в том числе липидов.

Факт снижения количества липидов после оплодотворения, подтвержденный результатами наших исследований, может быть объяснен интенсивным делением клеток, требующим существенных энергетических затрат.

На протяжении всего периода исследований количество общих липидов изменялось незначительно, повышаясь на стадиях отделения хвоста и пульсации сердца. Динамика количества общих липидов отображена на рис. 2.

Результаты проведенных исследований подтверждают литературные данные о снижении количества липидов после оплодотворения. Согласно литературным данным, во время развития карпа от икринки до стадии «глазка» количество общих липидов снижается в 3,6 раза, что, оче-

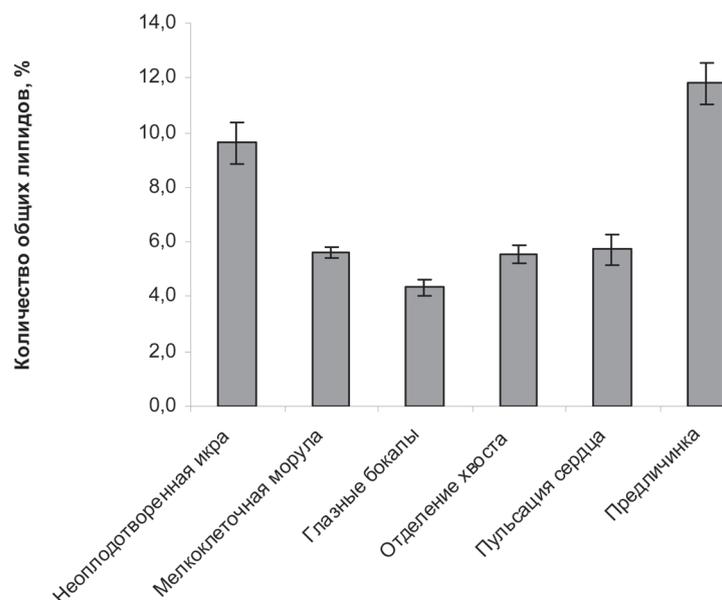


Рис. 2. Динамика количества общих липидов на разных стадиях развития икры карпа ($P < 0,05$)

видно, связано с использованием их в органогенезе [3]. Достоверное снижение количества общих липидов отмечено также у лосося на стадиях дробления и хвостовой почки [11].

Заключение. После оплодотворения икры карпа наблюдается снижение в ней количества белка, что связано с процессами его расщепления. На последующих стадиях развития эмбриона происходит ресинтез белка, в результате чего его количество возрастает. Из-за подготовки к вылуплению, а соответственно, и к разрушению оболочек яйца количество белка на заключительных стадиях развития икры уменьшается. Количество общих липидов икры карпа после оплодотворения уменьшается почти в 2 раза в связи с процессом активного деления клеток, что требует значительных затрат энергии. На протяжении всего периода развития динамика липидов выражена слабее, чем у белков, что, очевидно, связано с использованием лишь некоторых их фракций на потребности зародыша. Высокое содержание общих липидов, отмечаемое после выклева, обусловлено необходимостью обеспечения жизнеспособности предличинки до перехода ее на экзогенный способ питания.

Литература

1. Гельман Н. С. // Успехи соврем. биол. 1967. Т. 64, № 6. Вып. 3. С. 379–398.
2. Грициняк І. І., Смолянінов К. Б., Янович В. Г. Обмін ліпідів у риби. Л., 2010. – 336 с.
3. Касаткина А. Е., Щербина М. А. // Вопросы физиологии и кормления рыб: сб. науч. тр. ВНИИПРХ. М., 1999. Вып. 74. С. 3–26.
4. Кондратьева Т. П. // Гидробиол. журн. 1977. Т. 13, № 4. С. 75–80.
5. Коновалов Ю. Д. Белки и их реактивные группы в раннем онтогенезе рыб. К., 1984. – 196 с.
6. Куфтина Н. Д., Зайцева И. И., Новиков Г. Г. // Биологические основы рыбоводства. Актуальные проблемы экологической физиологии и биохимии рыб. М., 1984. С. 66–84.
7. Мукалов И. О., Гойда Е. А., Кусень С. И. // Укр. биохим. журн. 1980. Т. 52, № 4. С. 473–477.
8. Нефедова З. А., Мурзина С. А., Руколайнен Т. Р. и др. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: материалы III Междунар. конф. с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов. Петрозаводск, 2010. С. 128–130.
9. Сакун О. Ф. // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1960. Вып. 38. № 1. С. 38–42.
10. Семенов К. И., Коновалов Ю. Д., Несен Э. И. и др. // Разнокачественность раннего онтогенеза у рыб. К., 1974. С. 139–169.
11. Юровицкий Ю. Г., Нефедова З. А., Сидоров В. С. // Онтогенез. 1996. Т. 27, № 2. С. 89–94.
12. Byrne B. M., Gruber G. A. // Progress in Biophys. and Mol. Biol. 1989. Vol. 53. P. 33–69.
13. Dehn P. F., Wallace R. A. // J. Cell Biol. 1973. Vol. 58, N 3. P. 721–724.
14. Hartling R. C., Kunkel J. G. // J. of Exp. Zool. 1999. Vol. 284. P. 686–695.

15. Hilton Z., Poortenaar C. W., Sewell M. A. // Marine Biol. 2008. Vol. 154. Iss. 5. P. 855–865.
16. Hiramatsu N., Hara A., Hiramatsu K. et al. // Biol. of Reproduction. 2002a. Vol. 67. P. 655–667.
17. Hiramatsu N., Matsubara T., Weber G. M. et al. // Fisheries Sci. 2002c. Vol. 68. P. 694–699.
18. Izquierdo M. S., Fernández-Palacios H. A., Tacon G. J. // Aquaculture. 2001. Vol. 197. P. 25–42.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, N 1. P. 265–275.
20. Lucey S. M. Characteristics of fish yolk proteins and a method for inducing vitellogenin. 2009. P. 334.
21. Matsubara T., Koya Y. // J. of Exp. Zool. 1997. Vol. 278. P. 189–200.
22. Rainuzzo J. R., Reitan K. I., Olsen Y. // Aquaculture. 1997. Vol. 155. P. 103–115.
23. Reith M., Munholland J., Kelly J. et al. // J. of Exp. Zool. 2001. Vol. 291. P. 58–67.
24. Specker J. L., Sullivan J. L. // Perspectives in Comparative Endocrinology. 1995. P. 304–315.
25. Tocher D. R. // Rev. Fisheries Sci. 2003. Vol. 11. P. 107–184.

A. G. SHERELO, N. Y. YEVTUSHENKO

CONTENTS OF PROTEINS AND TOTAL LIPIDS IN EMBRYOGENESIS CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

Summary

Important indicators of quality eggs is the amount accumulated in the proteins and lipids that affect the success of embryo development. Processes of growth and development of fish embryos actually learn from a biochemical point of view, namely, as the dynamics of the accumulation and use of tissue protein in it – the main structural component of cell embryo. Relevant issues of energy supply of these processes during embryogenesis. In this context, the aim of this study was to determine the features of the dynamics of proteins and total lipids during embryonic development of carp.

The amount of protein and total lipids after fertilization eggs is reduced by almost two times, which is associated with the processes of proteolysis and cell division, which requires a considerable amount of energy. At subsequent stages of embryonic development occurs resynthesis of protein, resulting in its quantity increases. Because of the preparation for hatching eggs and destruction of membranes, the amount of protein in the final stages of development of eggs decreases. Whereas the amount of total lipids during embryonic development of carp remains approximately at the same level, rising after hatching, in relation to ensuring the viability prelarvae to its transition to exogenous feeding.