

УДК 597.554.3:577.3

ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ЯЙЦЕКЛЕТОК У ТАРАНИ И ЛЕЩА

Р. И. ГОШ, В. Н. ЖУКИНСКИЙ, Н. М. ПЕТРУНЬ

(Институт гидробиологии АН УССР, Киев)

Интенсивность энергетического обмена в незрелых овоцитах тарани и леща намного выше, чем в зрелых яйцеклетках. Отмечены межвидовые различия в соотношении энергетической эффективности дыхания и анаэробного гликолиза у тарани и леща.

Известно, что жизнедеятельность животных клеток оказывается возможной благодаря непрерывному притоку энергии, которая образуется в результате дыхания или анаэробного гликолиза. У рыб, как и у других позвоночных животных, энергетический обмен осуществляется анаэробным и аэробным путями. Он относительно хорошо изучен на соматических клетках. Что же касается половых клеток животных, то удовлетворительно изучена только энергетика сперматозоидов млекопитающих, гораздо хуже — рыб и совсем мало сведений об особенностях энергетического обмена яйцеклеток в процессе их созревания. Между тем для рыб в большинстве случаев характерно наружное оплодотворение гамет, что делает их удобным объектом для такого рода исследований. Последние же необходимы для теоретического обоснования поиска и разработки объективных экспресс-тестов рыбоводного качества икры.

Известные нам работы [4, 5, 8, 15] посвящены изучению дыхания овоцитов рыб. П. А. Коржув приводит интересные данные об интенсивности потребления кислорода неоплодотворенной икрой осетра, но, к сожалению, они основаны только на трех опытах. По данным М. Ф. Вернидуб, у судака переход овоцитов из IV стадии зрелости в текучее состояние (V стадия) сопровождается вначале плавным, а затем резким увеличением интенсивности дыхания (от 130 до 275%). Иную картину наблюдал А. Накано при росте и созревании овоцитов у медаки — *Oryzias latipes* (цит. по [15]): в период вителлогенеза начиная со стадии малых овоцитов и до начала рассасывания зародышевого пузырька интенсивность дыхания икры повышается более чем вдвое. В последующие 12 часов созревания (рассасывание зародышевого пузырька) она снижается до начального уровня и повышается вновь лишь после оплодотворения. Нам не известны литературные данные об интенсивности анаэробного гликолиза в овоцитах рыб до их созревания. Отсутствуют работы об аэробном и анаэробном типах расщепления углеводов в созревающих овоцитах. Эти противоречия и пробелы доказывают необходимость специальных исследований энергетического обмена овоцитов на последних стадиях их созревания у разных видов рыб.

Настоящее исследование ограничено определением уровня дыхания и анаэробного гликолиза и выяснением их энергетической эффективности в незрелой и зрелой икре тарани и леща.

Материал и методы. Опыты проводили в апреле—мае 1970—1971 гг. на плавлаборатории «Двина» в Нижнеднепровском запретном пространстве (Херсонская область). «Твердых» и «текучих» самок тарани и леща вылавливали на нерестилищах ночью ставными сетями и в живорыбной прорези не позднее 7—8 час утра доставляли к плавлаборатории. Овулировавшую икру от каждой подопытной самки отцеживали в отдельные фарфоровые выпарительные чашки. Незрелую (IV стадия зрелости) получали, вскрывая брюшко самки. Икру хранили при температуре 12—16°C до закладки серий опытов по дыханию и анаэробному гликолизу. Для опытов брали икру, визуально оцениваемую как «хорошая» или «отличная». Порции ее с признаками резорбции браковали.

Интенсивность дыхания и анаэробного гликолиза икры определяли манометрическим методом на аппарате Варбурга [10, 16] при температуре 20°C, близкой к оптимальной нерестовой для данных видов рыб и удобной для автоматического регулирования. Икру от каждой самки закладывали в сосудики двух манометров для последующего усреднения результатов. В опыт брали по 500 мг овулировавшей или незрелой икры; ее помещали в сосудики, куда наливали по 2 мл физиологического солевого раствора Рингера. Для связывания углекислого газа использовали 15% КОН — 0,3 мл на каждый сосудик. В столбик со щелочью помещали веерок фильтровальной бумаги (для лучшего связывания CO₂). Газовой фазой служил воздух. Интенсивность дыхания икры выражали в мм³ O₂/мг сухого веса·час.

Интенсивность анаэробного гликолиза определяли по методу Н. Т. Мешковой и С. Е. Северина [10]. 500 мг икры помещали в сосудик с рингер-бикарбонатным раствором (2 мл). Газовая смесь состояла из 95% N₂ и 5% CO₂. Интенсивность анаэробного гликолиза выражали в мм³ CO₂/мг сухого веса икры·час.

Порции икры от подопытных самок использовали как в опытах по измерению интенсивности дыхания, так и в опытах по определению уровня анаэробного гликолиза. Всего для оценки интенсивности дыхания незрелой икры проведено 66 опытов на тарани и 74 — на леще; для измерения уровня дыхания зрелой икры — 69 опытов на тарани и 58 — на леще. Такое же количество опытов соответственно проведено для оценки уровня анаэробного гликолиза как в незрелой, так и в зрелой икре тарани и леща.

Произведена попытка полученные данные об интенсивности дыхания и гликолиза овощей представить в эквивалентных энергетических величинах (кал/мг сухого веса икры) путем соответствующего перерасчета [3, 14].

Статистическое сравнение разных выборок производили общепринятыми способами [1].

Результаты исследований и их обсуждение

Определении интенсивности дыхания и анаэробного гликолиза незрелой икры и зрелых яйцеклеток тарани и леща потребовалось не только для того, чтобы представить себе уровни и выяснить особенности этих процессов у данных видов рыб, но главным образом с целью сопоставления характеристик обоих типов энергетического обмена яйцеклеток при их росте и созревании для более общих выводов.

Установлено (см. таблицу), что средний уровень дыхания незрелой икры тарани (IV стадия зрелости) составляет округленно 0,17 мм³ O₂, зрелой — 0,1 мм³ O₂ (n=69), т. е. более чем в полтора раза ниже. Статистическое сравнение этих показателей подтвердило высокую степень достоверности различий между ними (P<0,001). При сопоставлении интенсивности анаэробного гликолиза в незрелых овощах и в зрелых икринках тарани установлено, что его уровень в последних также ниже, чем в незрелых овощах: 0,435 против 0,513 мм³ CO₂/мг сухого веса·час. Хотя степень достоверности статистического различия и в этом случае высока (P<0,001), разница между средними величинами, характеризующими интенсивность анаэробного гликолиза тех и других овощей не столь велика, как в приведенном выше сравнении по интенсивности дыхания.

Интенсивность энергетического обмена незрелых и зрелых овоцитов у тарани и леща

Показатели энергетического обмена	Размерность	Тарань		Лещ	
		Незрелые овоциты	Зрелые овоциты	Незрелые овоциты	Зрелые овоциты
Интенсивность дыхания	$мм^3 O_2 / мг$ сухого веса $\cdot час$	0,17	0,10	0,170	0,140
	$кал / мг$ сухого веса $\cdot час$	$0,822 \cdot 10^{-3}$	$0,542 \cdot 10^{-3}$	$0,895 \cdot 10^{-3}$	$0,787 \cdot 10^{-3}$
Интенсивность анаэробного гликолиза	$мм^3 O_2 / мг$ сухого веса $\cdot час$	0,513	0,435	0,279	0,194
	$кал / мг$ сухого веса $\cdot час$	$0,632 \cdot 10^{-3}$	$0,525 \cdot 10^{-3}$	$0,319 \cdot 10^{-3}$	$0,225 \cdot 10^{-3}$

Полученные данные по интенсивности дыхания и анаэробного гликолиза овоцитов преобразованы в эквивалентные величины энергии путем следующих перерасчетов: 100 $мм^3$ поглощенного кислорода соответствует потреблению 0,134 мг глюкозы и освобождению 0,5 кал энергии; 100 $мм^3$ вытесненного при измерении гликолиза CO_2 соответствует 0,4 мг потребленной глюкозы и 0,128 кал освобожденной энергии. Однако в клетке используется не вся энергия; причем доля ее примерно одинакова как для процессов дыхания, так и для анаэробного гликолиза. Из рис. 1 видно, что как в незрелых овоцитах, так и в зрелых яйцеклетках освобождаемая в результате анаэробного гликолиза энергия измеряется относительно высокой величиной. Это особенно четко видно при сопоставлении энергии, выделенной в результате дыхания и гликолиза в зрелой икре тарани. Наблюдается незначительное преобладание энергии, выделенной при дыхании над количеством ее, выделенным в результате гликолиза ($0,542 \cdot 10^{-3}$ против $0,525 \cdot 10^{-3}$ кал). Однако статистическое сравнение и здесь показало высокую достоверность различия ($P < 0,001$). В незрелых овоцитах тарани аэробная энергия составляет относительно более высокую величину, чем анаэробная: $0,822 \cdot 10^{-3}$ против $0,632 \cdot 10^{-3}$ кал ($P < 0,001$).

При одновременном сопоставлении интенсивности дыхания и анаэробного гликолиза в овоцитах тарани прослеживается более общая закономерность изменения уровней этих процессов в зависимости от степени зрелости овоцитов. Из рис. 2 видно, что уровни как дыхания, так и анаэробного гликолиза в незрелых овоцитах у тарани намного выше, чем в зрелых яйцеклетках. Наши данные подтверждают результаты, полученные А. Накано при изучении дыхания растущих и созревающих овоцитов медаки.

Для сопоставления тех и других не только в разрезе сравнения «незрелые овоциты — зрелые яйцеклетки», но и в разрезе «овулировавшие яйцеклетки — оплодотворенные яйцеклетки» проведены дополнительные опыты с оплодотворенной икрой тарани на стадии 32—64 бластомеров. Уровень дыхания этой икры оказался значительно выше, чем у неоплодотворенной, полученной от тех же самок. Результаты этих пробных опытов хорошо согласуются с выводами П. А. Коржуева и А. Накано, показавшими на примере осетра и медаки, что дыхание оплодотворенной икры намного выше, чем неоплодотворенной.

Аналогичные эксперименты проведены на леще (см. рис. 1, 2). И в этом случае интенсивность дыхания незрелых овоцитов была намного выше, чем зрелых яйцеклеток (0,170 против 0,140 $мм^3 O_2 / мг$ сухого веса $\cdot час$, $P > 0,001$), и анаэробный гликолиз намного интенсивнее протекал в первых по сравнению со вторыми (0,269 против 0,194 $мм^3 CO_2$,

$P < 0,001$). Количество аэробной энергии незрелых овоцитов почти в 2,5 раза превышало количество энергии, выделенной в результате гликолиза: $0,895 \cdot 10^{-3}$ против $0,319 \cdot 10^{-3}$ кал ($P < 0,001$).

Очень интересные результаты дало сравнение анаэробной и аэробной энергии, выделенной в результате дыхания и анаэробного гликолиза

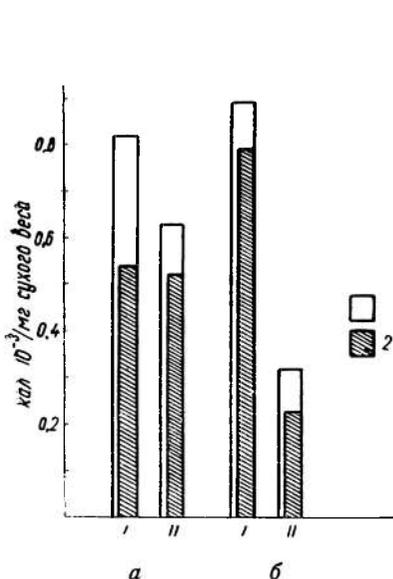


Рис. 1. Энергия, освобождаемая в результате дыхания (I) и гликолиза (II) в незрелых овоцитах (I) и зрелых яйцеклетках (2) тарантула (а) и лягушки (б).

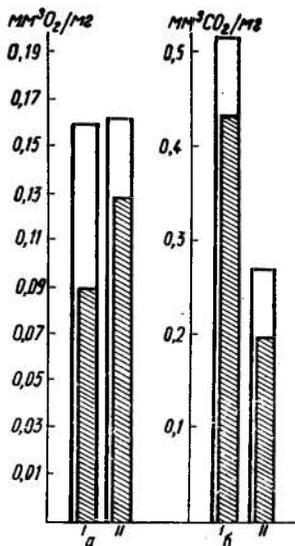


Рис. 2. Интенсивность дыхания (а) и анаэробного гликолиза (б) в незрелой (I) и зрелой (2) икре тарантула (I) и лягушки (II).

в зрелой икре лягушки. Аэробная энергия измерялась высокой величиной и превышала анаэробную в зрелых яйцеклетках в три раза; $0,787 \cdot 10^{-3}$ против $0,225 \cdot 10^{-3}$ кал/мг сухого веса.

Сравнение цифровых данных и диаграмм приводит к общему выводу, что в незрелых овоцитах тарантула и лягушки уровень дыхания и анаэробного гликолиза намного выше, чем в зрелых яйцеклетках. Окислительные процессы в оволировавшей икре резко затормаживаются. Низкий уровень окислительных процессов в неоплодотворенной икре предположительно можно объяснить накоплением веществ, подавляющих происходящие в яйцеклетках окислительные процессы. По-видимому, это обычные продукты обмена, которые после овоуляции в специфических условиях такой специализированной и маложизнеспособной клетки, каковой является гаплоидная яйцеклетка костистых рыб, становятся токсичными для нее. На наш взгляд, эта аутоинтоксикация и является основной причиной неуклонного угнетения метаболизма оволировавших яйцеклеток, так называемого «перезревания» икры в теле самок и вне его при неблагоприятных условиях размножения или хранения икры. Экскреторная функция зрелых яйцеклеток затруднена вследствие слабой проницаемости их оболочек, что препятствует выведению ингибиторов дыхания и анаэробного гликолиза из яйца наружу. Угнетение метаболизма зрелых яйцеклеток рыб вследствие аутоинтоксикации, дальнейшее их перезревание и так называемое «старение» яйцеклеток животных [2, 11, 12] имеют, на наш взгляд, единую биохимическую основу.

В подтверждение этой гипотезы нами проведены опыты по определению дыхания и анаэробного гликолиза в зрелых и «перезрелых» яйцеклетках леща. За 8 час перезревания яиц интенсивность дыхания понизилась на 50% ($0,124 \text{ мм}^3 \text{ O}_2$ в зрелых яйцеклетках леща против $0,064 \text{ мм}^3 \text{ O}_2/\text{мг}$ сухого веса·час в перезрелых, $n=29$). Резко снизился и уровень анаэробного гликолиза: $0,286$ против $0,153 \text{ мм}^3 \text{ CO}_2$.

Материал настоящей работы позволяет произвести сравнение показателей энергетического обмена еще в одной плоскости: между таранью и лещом (см. таблицу). Прежде всего обращает на себя внимание незначительное преобладание леща над таранью по интенсивности дыхания и его энергетической эффективности, более заметное на зрелых овоцитах у леща, и резкое преобладание интенсивности анаэробного гликолиза и его энергетического эквивалента, наоборот, у тарани. Между тем ранее нами [7] констатировалось, что уровень дыхания у зрелой икры леща гораздо ниже, чем у икры тарани: $27,6$ против $46,5 \text{ мм}^3 \text{ O}_2/\text{г}$ живого веса за первый час эксперимента.

Есть, однако, важное обстоятельство, которое, по всей видимости, является причиной и объяснением этого противоречия. Предыдущие эксперименты по изучению дыхания икры проводились во влажной атмосфере, без применения физиологического раствора. Их цель состояла в описании динамики дыхания овулировавшей икры в условиях, напоминающих наиболее неблагоприятные производственные условия хранения икры. Применение раствора Рингера было исключено, поскольку при длительном пребывании икринок в гипотоничном растворе (опыт длился 8 час) они набухают и теряют способность к оплодотворению.

Ценность приведенного сравнения заключается в том, что оно указывает на возможность существенного изменения уровня энергетического обмена и соотношения его основных типов в зависимости от условий проведения эксперимента, а также от реальных естественных и искусственных условий, в которых находится зрелая икра. Данное наблюдение необходимо учесть при разработке состава искусственных сред и иных условий хранения зрелой икры при заводском рыбозаведении. Вместе с тем оно указывает на наличие существенных межвидовых различий в энергетическом обмене овоцитов, что обязывает считаться также и с видовой спецификой этого процесса.

Выводы

1. Интенсивность дыхания и анаэробного гликолиза в незрелых овоцитах тарани и леща намного выше, чем в зрелых яйцеклетках. В результате дыхания образуется значительно больше энергии, чем в результате анаэробного гликолиза, что особенно четко проявляется на примере икры леща.

2. Интенсивность дыхания незрелой и зрелой икры тарани несколько ниже таковой у леща. При использовании раствора Рингера уровень анаэробного гликолиза незрелых овоцитов и зрелых яйцеклеток тарани почти в 1,5—2,5 раза превышает эти показатели для икры леща при тех же условиях эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейли Н. 1962. Статистические методы в биологии. ИЛ.
2. Браше Ж. 1961. Биохимическая эмбриология. ИЛ.
3. Вержбинская Н. А. 1954. Изменение ферментных систем энергетического обмена мозга в эволюционном ряду позвоночных животных. В сб.: «Биохим. нервн. сист.», К.
4. Вернидуб М. Ф. 1940. Некоторые данные по морфологии и физиологии яиц судака в период так называемой IV—V стадии зрелости. ДАН СССР, 29, 3.

5. Ее же. 1949. Обмен развивающегося эмбриона рыб при повреждении. Ученые записки ЛГУ, серия биол. 21.
6. Гинзбург А. С. 1968. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. Изд-во «Наука», М.
7. Жукинский В. Н., Гош Р. И. 1970. Жизнестойкость эмбрионов в зависимости от интенсивности дыхания овулировавшей икры у тарани и леща разного возраста. «Гидробиол. ж.», 4, 4.
8. Коржув П. А. 1941. Потребление O_2 икрой и мальками осетра. Изв. АН СССР, 2.
9. Крепс Е. М., Вержбинская Н. А. 1959. Обмен мозга в эволюции позвоночных. «Изв. АН СССР», 6, серия биол.
10. Мешкова Н. Т., Северин С. Е. 1960. Практикум по биохимии животных. Изд-во «Наука», М.
11. Borei H. 1948. Respiration of oocytes unfertilized eggs and fertilized eggs from *Psamme chinus* and *Asterias*. «Biol. Bull.», 95, 124.
12. Borei H. 1949. Independence of post-fertilization respiration in the sea urchin egg from the level of respiration before fertilization. «Biol. Bull.», 96, 117.
13. Lindahl P. E., Holter N. 1941. Über die Atmung der Oozyten erster Ordnung von Veränderung während der Reifung. «Lab. Carlsberg» (Ser. chim.), 24, 49.
14. Lipmann F. 1942. Pasteur effect. A simposium respiratory enzymes.
15. Monroy A., Tyler A. 1967. The activation of the eggs.
16. Warburg O. 1930. Metabolism of tumours. London.

Поступила 12. IV 1972 г.

THE INTENSITY OF ENERGETIC OUTFLOW THROUGH
THE IMMATURE OOCYTES AND MATURE OVARIAN EGGS
IN *RUTILUS RUTILUS HECKELI* (NORDMANN)
AND *ABRAMIS BRAMA* (LINNAEUS)

R. I. GOSH, V. N. ZHUKINSKI, N. M. PETRUN

(Institute of Hydrobiology, Academy of Sciences Ukrainian SSR, Kiev)

Summary

The intensity of the energetic outflow through the immature oocytes is far higher than in mature ovarian eggs. The interspecific differences in the energetic efficiency of respiration and anaerobic glycolysis in considered species are pointed out.