

© М. А. Обогрелова

УДК 59 + 639.2/.6

## МОРФОГЕНЕЗ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЭМБРИОНОВ И ЛИЧИНОК КАРПА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АНТИОКСИДАНТА «ТИОФАН» В КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

М. А. Обогрелова (Новосибирск, Россия)

*В процессе внутриклеточного пищеварения в результате окисления липидов образуются высокотоксичные продукты свободнорадикального окисления – малоновый диальдегид и диеновые конъюгаты. Данное состояние характеризуется как окислительный стресс, в результате которого повышается активность свободнорадикального окисления и происходит депрессия системы антиоксидантной защиты. Автором статьи изучено влияние окислительного стресса на морфофункциональное состояние органов пищеварительной системы эмбрионов и личинок зеркального карпа, полученных при традиционной и инновационной технологиях разведения. Установлена роль свободнорадикального перекисного окисления липидов в повреждении клеток эпителия слизистой оболочки кишечника личинок карпа. Обработка икры антиоксидантом «Тиофан» в критические периоды развития обеспечивает рациональное использование ресурсов трофического материала желтка в эмбриональный период и способствует раннему формированию оптимальной формы тела. Обосновано, что применение антиоксиданта «Тиофан» в критические периоды развития позволяет нормализовать пищеварительные процессы в организме рыб и повысить их адаптивный потенциал.*

**Ключевые слова:** оплодотворение, икра, эмбрион, предличинка, личинка, пищеварение, окислительный стресс, антиоксидант «Тиофан», критические периоды развития, морфогенез.

Считается, что разведение рыб в контролируемых условиях аквакультуры позволяет достичь более высоких показателей выживаемости и темпов роста молоди рыб, по сравнению с их воспроизводством путем естественного нереста [1–3]. В соответствии со Стратегическим планом развития аквакультуры до 2020 г. малым фермерским рыбноводным хозяйствам отводится важная роль в развитии рыбопромышленного комплекса. Основой их

развития служат пруды, малые водохранилища и небольшие озера с нестабильным гидрохимический режим в весенне-летний период. Использование водозабора для инкубации и подращивания молоди из естественных водоемов с высоким содержанием различных видов низших растительных организмов несет угрозу суточного изменения газового режима в водной среде, обусловленную прохождением ночной фазы фотосинтеза [3, 6, 7].

\* Статья подготовлена в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «НГПУ» на 2012–2016 гг., конкурс молодых ученых.

**Обогрелова Марина Александровна** – аспирант кафедры химии, Новосибирский государственный педагогический университет.  
E-mail: [gobeleno@yandex.ru](mailto:gobeleno@yandex.ru)

Развитие гипоксии и связанные с ней «ночные заморы» рыб являются следствием несовершенных механизмов их адаптации и требуют направленного воздействия на неспецифические механизмы реализации гипоксических повреждений клеток различных органов. В этой связи разработка и внедрение в практическую сферу деятельности инновационных технологий разведения объектов прудового рыбоводства, направленных на повышение адаптации рыб к действию абиотических факторов среды, является одним из приоритетных направлений аквакультуры.

Вместе с тем, роль свободнорадикального перекисного окисления липидов в механизмах структурно-функциональных нарушений клеток и тканей эмбрионов рыб в критические периоды эмбрионального развития в литературных источниках освещена крайне недостаточно.

С точки зрения фундаментальной биологии, изучение влияния активных кислородных метаболитов на формирование органов пищеварительной системы рыб позволит подойти к решению проблемы управления морфогенетическими процессами в организме рыб на ранних этапах онтогенеза.

Отсутствие эффективных технологий управления свободнорадикальными процессами в организме рыб на ранних этапах онтогенеза, а так же информации в отношении влияния свободнорадикальных процессов на морфофункциональное состояние органов пищеварительной системы карпа определяют актуальность настоящего исследования.

**Цель исследования:** изучить морфогенез органов пищеварительной системы эмбрионов и личинок карпа при использовании антиоксиданта «Тиофан» в

критические периоды эмбрионального развития.

#### **Материалы и методы исследования.**

Исследования проводили на эмбрионах и личинках рыб породы алтайский зеркальный карп. Икру, полученную от одной самки и оплодотворенную половыми продуктами одного самца, помещали для обесклеивания молоком в два аппарата Вейса по 100 тыс. икринок в каждом. Первый аппарат был контрольным, второй – опытным. В опытном аппарате икру обрабатывали суспензией 1 %-го масляного раствора «Тиофан» в течение 10 минут за полчаса до наступления соответствующей критической фазы эмбрионального развития. Точки отбора проб совпадали с 4 критическими фазами развития, которые приходились на 1, 5, 7, 9 и 60 часов эмбриогенеза. В контрольном аппарате икру обрабатывали масляной суспензией без содержания антиоксиданта «Тиофан» в аналогичные временные интервалы. Все исследования проводили в 10 повторях.

Наблюдение за развитием эмбрионов и личинок карпа осуществляли на нативных препаратах. Для изучения морфофункционального состояния клеток и тканей эмбрионов и личинок карпа срезы окрашивали гематоксилином Бемера и эозином. Кислые гликозаминогликаны (ГАГ) выявляли альциановым синим по Сиддмену. Измерение морфометрических параметров проводили с помощью комплекса программ AxioVision (KarlZeiss, Германия). Биохимические параметры окислительного стресса определяли в гомогенатах тканей рыб спектрофотометрически при соответствующей длине волны по общепринятым методикам. Различия показателей животных экспериментальной группы по сравнению с контрольной

оценивали методом вариационной статистики по t-критерию Стьюдента.

**Результаты исследований.** Известно, что в эмбриональный период рост и развитие карпа осуществляется исключительно за счет пластических и энергетических ресурсов желтка. На первых этапах дробления его содержимое транспортируется с током цитоплазмы к анимальному полюсу яйца, где под действием протеолитических систем осуществляется процессы внутриклеточного пищеварения [2, 4, 7].

По данным литературных источников, а так же собственных исследований, в более поздней стадии бластулогенеза основную роль в осуществлении трофической функции зародыша играет клетки перибласта [4, 5]. На препаратах животных контрольной и опытной групп отчетливо заметно, что клетки перибласта формируют многоядерную структуру в форме синцития. В различных отделах желтка данные клетки характеризующихся разной степенью активности.

Результаты проведенных исследований показали, что у животных обеих групп высокая функциональная активность клеток перибласта наблюдается в каудальном отделе.

На стадии предличинки кишечник рыб не сформирован, но структура пищеварительной трубки имеет характерное гистологическое строение [8]. Пищеварительная трубка изнутри выстлана однослойным призматическим эпителием.

Пищеварительные железы, в частности печень, является функционально неактивной, что обусловлено отсутствием на данном этапе эмбрионального развития полноценного полостного пищеварения [8].

При отсутствии сформированной пищеварительной трубки функциональная

активность клеток перибласта обеспечивает деградацию трофического материала желтка и обеспечивает активный рост и развитие эмбриона. По данным литературы, синтез клетками синцития ферментов подтверждает его участие не только в «переваривании» желтка, но и участие перибласта в синтетических процессах, с использованием соединений *de novo*, образующихся при расщеплении желтка [4–6]. Это явилось основанием считать, что функция перибласта в эмбриогенезе костистых рыб аналогична той, которую у взрослых организмов выполняет кишечник, печень и поджелудочная железа.

На гистологических и нативных препаратах свободных эмбрионов карпа контрольной группы заметно, что в каудальном отделе желтка содержание трофического материала значительно ниже, чем в аналогичных образцах животных опытной группы. Данный факт, возможно, объясняется повышенным окислением и расходом липидов, а так же белков при окислительном стрессе. При этом высокий распад липидов обусловлен вовлечением ненасыщенных жирных кислот икры в свободно радикальное окисление. Недостаток липидов в качестве энергетического материала, компенсируется повышенным расходом белков в связи с его использованием в качестве пластического материала для построения тела эмбриона, энергетического материала, а также для синтеза белковых соединений антиоксидантной защиты. Доказательством повышенного расхода белка у эмбрионов контрольной группы явились данные биохимического анализа, которые показали, что содержание белка у предличинки контрольной группы на 49,42 % меньше, чем содержания белка у эмбрионов опытной группы.

Вместе с тем, морфологические признаки активности клеток и состояние трофического материала желтка в его различных отделах у животных опытной и контрольной групп, имеют существенные различия.

У животных контрольной группы высокоактивные, в отношении гидролитической активности клетки локализованы в каудальном и лишь при переходе краниального отдела желтка в каудальный. У предличинок опытной группы высокая функциональная активность клеток перибласта в отношении расщепления компонентов желтка регистрируется по наличию гомогенного оксифильного и альцианпозитивного вещества в каудальном отделе, а так же в краниальном отделе со стороны вентральной поверхности.

Данные признаки позволяют считать, что расход трофического материала у животных опытной группы в данных компартментах желтка способствует уплощению его формы в дорсо-вентральном направлении. Это обеспечивает формирование у предличинки адаптированной к свободному передвижению более обтекаемой формы тела, по сравнению с контрольными образцами.

В связи с низкой активностью клеток перибласта в процессе регуляции темпов роста и развития тела предличинки контрольной группы, должны существовать альтернативные механизмы, обеспечивающие рост и развитие особи. Результаты исследования показали, что при низкой активности клеток перибласта в процессе пищеварения, в условиях повышенного требования к пластическим и энергетическим материалам, адаптационно включаются механизмы полостного пищеварения.

На гистологических препаратах животных контрольной группы заметно, что

активные клетки перибласта располагаются в краниальном отделе со стороны дорсальной поверхности в области вхождения пищеварительной трубки в полость желточного мешка. Наличие низкого кубического эпителия стенки желточного протока, в отличие, от высокого призматического эпителия кишечной трубки может свидетельствовать об участии эпителия желточного протока лишь в транспорте трофического материала. В провизорном пищеварении клетки желточного протока участия не принимают. Наличие расщепленного клетками перибласта желтка в области желточного протока может указывать на возможность его транспорта в полость в кишки, а следовательно, о преждевременном переходе на полостное пищеварение, которое на данном этапе развития не может функционировать в связи с незрелостью пищеварительной трубки.

Результаты исследования показали, что локализация активных клеток перибласта совпадает с топографией кровеносных сосудов желточного мешка: кювьеровыми протоками, печечно-желточной и подкишечно-желточной венами, а так же сосудами тела предличинки: собственно-подкишечной, каудальной веной и сегментарными сосудами хвостового синуса. С нашей точки зрения, это объясняется тем, что в эмбриональный период развития рыб кровеносная система выполняет не столько дыхательную функцию, а главным образом, осуществляет транспорт веществ. Мощно развитая сеть сосудов и капилляров желточного мешка, а также сосудов тела предличинки карпа опытной группы, по сравнению с группой контроля, может свидетельствовать о более высокой скорости провизорного пищеварения.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили изучить особенности формирования провизорной пищеварительной системы карпа и выявить в структуре желточного мешка компартменты с высокой и низкой метаболической активностью; обосновать зависимость топографии сосудов желточного мешка от расположения метаболических центров желтка с высокой и низкой активностью.

Результаты биохимического анализа показали, что в динамике возрастных изменений с 3 по 5 сутки в гомогенатах тканей эмбрионов и личинок контрольной группы происходит увеличение продуктов свободнорадикального окисления, в частности, отмечается увеличение диеновых конъюгатов практически в 2 раза, при этом, снижение активности каталазы происходит более, чем в 10 раз, по сравнению с соответствующими образцами животных опытной группы. Полученные результаты позволяют считать, что в данный период развития эмбрионы и личинки испытывают влияние окислительного стресса.

Несмотря на то, что как в контрольных, так и в опытных образцах показатели окислительного стресса на 7 сутки нивелируются, в исследуемые промежутки времени, начиная от оплодотворения и до 7-х суток, антиоксидант «Тиофан» оказывал протективный эффект на клетки и ткани формирующихся органов эмбрионов и личинок. Следовательно, эмбрионы карпа, которым вводили антиоксидант «Тиофан» на ранних этапах онтогенеза, имели преимущества в пролиферации и дифференцировки клеток, по сравнению с контрольными образцами.

В связи с тем, что антиоксидант «Тиофан» не обладает кумулятивным

эффектом и достаточно быстро выводится из организма, его положительное действие ограничивается 7 сутками. Высокий уровень каталазы можно объяснить участием данного антиоксиданта в инактивации гидроперекиси, которая может образовываться в результате активного пищеварения эмбрионов опытной группы, по сравнению с контрольными образцами. Об этом свидетельствуют данные морфогистохимического анализа.

Результаты исследования эффективности влияния антиоксиданта тиофана на морфофункциональное состояние органов пищеварительной системы зеркального карпа показали, что у личинок карпа в возрасте 3-х суток, эмбрионы которых были обработаны антиоксидантом тиофаном и маслом, интенсивность процессов пищеварения имела существенные различия. У личинки карпа контрольной группы в полости кишечника обнаруживается зоо- и фитопланктон. При этом, результаты гистологического анализа содержимого кишечной трубки позволяют регистрировать лишь активное участие пищеварительных желез и эпителия кишечника в отношении фитопланктона. Элементы зоопланктона присутствуют в слабо переваренном виде.

Результаты морфо-гистохимического анализа содержимого пищеварительной трубки личинок карпа, икра которых в процессе инкубации обрабатывалась антиоксидантом тиофаном в критические периоды развития, свидетельствуют, что зоо- и фитопланктон находился в интенсивно переваренном состоянии.

### ***Заключение.***

Полученные данные подтверждают высказанную гипотезу о том, что в условиях искусственного разведения зеркального карпа технологические процессы оказывают

влияние на формирование провизорного пищеварения. При этом, существенное влияние на структурно-функциональную организацию пищеварительной системы в эмбриональный период оказывает свободно-радикальный механизм. Использование

антиоксиданта тиофана в технологических процессах разведения карпа дает возможность управления морфогенезом органов пищеварительной системы карпа не только в эмбриональный, но и личиночный период.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Гамыгин Е. А.** Проблема кормов и кормопроизводства для рыб: состояние и задачи // Сб. науч. тр. ВНИИПРХ.– М., 2001. – Вып. 77, Т.3. – С. 81– 82.
2. **Ивлев В. С.** Зависимость интенсивности обмена у рыб от веса их тела // Физиол. журн. – Т.40, № 6. – М., 1954. – С. 717–721.
3. **Канидьев А. Н.** Биологические основы искусственного разведения лососевых рыб. – М., 1984. – 216 с.
4. **Новиков Г. Г.** Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе. – М., 2000. – 296 с.
5. **Новиков Г. Г.** Особенности роста зародыша и закономерности утилизации запасного белка в желтке в раннем онтогенезе пинагора при разных температурах развития // Вестник МГУ, 1988. – С. 7–12.
6. **Соин С. Г.** Приспособительные особенности развития рыб. – М., 1968. – 89 с.
7. **Строганов А. Н.** Закономерности изменения потребления кислорода и особенности энергетического обмена у некоторых видов рыб на ранних этапах онтогенеза при различных значениях абиотических факторов: дис. ...канд. биол. наук. – М.: МГУ, 1987. – 151 с.
8. **Уголев А. М.** Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – СПб., 1993. – 240 с.
9. **Tátrai István** Influence of temperature, rate of feeding and body weight on nitrogen metabolism of bream, *Abramis brama* L // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, Volume 83, Issue 3, 1986, Pages 543–547.

© *M. A. Obogrelova*

UDC 59 + 639.2/.6

## MORPHOGENESIS OF THE DIGESTIVE SYSTEM OF EMBRYOS AND LARVAE CARP OF THE USE "THIOPHAN" ANTIOXIDANTS IN A CRITICAL PERIOD OF EMBRYONIC DEVELOPMENT

*M. A. Obogrelova (Novosibirsk, Russia)*

*Damage of caviar in the course of an artificial fertilization, and also the high expense of trophic substances of a yolk of caviar during the period blastulogenesis are accompanied by intensive oxidation of lipids with superfluous formation free radicals bonds. In the course of intracellular digestion as a result of oxidation of lipids high-toxic products free radicals oxidations – malondialdehyde and diene conjugates are certainly formed. This condition is characterized as oxidative stress, which increases the activity of free radical oxidation and is depressed antioxidant defense system. The effect of oxidative stress on morphofunctional condition of the digestive system embryos and larvae of mirror carp produced by traditional and innovation breeding technologies. The role of lipid peroxidation in damage to the epithelial cells of the intestinal mucosa of larvae carp. Caviar processing "Thiophane" antioxidant at critical periods of development ensures the rational use of material resources trophic yolk in the embryonic period and contributes to early formation of optimum body shape. "Thiophane" antioxidants during critical periods of development helps to normalize the digestive processes in fish and increase their adaptive capacity.*

**Key words:** *fertilization, caviar, embryo, prelarva, larva, digestion, oxidative stress, antioxidant «Thiophan», critical periods of development, morphogenesis.*

### REFERENCES

1. **Gamygin E. A.** The problem of feed and forage for fish: status and problems // Sat scientific. Tr. VNIIPRKh.– M., 2001. – No. 77, V. 3. – pp. 81 – 82. In Russia
2. **Ivlev V. S.** The intensity of metabolism in fish of their body weight // Physiology. Journal. – V. 40, № 6. – M., 1954. – pp. 717–721. In Russia
3. **Kanidev A. N.** Biological basis of hatchery salmon. – M., 1984. – 216 p. In Russia
4. **Novikov G. G.** Growth and energy development of bony fish in early ontogenesis. – M., 2000. – 296 p. In Russia
5. **Novikov G. G.** The growth characteristics and patterns of utilization of embryo storage protein in the yolk in early ontogeny pinagora at different temperatures for development. – MSU, 1988. – Pp. 7–12. In Russia
6. **Soin S. G.** Adaptive features of fish. – Moscow, 1968. – 89 p. In Russia
7. **Stroganov A. N.** Patterns of change in oxygen consumption and characteristics of energy metabolism in certain species of fish in the early stages of ontogeny at different abiotic factors. dis. ... candidate. biol. science. – Moscow : Moscow State University, 1987. – 151 p. In Russia
8. **Ugolev A. M.** Digestive processes and adaptation in fish. – SPb., 1993. – 240 p. In Russia



9. **Tátrai István** Influence of temperature, rate of feeding and body weight on nitrogen metabolism of bream, *Abramis brama* L // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, Volume 83, Issue 3, 1986, Pages 543–547.

---

**Obogrelova Marina Aleksandrovna** – the post-graduate student of faculty of chemistry, Novosibirsk State Pedagogical University.

E-mail: [gobeleno@yandex.ru](mailto:gobeleno@yandex.ru)