

## СКОРОСТЬ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА В ЗАРОДЫШЕВОМ РАЗВИТИИ РОГОВОЙ КАТУШКИ *PLANORBARIUS CORNEUS* (GASTROPODA)

© 2017 г. А. А. Зотин\*, Е. Ф. Кирик

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

\*E-mail: aazotin@mail.ru

Поступила в редакцию 22.07.2016 г.

Окончательный вариант получен 07.10.2016 г.

Исследован энергетический обмен у роговой катушки *Planorbarius corneus* в зародышевом развитии. Показано, что скорость потребления кислорода постоянно увеличивается в процессе эмбриогенеза. Интенсивность дыхания (скорость потребления кислорода на единицу объема зародыша) первоначально повышается, а затем плавно уменьшается вплоть до вылупления моллюсков. На ранних этапах развития вплоть до стадии ранней трохофоры зародыш не растет, и, следовательно, изменение скорости потребления кислорода в этот период не связано с изменением объема зародыша. Снижение интенсивности дыхания начинается одновременно с началом роста зародыша на стадии средней трохофоры. Начиная со стадии средней трохофоры и вплоть до вылупления, взаимозависимость между скоростью потребления кислорода и объемом зародыша может быть описана аллометрическим уравнением со степенным коэффициентом равным примерно 0.23.

**Ключевые слова:** зародышевое развитие, скорость потребления кислорода, энергетический обмен, брюхоногие моллюски, роговая катушка

DOI: 10.7868/S0475145017040097

### ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования энергетического обмена беспозвоночных показали, что интенсивность дыхания (скорость потребления кислорода на 1 г массы тела) постоянно снижается после первоначального увеличения в раннем постларвальном развитии (Винберг, 1956, 1977; Зотин А.И., 1974; Зотин А.И., Зотина, 1993; Озернюк, 1985, 2000; Шмидт-Ниельсен, 1987). Хорошо обоснована экспериментальными данными степенная (аллометрическая) взаимосвязь между скоростью потребления кислорода и массой тела с неизменными коэффициентами на протяжении всего постларвального (постнатального) онтогенеза (Зотин А.И., 1974; Винберг, 1977; Шмидт-Ниельсен, 1987; Озернюк, 2000).

Работ, посвященных энергетическому обмену зародышей, сравнительно немного. Однако их результаты позволяют говорить о том, что указанные выше закономерности для зародышей соблюдаются далеко не всегда. Например, в зависимости от вида животного наблюдается как постоянное снижение интенсивности дыхания в эмбриогенезе (Romanoff, 1967; Клейменов, 1991; Зотин А.И., Зотина, 1993; Владимирова и др., 2005), так и увеличение интенсивности дыхания на некоторых этапах зародышевого развития (Зотин А.И., 1966; Зотин А.И.,

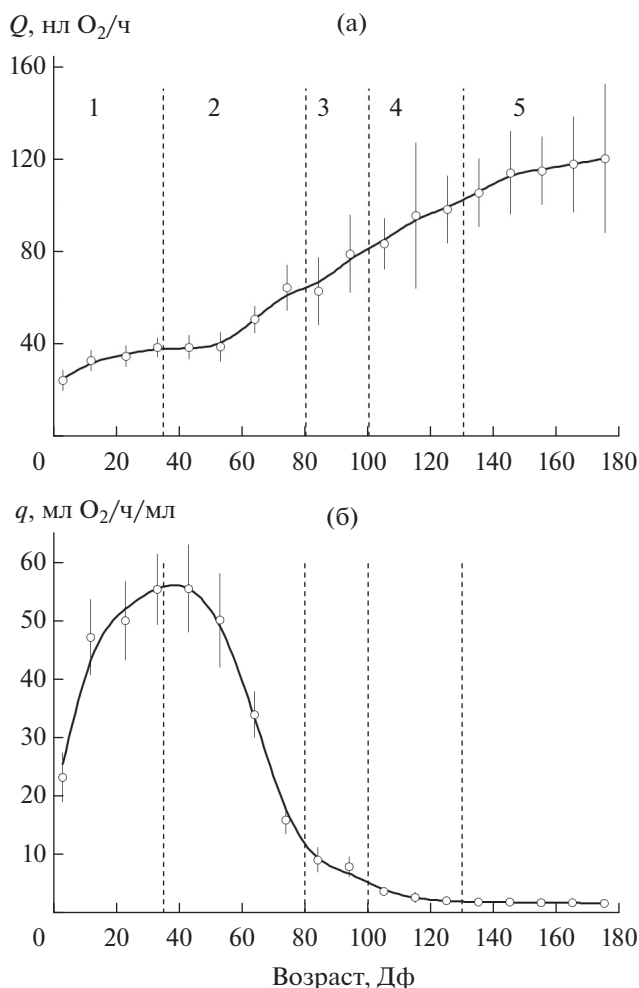
Зотина, 1993; Владимирова и др., 2003; Радзинская и др., 2003; Зотин А.А., Клейменов, 2006). У некоторых видов увеличение интенсивности дыхания отмечено на протяжении всего эмбриогенеза (Wills, 1936; Озернюк, Лелянова, 1985).

Коэффициенты аллометрической зависимости скорости потребления кислорода от массы тела у зародышей, как правило, отличаются от соответствующих коэффициентов для более поздних стадий развития тех же животных (Радзинская, Никольская, 1982; Озернюк, Лелянова, 1985; Радзинская и др., 2003; Зотин А.А., Клейменов, 2006). На куриных зародышах было показано, что значения аллометрических коэффициентов могут меняться и в процессе самого эмбриогенеза (Клейменов, 1996).

Для выявления специфических для зародышевого периода закономерностей изменения энергетического обмена требуется, в первую очередь, накопление как можно большего числа данных для животных разных видов. В настоящей работе представлены результаты исследования изменения скорости потребления кислорода в зародышевом развитии роговой катушки *Planorbarius corneus*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кладки *Planorbarius corneus* получали от родительских особей, разводимых в лабораторной



**Рис. 1.** Изменение скорости потребления кислорода (а) и интенсивности дыхания (б) в эмбриогенезе *P. corneus*. По оси абсцисс — биологическое время Детлаф. Кружки — средние значения; планка погрешностей — стандартная ошибка среднего; линии — сглаживание кубическими сплайнами. Вертикальные пунктирные линии — границы стадий развития. Цифры — стадии развития: 1. дробление, бластула и гаструла, 2. трохофора, 3. велигер, 4. великонха, 5. зародыш, прошедший метаморфоз.

аквакультуре, и содержали по отдельности в чашках Петри в отстоянной аэрированной водопроводной воде объемом 10 мл при постоянной температуре 25°C. Воду меняли 2 раза в неделю. Для измерения потребления кислорода несколько кладок (от 1 до 9) помещали в изолированные стеклянные сосуды объемом 20 мл, полностью заполненные водой, и выдерживали при постоянной температуре 25°C в течение 10–14 ч. Количество зародышей в каждом сосуде варьировало от 15 до 60 экз. Измерение количества растворенного в воде кислорода проводили с помощью оксиметра Orion Star A223 RDO/DO portable meter (“Thermo Fisher Scientific”, USA) (Thermo..., 2015). В контрольных

сосудах (только с водой) проводили измерения в те же сроки, что и в эксперименте. Количество потребленного кислорода ( $P$ ) определяли по формуле:  $P = (a_0 - a_1) - (c_0 - c_1)$ , где  $a_0$  и  $a_1$  — количество кислорода в воде до и после инкубации кладок соответственно;  $c_0$  и  $c_1$  — аналогичные значения в контрольных сосудах.

Для определения размеров зародышей проводили микровидеосъемку кладок в течение 10 мин под стереоскопическим микроскопом МБИ-10 (Россия) с помощью цифровой видеокамеры DCM800 (Micromed, Russia) и программного обеспечения ScopePhoto software (version 3.1.386, ScopeTek, China). Размеры зародышей определяли путем измерения их изображений с использованием программы Excel с точностью 1 мкм. Приблизительный объем зародышей вычисляли по формуле объема эллипсоида:  $V = \pi l d h / 6$ , где  $V$  — объем зародыша,  $l$ ,  $d$ ,  $h$  — длина, высота и ширина зародыша соответственно.

Среднюю скорость потребления кислорода одним зародышем ( $Q$ ) рассчитывали путем деления количества суммарно потребленного кислорода ( $P$ ) на промежуток времени, в течение которого проводили измерение, и на количество зародышей. Интенсивность дыхания рассчитывали по формуле  $q = Q/V$ .

Данные по линейному росту зародышей *P. corneus* приведены в работе Зотин А.А., Кирик (2016). В этой работе показано, что начиная со стадии великонхи зародыши в разных кладках растут либо по ускоренному, либо по замедленному типу. В данной работе измерение скорости потребления кислорода на стадиях от великонхи до вылупления измеряли только для кладок, зародыши в которых росли по ускоренному типу.

Всего исследовано 85 кладок с 881 зародышами.

Стадии развития зародышей определяли по таблицам, приведенным в работе Zotin, Kirik (2014).

Для сопоставления полученных данных с данными других авторов использовали единицы биологического времени  $\tau$ , предложенные Детлаф (Детлаф, Детлаф, 1982; Детлаф, 2001). Расчет биологического времени проводили по формуле:  $\tau = t/\tau_0$ , где  $\tau$  — биологическое время (Дф);  $t$  — физическое время развития при 25°C (ч);  $\tau_0$  — промежуток времени между метафазами последовательных делений дробления при 25°C (ч/Дф). В соответствии с калибровочной прямой (Zotin, Kirik, 2014)  $\tau_0$  может быть рассчитан по формуле:  $\tau_0 \approx 770t^{-2.06}$ , где  $t$  — температура (°C). Для 25°C  $\tau_0 \approx 1.0$  час.

Линии тренда на рис. 1 получены при помощи сглаживающего кубического сплайна.

Скорость потребления кислорода  $Q$  и интенсивность дыхания  $q$  в процессе зародышевого развития *P. corneus*

Номер и название стадии развития	$\tau$ , Дф	$V$ , нл	$Q$ , нл $O_2$ /ч	$q$ , мл $O_2$ /ч/мл	$N$	$n$
1–9. Дробление	3	0.7	$24.2 \pm 4.4$	$23.1 \pm 4.2$	17	289
10–15. Бластула	12	0.7	$32.7 \pm 4.4$	$46.9 \pm 6.4$	26	566
16–17. Гастрюла	23	0.7	$34.7 \pm 4.7$	$49.8 \pm 6.7$	19	332
18. Поздняя гастрюла	33	0.7	$38.4 \pm 4.2$	$55.1 \pm 6.0$	18	324
19. Ранняя трохофора	43	0.7	$38.5 \pm 5.2$	$55.3 \pm 7.4$	5	114
20. Средняя трохофора	53	0.8	$38.7 \pm 6.2$	$49.9 \pm 8.0$	8	188
20. Средняя трохофора	64	1.5	$50.5 \pm 5.8$	$33.8 \pm 3.9$	20	227
21. Поздняя трохофора	74	4.1	$64.2 \pm 9.8$	$15.8 \pm 2.4$	7	135
22. Ранний велигер	84	6.9	$62.7 \pm 14.4$	$9.0 \pm 2.1$	7	114
23–24. Средний и поздний велигер	94	10.0	$78.8 \pm 16.7$	$7.9 \pm 1.7$	10	167
25. Ранняя великонха	105	22.9	$83.2 \pm 10.9$	$3.6 \pm 0.5$	14	170
25. Средняя великонха	115	36.2	$95.3 \pm 31.4$	$2.6 \pm 0.9$	3	31
25. Поздняя великонха	125	47.4	$97.9 \pm 14.5$	$2.1 \pm 0.3$	14	197
26. Ранний ползающий зародыш	135	55.9	$105.2 \pm 14.6$	$1.9 \pm 0.3$	5	127
27. Средний ползающий зародыш	145	62.2	$113.8 \pm 17.8$	$1.8 \pm 0.3$	5	24
28. Поздний ползающий зародыш	155	66.5	$114.7 \pm 14.7$	$1.7 \pm 0.2$	3	28
29/1. Вылупляющийся зародыш	170	69.5	$117.5 \pm 20.6$	$1.7 \pm 0.3$	6	52
29/2. Начало вылупления	190	72.9	$120.0 \pm 32.1$	$1.6 \pm 0.5$	5	48

Примечание:  $\tau$  – биологическое время, Дф (при 25°C 1 Дф = 1 час);  $V$  – объем одного зародыша;  $Q$  – скорость потребления кислорода одним зародышем;  $q$  – интенсивность дыхания в расчете на одного зародыша;  $N$  – число измерений,  $n$  – число зародышей. Для  $Q$  и  $q$  приведены средние значения и стандартная ошибка среднего.

Взаимозависимость скорости потребления кислорода и объема зародышей аппроксимировали степенным (аллометрическим) уравнением:

$$Q = aV^k, \quad (1)$$

где  $a$  и  $k$  – аллометрические коэффициенты. Возможность использования аллометрического уравнения оценивали с помощью критерия нелинейности (Зотин А.А., 2000).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Скорость потребления кислорода зародышами в целом возрастает в течение всего эмбриогенеза. Исключение составляет период от поздней гастрюлы до средней трохофоры, на протяжении которого скорость потребления кислорода остается постоянной (таблица; рис. 1а).

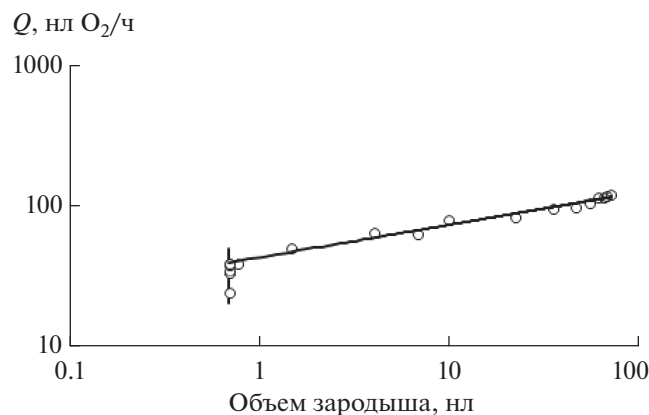
Интенсивность дыхания увеличивается на ранних стадиях развития и достигает максимума на стадии ранней трохофоры. Затем, одновременно с началом роста зародыша, наблюдается по-

степенное плавное уменьшение этого параметра вплоть до вылупления (таблица; рис. 1б).

Взаимосвязь скорости потребления кислорода зародышами и их объема представлена на рис. 2. Как видно из рисунка, степенная функция не может быть применена для зародышей *P. corneus* на всем протяжении зародышевого развития. Это подтверждается критерием нелинейности с достоверностью  $p < 0.01$ . Однако, если исключить ранний эмбриогенез (до стадии ранней трохофоры), в течение которого изменение скорости потребления кислорода не коррелирует с изменением объема, то в течение последующего эмбриогенеза зависимость между скоростью потребления кислорода и объемом хорошо аппроксимируется аллометрическим уравнением (1) с коэффициентами  $a = 3.76 \pm 0.03$  нл  $O_2$ /(ч нл<sup>k</sup>);  $k = 0.230 \pm 0.009$ .

### ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление полученных данных с данными других авторов затруднено, поскольку в боль-



**Рис. 2.** Зависимость скорости потребления кислорода ( $Q$ ) от объема зародыша. Кружки – экспериментальные данные. Линии – аппроксимация аллометрической зависимостью (1).

шинстве работ, посвященных исследованию энергетического обмена у зародышей, объем (или массу) зародышей не определяли, а в тех работах, в которых приводятся значения интенсивности дыхания, расчет производили на единицу массы целого яйца, имеющего, как правило, неизменные размеры (Wills, 1936; Зотин А.И., 1966; Озернюк, Лелянова, 1985; Зотин А.И., Зотина, 1993; Озернюк, 2000; Владимирова и др., 2003; Радзинская и др., 2003). Во всех этих работах показано постоянное, часто неравномерное, увеличение скорости потребления кислорода в зародышевом развитии. Это вполне согласуется с данными, полученными нами (рис. 1а).

Увеличение интенсивности дыхания от стадии дробления до стадии гастрюлы, вероятно, характерно для большинства животных и было, в частности, показано для большого прудовика (Зотин А.А., Клейменов, 2006), морских ежей (Ohnishi, Sugiyama, 1963), атлантического лосося (Озернюк, Зотин, 1983) и мышей (Mills, Brinster, 1967; Quinn, Wales, 1971). Возрастание интенсивности дыхания в этот период, по-видимому, связано с инициализацией и прогрессивным нарастанием процессов, требующих значительных затрат энергии: экспрессии генов, пролиферации и миграции клеток и т.п.

Увеличение интенсивности дыхания на более поздних этапах продемонстрировано для зародышей рыб (Озернюк, Лелянова, 1985) и амфибий (Wills, 1936; Владимирова и др., 2003). В то же время у других животных в этот период наблюдается постоянное уменьшение интенсивности дыхания (при расчете на единицу объема или массы зародыша). Уменьшение интенсивности дыхания показано как для позвоночных животных: рептилий (Клейменов, 1991; Владимирова и др., 2005), птиц (Клейменов, 1996), млекопитающих (Brody, 1945; Shield, 1966) и некоторых видов рыб (Озернюк, Зотин, 1983), – так и для беспозвоночных: мор-

ских ежей (Quinn, Wales, 1971) и двустворчатых моллюсков (Радзинская и др., 2003). В отношении брюхоногих моллюсков нам известны только две работы. Одна из них проведена на *Viviparus viviparus* (Радзинская и др., 2003). У этого вида моллюсков уровень интенсивности дыхания зародышей остается постоянным. По-видимому, в данном случае речь идет о поздних этапах зародышевого развития, которые соответствуют у *P. corneus* постларвальному периоду. Темпы снижения интенсивности дыхания на этой стадии весьма незначительны (рис. 1б), и в пределах чувствительности использованного метода этот параметр можно считать неизменным. Другая работа проведена нами (Зотин А.А., Клейменов, 2006) на большом прудовике *Lymnaea stagnalis*. У этого вида постоянное снижение интенсивности дыхания начинается со стадии поздней гастрюлы ( $\tau = 28$  Дф), то есть раньше, чем это наблюдается у *P. corneus* (со стадии ранней трохофоры;  $\tau = 43$  Дф).

Зависимость между скоростью потребления кислорода и объемом (массой) животных обычно описывают аллометрическим (степенным) уравнением (Зотин А.И., 1974; Винберг, 1977; Шмидт-Ниельсен, 1987; Озернюк, 2000). Для *P. corneus* такое уравнение способно описать зародышевое развитие, начиная со стадии ранней трохофоры. В этом отношении зародышевое развитие *P. corneus* отличается от развития *L. stagnalis*. У *L. stagnalis* происходит изменение аллометрических коэффициентов: на протяжении личиночного периода (стадии трохофоры и велигера) степенной коэффициент  $k = 0.514$ , а в ходе дальнейшего развития его значение снижается до  $k = 0.206$  (Зотин А.А., Клейменов, 2006). Последнее значение  $k$  близко к значению этого коэффициента для зародышей *P. corneus* для всего зародышевого развития, начиная со стадии средней трохофоры ( $k = 0.230$ ).

Причины подобного различия для таких близкородственных видов как *P. corneus* и *L. stagnalis* не совсем ясны. Выяснение этого вопроса требует дополнительных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН по программе “Биоразнообразие живых систем”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Винберг Г.Г.* Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб. Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 1956. 256 с.
- Винберг Г.Г.* Интенсивность обмена в постэмбриональном развитии пойкилотермных животных // Проблемы экспериментальной биологии. М.: Наука, 1977. С. 288–293.
- Владимирова И.Г., Клейменов С.Ю., Алексеева Т.А., Радзинская Л.И.* Удельная скорость роста и уровень энергетического обмена в онтогенезе аксолотля *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Ambystomatidae) // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. № 6. С. 706–711.
- Владимирова И.Г., Алексеева Т.А., Нечаева М.В.* Рост и потребление кислорода в процессе эмбрионального развития и раннего постэмбрионального развития европейской болотной черепахи *Emys orbicularis* (Reptilia: Emydidae) // Изв. РАН. Сер. биол. 2005. № 2. С. 214–220.
- Детлаф Т.А.* Температурно-временные закономерности развития пойкилотермных животных. М.: Наука, 2001. 211 с.
- Детлаф Т.А., Детлаф А.А.* Безразмерные критерии как метод количественной характеристики развития животных // Математическая биология развития. М.: Наука, 1982. С. 25–39.
- Зотин А.А.* Статистическая оценка параметров аллометрических уравнений // Изв. РАН. Сер. биол. 2000. № 5. С. 517–524.
- Зотин А.А., Кирик Е.Ф.* Индивидуальный рост зародышей роговой катушки *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Planorbidae) // Онтогенез. 2016. Т. 47. № 5. С. 296–306.
- Зотин А.А., Клейменов С.Ю.* Скорость потребления кислорода в зародышевом развитии обыкновенного прудовика *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 3. С. 167–172.
- Зотин А.И.* Изменение скорости продукции энтропии во время эмбрионального развития и роста // Биофизика. 1966. Т. 11. № 3. С. 554–557.
- Зотин А.И.* Термодинамический подход к проблемам развития, роста и старения. М.: Наука, 1974. 184 с.
- Зотин А.И., Зотина П.С.* Феноменологическая теория развития, роста и старения организма. М.: Наука, 1993. 364 с.
- Клейменов С.Ю.* Интенсивность дыхания и теплопродукции в онтогенезе прыткой ящерицы *Lacerta agilis* L. // Онтогенез. 1991. Т. 22. № 3. С. 269–273.
- Клейменов С.Ю.* Интенсивность энергетического обмена в раннем онтогенезе животных по данным прямой и непрямой калориметрии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИБР РАН, 1996. 24 с.
- Озернюк Н.Д.* Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. 175 с.
- Озернюк Н.Д.* Биоэнергетика онтогенеза. М.: Изд-во МГУ, 2000. 259 с.
- Озернюк Н.Д., Зотин А.И.* Изменение интенсивности дыхания во время зародышевого развития невского лосося // Онтогенез. 1983. Т. 14. № 5. С. 539–542.
- Озернюк Н.Д., Лелянова В.Г.* Особенности энергетического обмена в раннем онтогенезе рыб и амфибий // Журн. общ. биологии. 1985. Т. 46. № 6. С. 778–785.
- Радзинская Л.И., Никольская И.С.* Изменение энергетического обмена в онтогенезе животных // Математическая биология развития. М.: Наука, 1982. С. 160–168.
- Радзинская Л.И., Никольская И.С., Алексеева Т.А., Владимирова И.Г., Коваленко П.И., Озернюк Н.Д.* Изменение интенсивности дыхания в онтогенезе некоторых беспозвоночных // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 5. С. 377–381.
- Шмидт-Ниельсен К.* Размеры животных: почему они так важны? М.: Мир, 1987. 259 с.
- Brody S.* Bioenergetics and Growth. N.Y.: Reinhold, 1945. 1023 p.
- Mills R.M., Brinster R.L.* Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos // Exp. Cell Res. 1967. V. 47. № 1/2. P. 337–344.
- Ohnishi T., Sugiyama M.* Polarographic studies of oxygen uptake of sea urchin eggs // Embriologia. 1963. V. 8. № 1. P. 79–88.
- Quinn P., Wales R.G.* Adenosine triphosphate content of preimplantant mouse embryos // J. Reprod. Fertil. 1971. V. 25. № 1/2. P. 133–135.
- Romanoff A.L.* Biochemistry of the Avian Embryo. N.Y.: Wiley, 1967. 398 p.
- Shield J.* Oxygen consumption during pouch development of the sacropod marsupial *Setouix brachyurus* // J. Physiol. (Gr. Brit.). 1966. V. 187. № 2. P. 257–270.
- Thermo Scientific. Orion Star A220 Series Portable Meter User Manual. 2015. 89 p. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Orion-Star-A220-Series-Portable-Meter-User-Manual-EN.pdf>.
- Wills I.A.* The respiratory rate of developing amphibian with special reference to sex differentiation // J. Exp. Zool. 1936. V. 73. P. 481–510.
- Zotin A.A., Kirik E.F.* Intravital identification of stages of normal development of the great ramshorn snail *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Planorbidae) // News of Science and Education. 2014. V. 10. № 10. P. 56–77.

## Rate of Oxygen Consumption during Embryonic Development of Great Ramshorn *Planorbarius corneus* (Gastropoda)

A. A. Zotin\* and E. F. Kirik

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

*\*e-mail: aazotin@mail.ru*

Received July 22, 2016; in final form, October 7, 2016

Energy metabolism is studied in great ramshorn *Planorbarius corneus* during embryonic development. It is shown that the rate of oxygen consumption is constantly increasing in the process of embryogenesis. The respiration intensity (rate of the oxygen consumption per unit of the embryo volume) initially increases and then slowly decreases until eclosion. At the early stages of development until the early trochophore stage, the embryo is not growing, and, thus, the change in the rate of oxygen consumption during this period is not associated with the change of the embryo volume. Reduction in the intensity of respiration begins simultaneously with the beginning of the growth of the embryo at the stage of the middle trochophore. Starting from the middle trochophore and until eclosion, an association between oxygen consumption rate and volume of the embryo can be described with an allometric equation with exponential coefficient equal to approximately 0.23.

*Keywords:* embryonic development, rate of oxygen consumption, energy metabolism, Gastropoda, great ramshorn