

Г Б ОД  
23 НОЯ 1998

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ И ЭВОЛЮЦИИ

им. А.Н.СЕВЕРЦОВА

На правах рукописи

УДК 597-1.05:597-13:

597-115.7:597-146.511

Мнкулин Александр Евгеньевич

**Функциональное значение пигментов и пигментации в  
онтогенезе рыб.**

03.00.10 - ихтиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва - 1998

Работа выполнена в Московском государственном заочном институте  
пищевой промышленности

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук Л.А.Душкина

доктор биологических наук Н.Н.Немова

доктор биологических наук Ю.С.Решетников

Ведущее учреждение: Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, кафедра ихтиологии

Защита состоится “ 8 “ декабря 1998 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании Специализированного Ученого Совета Д 002.48.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, 117071, Москва, Ленинский проспект, 33

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 117071, Москва, Ленинский проспект, 33, ученому секретарю Специализированного совета Д 002.48.02.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения общей биологии РАН, Москва, Ленинский проспект, 33.

Автореферат разослан “ 5 “ ноября 1998 г.

Ученый секретарь

Специализированного совета,

Кандидат биологических наук

Л.Т.Капралова

### Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы. Значение окраски рыб и отдельных пигментов, как в целом, так и на разных этапах их жизненного цикла интересовало ученых не одно столетие. Однако оставался неясным биологический смысл разнообразия окраски покровов взрослых рыб, а также функциональное значение пигментов в мышцах, других тканях, во внутренних органах и в икре.

Пигменты - окрашенные вещества, входящие в состав тканей организма, избирательно поглощающие свет в видимой части солнечного спектра. Из них объектами нашего исследования являлись только окрашенные соединения биологического происхождения, существенно влияющие на цвет икры и кожи рыб и представляющие интерес в плане изучения их функциональной роли.

Настоящее исследование связано с соединениями, традиционно относимыми к истинным пигментам, такими как птерины и каротиноиды, а также с бесцветными производными последних (витамины группы А), в силу их важности для понимания функциональной роли. В то же время, в числе окрашивающих рыб веществ нами рассматриваются меланины и гуанин, не являющиеся истинными пигментами, поскольку они поглощают или отражают свет во всем диапазоне видимой части спектра.

Более ста лет назад К.С.Мережковский (1863), а вслед за ним и А.Арно (Arnaud, 1889 - цит. по Гудвину, 1954) высказали предположение о дыхательной роли отдельных пигментов в организме животных. Однако, несмотря на многочисленные исследования, до настоящего времени нет полной ясности в вопросе о функциональной роли пигментов на разных этапах онтогенеза рыб. Недостаточно изучены причины разнообразия содержания пигментов в икре разных видов рыб, их тканевая и внутриклеточная локализация. Неясно функциональное значение качественного разнообразия пигментов в организме рыб и их икре, а также метаболизма ряда пигментов в физиологических процессах организма. Фрагментарно исследовано участие различных групп пиг-

ментов в биохимических и физиологических процессах на разных этапах онтогенеза рыб.

Знания функциональной роли пигментов рыб крайне интересны не только в теоретическом плане, но и важны с практической точки зрения для оптимизации биотехнологий в аквакультуре, использования этих соединений в медицине и разработки превентивных противорадиационных мер.

Выявление функций пигментов более удобно проводить на низших позвоночных, где они часто представлены в эволюционно исходных формах, сами животные являются удобным объектом экспериментальных исследований. Однако, изучение пигментации гидробионтов, в том числе и рыб, в значительной степени затруднено из-за отсутствия методов сохранения их естественной окраски.

Цель исследования: изучить функциональную роль пигментов и пигментации рыб в течение их онтогенеза.

Задачи исследования: 1) идентифицировать спектрофотометрическими методами типы пигментов в живой развивающейся икре рыб; 2) определить концентрации и качественный состав каротиноидов в икре рыб разных экологических групп; 3) исследовать распределение каротиноидов в различных структурах икры в процессе эмбрионального развития рыб; 4) изучить метаболизм каротиноидов в эмбриогенезе рыб в норме и при воздействии различных факторов среды; 5) исследовать роль каротиноидов в водно-солево-обмене рыб; 6) выяснить функциональную роль каротиноидов в различных структурных элементах икры в эмбриогенезе рыб и значение пигментации кожных покровов рыб; 7) проанализировать видовую специфику, локализацию в структурах икры и функциональную роль цитохромов в икре рыб; 8) разработать принципы создания фиксирующих смесей, позволяющих сохранять естественную окраску рыб.

Научная новизна. Автором впервые показано, что каротиноиды в икре рыб существуют в трех формах: в свободной, этерифицированной и в виде белково-каротиноидных комплексов. Витальными спектрофотометрическим

исследованиями установлено, что цвет икры рыб не отражает содержание в ней каротиноидных пигментов. Впервые на видовом и межвидовом уровнях выявлена положительная корреляция между концентрацией каротиноидов в икре рыб и ее размерами, а также длительностью эмбрионального развития. На основании установленных автором особенностей внутриклеточной локализации различных биохимических форм каротиноидов у разных видов рыб показано их неодинаковое функциональное значение в различных структурах развивающегося зародыша. Автором установлено, что набор пигментов в икре рыб не является для вида строго закрепленным признаком, а зависит от состава пигментов, поступающих в организм самок с пищей, от метаболических процессов с их участием и особенностей перераспределения каротиноидных пигментов между различными органами и тканями, включая транспорт из печени в яйцеклетки. Показано, что в эмбриогенезе рыб окисление каротиноидов до кетоформ есть спонтанный процесс и не является обязательным для эмбрионов всех видов рыб.

Установленные автором межвидовые и на видовом уровне различия качественного состава каротиноидов икры рыб и выявленные им особенности структурной организации молекул каротиноидов позволили показать отсутствие каких-либо циклов их превращения с использованием в обменных процессах кислородсодержащих группировок иононовых колец каротиноидов и впервые доказать их неучастие в процессах дыхания с переносом кислорода за счет преобразования кислородсодержащих группировок этих пигментов.

Впервые показано, что основную функциональную нагрузку в структуре молекулы пигмента несет система сопряжения, имеющая не менее девяти двойных связей, благодаря которой каротиноиды участвуют в кальциевом обмене клетки, обуславливая изменение цвета икры и адгезивности клеточного материала.

С участием автора впервые в икре сиговых рыб идентифицирован цитохром b-типа, показана его роль в метаболизме икринок и установлено, что он является признаком-маркером семейства сиговых. Проведенный автором

сравнительный эволюционно-морфологический и физиолого-биохимический анализ функциональных возможностей пигментов кожи рыб и их икры, позволил констатировать, что в икре пигменты осуществляют ограниченные функции, характерные для пигментной системы кожи рыб.

Практическая значимость. На основании исследования свойств и функций пигментов, определяющих окраску рыб, автором сформулированы теоретические основы методов длительного сохранения окраски рыб и других гидробионтов при их фиксации. Для этих целей предложены: оригинальный способ искусственной регуляции контракции и экспансии пигментных клеток кожи, хелаторы двухвалентных ионов, антиоксиданты, приемы стабилизации мембранных структур клеток. Созданы методы фиксации с сохранением естественной окраски для различных групп рыб и других гидробионтов, что нашло практическое применение при создании музейных экспозиций.

Апробация работы. Результаты исследований по теме диссертации были представлены на коллоквиумах кафедры ихтиологии биологического факультета МГУ (1973, 1977), института биофизики РАН (1974), Всесоюзного научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) (1976), на Всесоюзных конференциях: “Биология промысловых рыб и беспозвоночных на ранних стадиях развития” (1974), “Вопросы раннего онтогенеза рыб” (1978), IV - VI Всесоюзных конференциях по “Экологической физиологии и биохимии рыб” (Астрахань, 1979; Киев, 1982; Вильно, 1985), на 3-ем Всесоюзном совещании “Проблемы раннего онтогенеза рыб” (Калининград, 1983), на 3-ем Всесоюзном совещании по лососевидным рыбам. (Тольятти, 1988), VI Конгрессе европейских ихтиологов (Budapest, 1988), на научной конференции Всесоюзного заочного института пищевой промышленности (ВЗИПП) (1988), Международном симпозиуме по биологии и разведению сиговых рыб (Сиебес, 1990), Международной научной конференции “Размножение рыб-92” (Vodnany, 1992), на I Конгрессе ихтиологов России (Астрахань, 1997), на международной научно-технической конференции Московского государственного заочного института пищевой промышлен-

юсти (МГЗИПП) “Приоритетные технологии в пищевой промышленности” (1998), на Всероссийском симпозиуме “Возрастная и экологическая физиология рыб” (Борок, 1998), на совместном заседании кафедры ихтиологии и рыбодства Московского государственного заочного института пищевой промышленности (МГЗИПП), сотрудников кафедры ихтиологии Биологического факультета МГУ, Института проблем экологии и эволюции (ИПЭЭ РАН) и Всероссийского научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) (1998).

Публикации. По теме диссертации автором опубликовано 32 работы.

Структура и объем диссертации. Рукопись состоит из введения, материала и методов исследования, 5 глав основной части и 3 глав приложения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 458 машинописных страницах и содержит 24 таблицы, 65 рисунков. В списке литературы 870 источников.

### **Материал и методы исследования.**

Объектами исследования являлись пигменты различных органов, тканей и икры рыб.

Сбор материала проводили с 1968 по 1996 гг. в естественных водоемах России, а также получали от фирм-поставщиков пресноводных аквариумных и коралловых рыб с рыбоводно-заготовительных баз Вьетнама, Тайланда и Сингапура.

Объем исследованного материала представлен в таблице 1.

Эмбриологические исследования проводили на живой развивающейся икре рыб по общепринятой методике (Крыжановский, 1949; Соин, 1963б; Соин, Микулин, 1974; Черняев, 1982). Одновременно с определением стадии развития измеряли диаметр икры и ее сырую и сухую массу.

Спектральное изучение цвета икры производили также на живом объекте. Экстракцию каротиноидов из икры и тканей рыб производили ацетоном, последующим удалением из экстракта воды, водорастворимых веществ и стерилов. Количественное определение каротиноидов осуществляли по общепри-

нятому методу (Davies, 1965, 1976). Результаты исследований обработаны статистически (Плохинский, 1970).

О количественном изменении цис-форм каротиноидов судили по цис максимуму поглощения света в области 320-380 нм. Наличие витаминов группы А устанавливали по спектрам поглощения ими света в области 325-381 нм и по их люминесценции. Разделение каротиноидных пигментов осуществляли фазовым и хроматографическим методами. Измерение соотношения пигментов осуществляли микроденситометрически с микрофотографий хроматографических разгонок.

**Таблица 1. Объем экспериментального материала.**

Область исследований	Количество определений (проб, экспериментов)	Количество исследованных видов
Оценка спектральных характеристик отдельных пигментов, икры и тканей рыб	25885	44
Биохимический анализ пигментов икры и тканей рыб	1286	56
Исследовано влияние состава фиксирующих смесей на сохранение окраски рыб	1950	321

Каротиноидные пигменты идентифицировали (рис. 1) по величинам  $R_f$  (Форреп, 1971), особенностям их фазового распределения (Davies, 1965 Форреп, 1971), форме и цвету их кристаллов (Калинин и др., 1971), а также по спектрам поглощения ими света с использованием определительных таблиц (Микулин, 1978).

Фракционирование гомогенатов икры осуществляли методом центрифугирования (Микулин, Котик, Дубровин, 1978), а разделение гомогенатных фракций на субклеточные структуры осуществляли методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности (Петруняк, 1979). Электронномикроскопические исследования фракций икры проводили по общепринятой методике (Reynolds, 1963; Гайер, 1974).

Измерение содержания кислорода проводили по методу Винклера в замкнутых сосудах (Строганов, Бузинова, 1969).



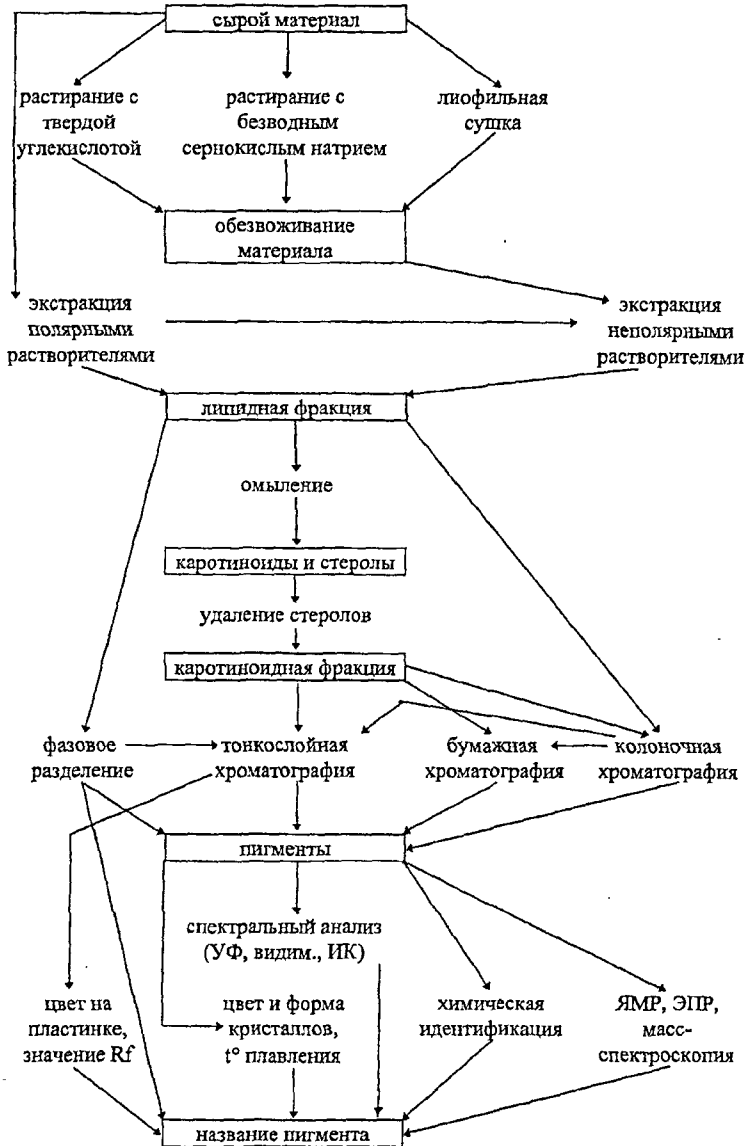


Рис.1. Общая схема выделения, разделения и идентификации каротиноидных пигментов.

Свойства соединений каротиноидов с двухвалентными металлами изучали спектрофотометрическими и хроматографическими методами, а также с использованием атомно-абсорбционной спектрофотометрии.

Обнаружение гемопротеидов в икре рыб осуществляли путем регистрации спектров поглощения света непосредственно с живого объекта. Количественное определение гемопротеида осуществляли по величине первого максимума ( $\gamma$ -полоса) в дифференциальном спектре поглощения света восстановленной формой гемопротеида относительно окисленной в области 428 нм. Вычисление количества гемопротеида производили по общепринятой методике (Chance, Williams, 1956). Гемопротеид очищали при помощи колоночной гель-фильтрации. Белок определяли по методу Гринберга (Greenberg, Gaddlock, 1982).

Методы фиксации рыб и других гидробионтов с сохранением их естественной окраски, входившие в задачи нашего исследования, изложены в приложении.

## **Глава 1. Пигменты икры и их изменения в эмбриогенезе рыб.**

На наш взгляд, участию пигментов в окраске кожи предшествовали какие-то иные функции пигментов, обеспечивавшие физиологические особенности взаимодействия организма со средой, благодаря чему они собственно и были выведены на поверхность тела. Выяснению эволюционно исходных биохимических возможностей и физиологических проявлений пигментов у взрослых рыб мешает их участие во вторичной функции, то есть в окраске. Часть из этих пигментов синтезируется в организме рыб, часть - попадает в организм только с пищей, что ставит содержание последних в зависимость от их наличия в пище и затрудняет изучение их функциональных возможностей. Более ранние в филогенетическом плане функции пигментов, по нашему мнению, могут проявляться на более ранних этапах онтогенеза рыб. На ранних этапах онтогенеза икринка, в отношении пигментов, является замкнутой системой.

Это позволяет оценить содержание пигментов и их качественный состав в икре в зависимости от внутренних процессов, специфичных для разных видов рыб в их эмбриональном развитии, а также от внешних факторов среды. Именно по этим причинам мы изначально приступили к исследованию функционального значения пигментов в онтогенезе рыб на эмбриологическом материале.

### **1.1. Визуальные различия цвета и спектральные характеристики живой икры рыб различных экологических групп по размножению.**

Икра рыб, относящихся к различным таксономическим и экологическим группам, также как и икра, полученная от разных самок в пределах одного вида, существенно различается по окраске.

Черный цвет характерен для икры ряда представителей низших, исходно пресноводных челюстноротых, яйца которых не заключены в твердую капсулу из рогоподобного вещества обычно темного цвета, таких как двоякодышашные, многоперы, хрящевые и костные ганоиды, мотыльковые из араванообразных. У остальных рыб, вышедших в морские воды, таких как кистелеры, хрящевые и костистые рыбы, яйцеклетки имеют цвет от слабо-желтого до малиново-красного.

Большое разнообразие окраски икры различных видов рыб трудно объяснить наличием только 2 основных групп пигментов - меланиновых, обуславливающих черный цвет, и каротиноидных, которые, находясь в свободном виде, обуславливают желтый и красный цвет икры.

Мы впервые (Микулин, 1981б) изучали окраску икры и ее пигментный состав спектральным методом непосредственно на живой развивающейся икре разных видов рыб. Показано, что в коротковолновой области видимой части спектра помимо каротиноидных пигментов, поглощающих свет в области 420-510 нм, значительное поглощение света имеют соединения липидной природы с максимумами поглощения в ближнем ультрафиолете (до 400 нм), а также подобный железопротейну пигмент, формирующий цвет икринок ряда пелагофильных и сиговых рыб (рис. 2). В икре литофильно-гнездящихся рыб отряда скорпенообразных обнаружены соединения некаротиноидной природы

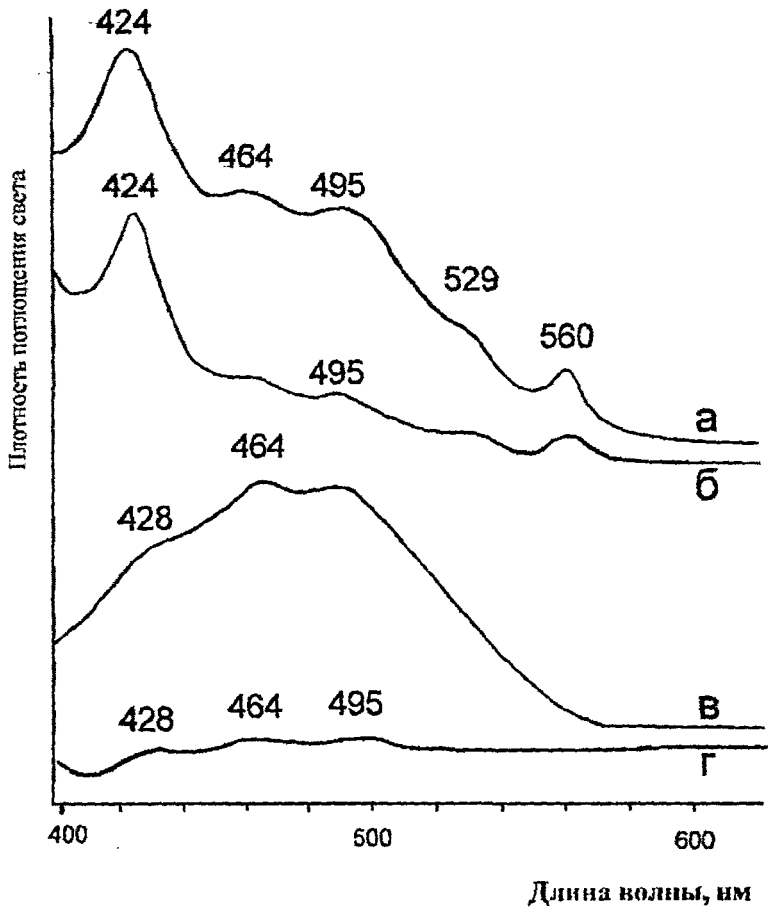


Рис. 2. Спектры поглощения света развивающихся яиц и их отдельных фракций баунтовского сига. а – целых развивающихся яиц; б – водорастворимой части желтка; в – жировых капель желтка; г – клеточной части яиц.

максимумами поглощения света в длинноволновой части спектра (рис. 3).

### **1.2. Изменения спектров поглощения света икринками в процессе эмбрионального развития рыб.**

В процессе эмбрионального развития пинагора наблюдаются закономерные изменения цвета икры (Микулин, 1978). Общей тенденцией в изменении цвета его икры является исчезновение фиолетового оттенка с максимумом поглощения света в области 540 нм на этапе дробления бластодиска и гибели клеточного материала и появление зеленоватого оттенка икры к этапу органогенеза с максимумом поглощения света в области 610-615 нм. Эти пигменты сосредоточены в собственно желтке икринок. Такое разнообразие цветовой гаммы кладок икры у ряда литофильно-охраняющих рыб отряда Корпенообразных способствует распознаванию производителями своей кладки при ее охране. В процессе этапа васкуляризации икра всех цветовых групп икры этих видов приобретает грязно-коричневый цвет, а к вылуплению становится черной, что связано с меньшей необходимостью заботы производителей в охране кладки и обеспечении притока свежей воды к икре и необходимостью большей незаметности кладки, что обеспечивает меньшее выедание молоди после вылупления как другими водными обитателями, так и собственными родителями.

Спектральное изучение цвета икринок в процессе эмбрионального развития таких видов, как треска, навага, вьюн, трехглая колюшка, планктический лосось, не обнаружило каких-либо существенных изменений цвета. Изменение цвета наблюдали лишь на поздних стадиях развития, на этапе васкуляризации, в процессе которого в спектрах поглощения света икринками появляется гемоглобин, и перед вылуплением предличинок из оболочки, когда глазах и на теле зародыша появляются меланобласты.

### **1.3. Разнообразие групп пигментов в икре рыб разных систематических групп.**

В окраске икры принимают участие различные классы пигментов. У большинства костистых рыб пигментами плазменной (клеточной) части икры

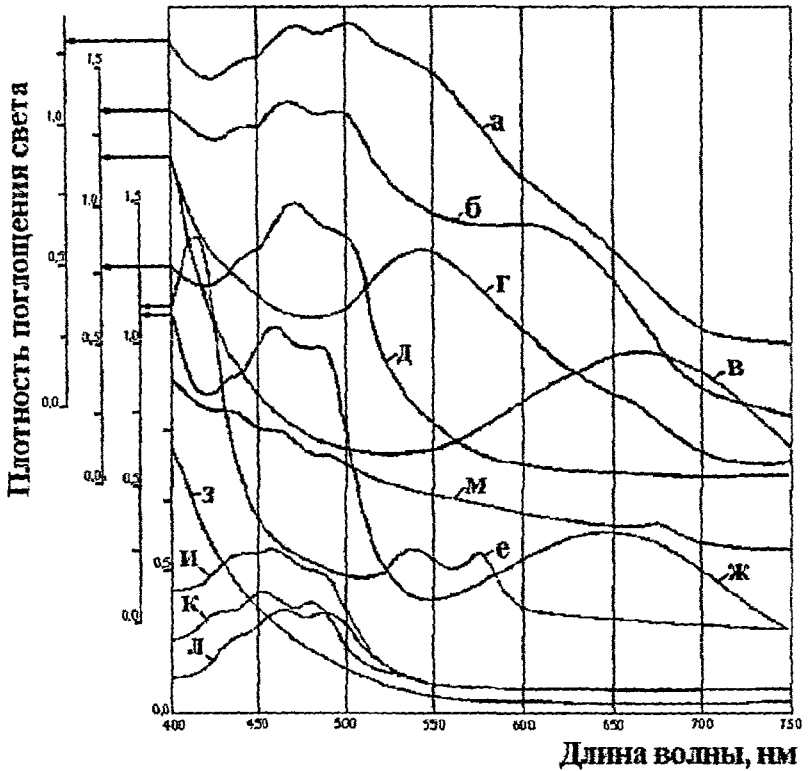


Рис. 3. Спектры поглощения света различных фракций икры пинагора. а – неоплодотворенная икра *in vivo*; б – икра на стадии закладки сердца *in vivo*; в – зеленовато-синий пигмент желтка икры, растворенный в воде; г – фиолетовая фракция желтка икры; д – водорастворимая желтая фракция желтка икры; е – гемоглобин; ж – ацетоновая вытяжка желтка икры; з – липиды икры; и – ацетоновая вытяжка плазменной части икры; к – ацетоновая вытяжка жировых капель икры; л – жировые капли *in vivo*; м – плазменная часть икры *in vivo*.

на ранних этапах эмбриогенеза и жировых капель являются каротиноиды. В икре сайки (*Boreogadus saida*) зеленовато-желтый оттенок плазменной части придают вещества липидной природы. Различные оттенки цвета икры многих представителей литофильно-гнездящихся рыб отряда Скорпенообразных обусловлены наличием в водорастворимой части желтка их икры сине-зеленого биливердиноподобного пигмента и его фиолетового белкового комплекса. Значительное участие в окраске икры некоторых видов сельдевых, сиговых, шуковых, карповых, камбаловых, тресковых, окуневых, зубатковых принимают гемопротеиды. У большинства видов они обнаружены в водорастворимой части желтка, у камбалы-ершоватки - в клеточной части икринки. Гемопротеид икры сиговых рыб (цитохром  $b_{560}$ ) не идентичен гемопротеидам икры иных групп рыб. Он не связан с мембранными структурами и находится в икре в восстановленной форме в водорастворимой части желтка в свободном виде. На поздних этапах эмбриогенеза в окраске тела зародышей рыб участвуют гемоглобин в составе крови, птерины, гуанин и меланин в глазах и коже эмбриона.

Следует отметить, что разнообразие окраски икры рыб обуславливается различным соотношением содержания в ней как каротиноидных пигментов, так и цветных веществ иной природы. При этом основной группой пигментов у большинства костистых рыб на ранних этапах онтогенеза являются каротиноиды.

#### **1.4. Классификация и физико-химические характеристики каротиноидов.**

Для выяснения функциональных возможностей каротиноидов в различных биологических структурах рыб требуется детальное знание структуры каротиноидных молекул, их физико-химических возможностей, определяющих, в конечном счете, значение каротиноидов в организме животных.

В этом разделе диссертации дан подробный анализ взглядов на классификацию каротиноидов, структуру молекул этих веществ и приводятся физико-химические характеристики отдельных групп каротиноидов.

Анализ данных о происхождении кислорода гидрокси-, кето- и эпокси-группировок каротиноидов позволяет сделать вывод о невозможности образования эпоксикаротиноидов в животных клетках, поскольку этот процесс сопряжен с фотосинтезом.

Сопоставление особенностей спектральных характеристик каротиноидов с различным строением их молекул позволяет полагать, что конфигурация молекул каротиноидов, в структуре которых нет кетогрупп сопряженных с полиеновой цепью, в невозбужденном состоянии является спиралеобразной, причем спирали закручиваются в противоположные стороны относительно центральной двойной связи полиеновой цепи молекулы (Микулин, 1998в). С позиций наличия у большинства каротиноидов такой конфигурации молекул обосновывается присутствие трех максимумов в их спектрах поглощения видимого света, а также ряд функциональных проявлений каротиноидов в биологических структурах.

## **Глава 2. Качественный и количественный состав каротиноидов и динамика этих показателей в раннем онтогенезе рыб.**

### **2.1. Содержание каротиноидов в икре рыб.**

Изучение содержания каротиноидов в икре различных видов рыб показало, что эта величина варьирует в широких пределах как в икре разных видов рыб, так и у одного вида в икре от разных самок. Наблюдается некоторое увеличение содержания каротиноидов в икре в последовательности экологических групп: пелагофильные, фитофильные, литофильно-закапывающие. Значения содержания каротиноидов в икре рыб, относящихся к различным экологическим группам, перекрываются в довольно широких пределах. По сути дела, за пределы диапазона концентраций каротиноидов в икре, характерного для большинства рыб, выходят только пелагофильные, со свойственным им низким содержанием каротиноидов, и некоторые виды литофильно-закапывающих рыб, отличающиеся высокой концентрацией каротиноидов в их икре.

Нами обнаружена положительная корреляция между концентрацией каротиноидов в икре и ее размерами как у рыб, относящихся к разным экологи-



ческим группам по размножению, так и в пределах вида на примере пинагора. Обнаружена положительная корреляция между продолжительностью эмбрионального развития вида, выраженной в градусоднях, и концентрацией каротиноидов в его икре (рис. 4).

Мы полагаем, что количество каротиноидов в икре определяется не одним каким-либо ведущим фактором, а совокупностью нескольких факторов внешней среды или внутренних процессов, происходящих в течение эмбрионального развития зародыша, что указывает на полифункциональность каротиноидов.

Причины разнообразия содержания каротиноидов в икре в пределах одного вида исследованы нами на примере пинагора. Показано, что средний диаметр икринок у разных самок колеблется в широких пределах - от 1,56 до 2,70 мм. Вариации значений диаметра икринок у одной самки не превышают 10%. Нерест пинагора начинается в конце апреля - начале мая при температуре воды 0-2° и заканчивается в августе при температуре воды 15-17° (Соин, Микулин, 1974). В начале нерестового сезона к литоральной зоне моря подходят более мелкие самки, более крупные - во второй половине нерестового сезона.

Крупные самки достоверно отличаются от мелких по массе печени, массе выметанных кладок икры, сухой и сырой массе икринок, составляющих кладку. Обнаружена достоверная ( $P > 0,99$ ) положительная корреляция между массой самок ( $Q$ ) и диаметром выметанных ими икринок ( $r = 0,66$ ).

Таким образом, более мелкие самки пинагора, нерестящиеся в начале нерестового сезона при более низкой температуре воды, откладывают более мелкие кладки с икринками меньшего размера в сравнении с крупными самками. В мелких икринках концентрация каротиноидов ниже, чем в крупных ( $r = 0,38$ ;  $P > 0,95$ ). При этом накопление каротиноидов в ооцитах в процессе оогенеза не зависит в определенных пределах от степени их накопления в печени. Концентрация каротиноидов в икре положительно коррелирует как с размерами икры, так и с температурой воды и скоростью протекания эмбрионального развития, то есть изменение содержания каротиноидов в икре разных самок,

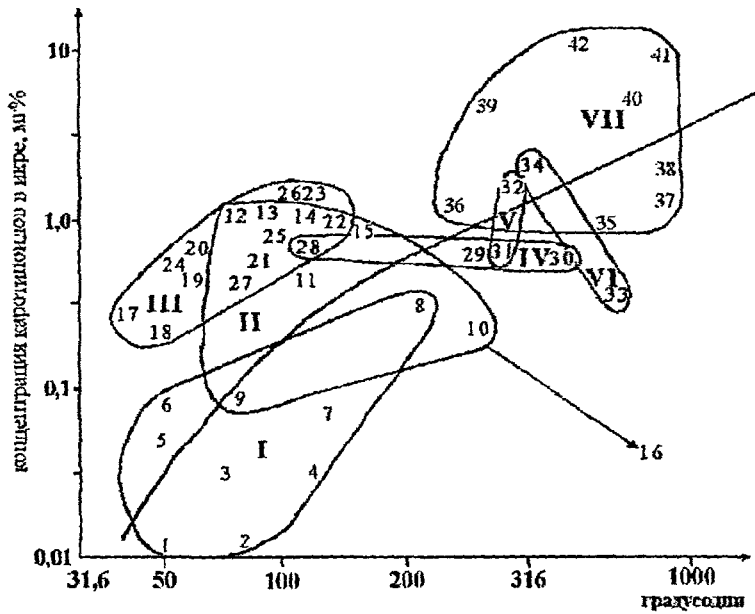


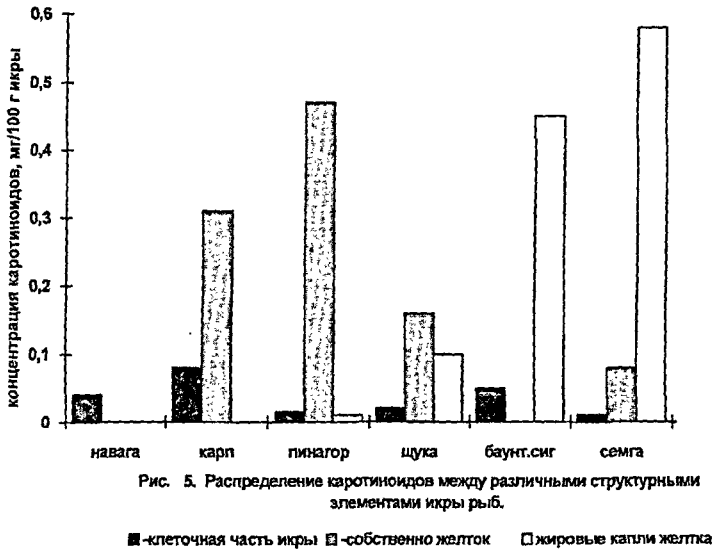
Рис. 4. Корреляция между продолжительностью эмбрионального развития рыб, выраженной в градусоднях и концентрацией каротиноидов в икре. Экологические группы рыб: I – пелагофильные; II – литофильные; III – фитофильные; IV – литофильно-гнездующие; V – остракофильные; VI – яйцеживородящие; VII – литофильно-закапывающие. 1 – белый толстолоб; 2 – сайка; 3 – навага; 4 – полярная камбала; 5 – камбала-ершоватка; 6 – сингиль; 7 – треска; 8 – белый амур; 9 – сибирский осетр; 10 – омуль; 11 – голянь; 12 – голавль; 13 – троегуб; 14 – усач; 15 – подуст; 16 – нельма; 17 – беломорская сельдь; 18 – щука; 19 – вьюн; 20 – плотва; 21 – карп; 22 – речной окунь; 23 – серебряный карась; 24 – густера; 25 – лещ; 26 – щиповка; 27 – уклея; 28 – пинагор; 29 – зубатка; 30 – красная широколобка; 31 – глазчатый горчак; 32 – обыкновенный горчак; 33 – малая голомянка; 34 – гамбузия; 35 – мальма; 36 – радужная форель; 37 – горбуша; 38 – кета; 39 – севанская форель; 40 – семга; 41 – кижуч; 42 – нерка.

возможно, является приспособлением к изменению темпа развития в изменяющихся условиях длительного нерестового сезона.

Полученные данные дают основание полагать, что высокое разнообразие содержания каротиноидов в икре пинагора является адаптивным свойством вида, сформировавшимся в процессе эволюции в связи с широким диапазоном условий его развития и отражающим степень отклонения условий эмбрионального развития вида от оптимальных.

## 2.2. Распределение каротиноидов и их состояние в различных структурах икры.

У большинства пелагофильных и литофильных рыб каротиноиды содержатся только в плазменной (клеточной) части икры, у сиговых рыб - в плазменной части и жировых каплях желтка, а у иных рыб - в клеточной части икры, собственно желтке и жировых каплях желтка, причем у различных видов в разном соотношении (рис. 5).



Каротиноиды в икре рыб представлены в трех формах: в свободном, утерифицированном и в виде белково-каротиноидных комплексов. В клеточной части икры каротиноиды находятся в мембранных структурах.

Изучение каротиноидных пигментов желтка икринки показало, что они, в отличие от пигментов плазменной части и жировых капель, легко растворимы в фосфатном буфере (рН=7), трис-НСI буфере (рН=8,05), а также в дистиллированной воде. На основании этих данных мы пришли к выводу, что пигментами желтой фракции желтка икры являются белково-каротиноидные комплексы (Микулин, Соин, 1975; Микулин, 1978). Белково-каротиноидные комплексы имеются в икре всех видов рыб, у которых окрашен собственно желток. Нет их в икре у большинства пелагофильных, а также сиговых рыб и ряда литофильных рыб.

В желтке икры большинства рыб белково-каротиноидные комплексы находятся в водорастворимом виде и не связаны с мембранами. В желтке икры выюна белково-каротиноидный комплекс, содержащий кетокаротиноид, сосредоточен в мембранных структурах, разделяющих отдельные желточные гранулы желтка.

Основная часть каротиноидов в составе липофоров (ксантофоров и эритрофоров) кожи эмбрионов и мальков находится в этерифицированном виде.

В процессе эмбрионально-личиночного развития наблюдается переход каротиноидов из белково-каротиноидных комплексов собственно желтка в клетки тела зародыша. Концентрация каротиноидов в свободных жировых каплях желтка остается неизменной на протяжении всего эмбрионального развития, а их количество уменьшается в постэмбриональный период параллельно с резорбцией жировых капель желточного мешка.

Таким образом, у разных видов рыб, относящихся к разным экологическим группам, каротиноидные пигменты находятся в различных структурах икринки, в разном состоянии (в свободном виде или в этерифицированной форме, растворенные в жировых включениях или в мембранных структурах; в виде белково-каротиноидных комплексов) и в неодинаковом количественном соотношении. Эти данные также указывают на различное функциональное значение каротиноидов в разных структурах икры.

### 2.3. Состав каротиноидов в икре и тканях рыб.

Каротиноиды не синтезируются в организме рыб, в связи с чем важную роль в пигментации рыб и их икры играет поступление каротиноидов с пищей.

Анализ данных литературы дает основание нам полагать, что качественный состав каротиноидов икры обусловлен тремя основными факторами: 1) различиями в доступности пигментов с пищей для того или иного вида рыб; 2) метаболическими процессами, протекающими с участием каротиноидов в теле самки; 3) особенностями перераспределения каротиноидов между различными органами и тканями самки, в том числе механизмом перевода их из тела самки в яйцеклетки.

Большинством рыб лучше усваиваются каротиноиды животного происхождения, чем растительного. При этом добавление каротиноидов в пищу улучшает усвояемость самой пищи. Усвояемость каротиноидов в значительной степени зависит от количества (Choubert, Delanoue, Blanc, 1991) и состава жира пищи, с которым они потребляются.

Важную роль в усвоении каротиноидов из пищи играет температура (No, Storebakken, 1991; Ostroumova et al., 1995) и соленость среды, в которой выращивают рыб (Hata, Hata, 1975a; Matsuno, Nagata, Chiba, 1975; Сивцева, Дубровин, 1980; Сивцева, 1982; Storebakken, Choubert, 1991). При выращивании радужной форели в солоноватой воде на кормах с использованием криле-вой муки каротиноиды, помимо кожи, накапливаются в мышцах рыб и почках, при этом, практически отсутствуют в печени (Сивцева, Дубровин, 1980; Сивцева, 1982). Однако, при выращивании радужной форели на пресной воде значительные количества каротиноидов накапливаются в печени (Логинова, 1967; Шпаревич, Сахненко, 1971).

Проведенное нами сравнение состава каротиноидов печени и яйцеклеток самок пинагора в период нереста показало, что далеко не весь набор каротиноидов печени переходит в ооциты.

Общим направлением метаболизма каротиноидов в организме животных является окисление менее окисленных каротиноидов до более окисленных форм. В свою очередь специфика кормовой базы, метаболизм каротиноидов и особенности перераспределения их по органам и тканям, особенности транспорта через кровь каротиноидов в ооциты в итоге, видимо, определяют конечный состав каротиноидов икры того или иного вида рыб.

В икре рыб встречается около 40 каротиноидных пигментов, причем их состав в икре разных видов рыб существенным образом различается, а количество пигментов обычно не превышает 13. В икре рыб из каротиноидов явно преобладают ксантофиллы (лютеин, зеаксантин, кантаксантин, астаксантин и тараксантин), а из каротинов в основном встречается  $\beta$ -каротин.

Исследования качественного состава каротиноидов икры рыб показали, что нет ни одного каротиноидного пигмента общего для икры всех исследованных видов рыб.

Разнообразие качественного состава каротиноидов икры рыб с широким спектром питания (плотва, карп) и растительноядных (белый толстолобик) значительно выше, чем у рыб-монофагов и хищных (навага, семга), что указывает на пищевую обусловленность качественного состава каротиноидов (Czeżuga, 1992, 1994).

Изучение качественного состава каротиноидов в неоплодотворенной икре, в пределах одного вида, на примере пинагора, показало, что в икре разных самок их может быть от 1 до 13. Следует отметить, что выживаемость икры положительно коррелирует с количеством в ней каротиноидов, независимо от качественного состава.

Исследование изменения пигментного состава в процессе эмбрионального развития показало, что у пинагора до стадии начала пульсации сердца количество фракций каротиноидов в икре не меняется. К моменту возникновения в коже зародыша эритрофоров и ксантофоров, на этапе васкуляризации, обычно появляются этерифицированные формы каротиноидов.

Из рассмотренного нами материала следует, что качественный состав каротиноидов икры не является строго закрепленным для того или иного вида. В составе икры рыб нет ни одного каротиноидного пигмента обязательного для всех видов рыб. В процессе эмбрионального развития рыб не происходит существенных изменений в качественном составе каротиноидов. Наблюдаемое нами в процессе эмбрионального развития ряда видов рыб окисление каротинов и гидроксикаротиноидов до кетокаротиноидов не является обязательным для всех видов рыб и даже для икры, полученной от разных самок в пределах одного вида. Этот процесс, видимо, является спонтанным и не несет функциональной нагрузки в эмбриогенезе рыб, однако, возможно, важен для этерификации каротиноидов.

Таким образом, кислородосодержащие группировки иононовых колец молекул каротиноидов, определяющие качественное разнообразие каротиноидных пигментов икры рыб, не несут самостоятельной функциональной нагрузки в общем метаболизме развивающегося зародыша. Однако, они необходимы для образования таких соединений, как эфиры каротиноидов и белково-каротиноидные комплексы, обуславливая специфику локализации каротиноидов в определенных структурах икры и тела зародыша.

Существенные различия качественного состава каротиноидов не только в икры разных видов рыб, но и в пределах одного вида, не дают основания предполагать существования в икре какого-либо одного или нескольких циклов превращения каротиноидов, сущностью которого (которых) являлось бы использование в обменных процессах кислородосодержащих группировок иононовых колец каротиноидов и, следовательно, каротиноиды развивающегося зародыша не могут участвовать в процессах дыхания с переносом кислорода за счет преобразования кислородосодержащих группировок этих пигментов.

Поскольку все каротиноиды икры рыб имеют систему сопряжения (определяющую цвет пигмента) не менее чем из девяти двойных связей, мы полагаем, что именно эта структура молекулы пигмента несет основную функциональную нагрузку в обменных процессах развивающегося зародыша.

#### 2.4. Изменения цветности каротиноидов в эмбриогенезе рыб.

Исследования изменения цветности каротиноидов в процессе эмбрионального развития рыб (пинагор, карп, семга и щука) показали, что она подвержена определенной периодичности в эмбриогенезе рыб, снижаясь со стадии плазменного бугорка до стадии 8-16 бластомеров, повышаясь затем к мелкоклеточной моруле, и вновь снижаясь на бластуле с дальнейшим повышением к началу эпиболлии. Процесс эпиболлии характеризуется уменьшением, этап органогенеза - увеличением, а этап васкуляризации - вновь уменьшением интенсивности поглощения света каротиноидами (рис. 6).

Изучение изменения интенсивности поглощения света каротиноидами, проведенный непосредственно на живой икре трехиглой колюшки в процессе ее развития показало, что причиной наблюдаемой динамики содержания каротиноидов в икре рыб является не степень их экстрагируемости из икры на разных стадиях развития, а изменение структуры самих молекул каротиноидов, сопровождающееся изменением интенсивности поглощения ими света, то есть величины их коэффициента экстинкции.

Сравнение изменений концентрации каротиноидов в эмбриогенезе рыб с различным распределением каротиноидов в структурах икринки показало, что изменениям структуры молекул подвержены только каротиноиды плазменной части икры и белково-каротиноидных комплексов желтка. При этом белково-каротиноидные комплексы желтка обуславливают оба максимума увеличения цветности каротиноидов икры на стадии мелкоклеточной морулы и на стадии пульсации сердца, а каротиноиды плазменной части (навага) - только один максимум - на стадии начала пульсации сердца. Пигменты жировых капель желтка в динамике цветности каротиноидов не участвуют.

#### 2.5. Причины изменения цветности каротиноидов в процессе эмбрионального развития рыб.

Большая общность различных пигментов икры, выражающаяся в непостоянстве интенсивности поглощения ими света, наводит на мысль, что и структуры молекул, определяющие вариации этого показателя, должны обла-



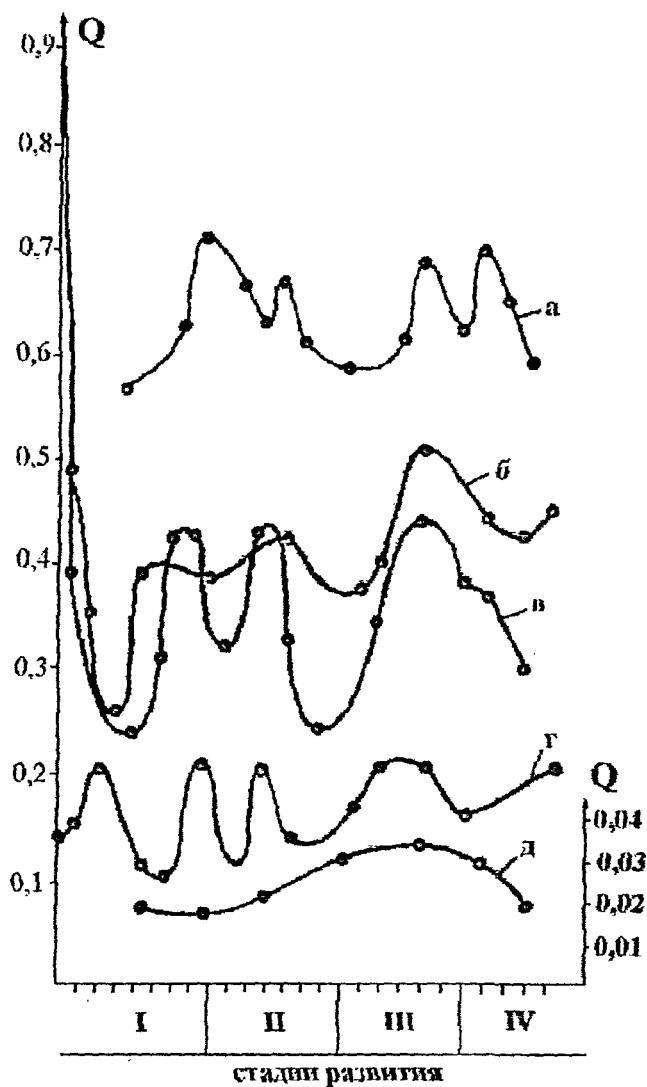


Рис. 6. Динамика содержания цветных каротиноидов ( $Q$  в мг%) в процессе эмбрионального развития рыб: а – семга; б – карп; в – пинагор; г – щука; д – навага. I – дробление бластодиска; II – бластула и эпибolia клеточного материала; III – органогенез; IV – васкуляризация.

дать значительным сходством. В молекулах каротиноидов структурой, ответственной за поглощение света, является система двойных сопряженных связей (Гаррисон и др., 1950; Годнев, 1952; Бранд, Эглинтон, 1967; Теренин, 1967)

Нами были изучены возможные структурные изменения каротиноидов, такие как: переход каротиноидов из транс-формы в цис-форму и обратно; распад каротиноидов до витаминов А с последующим синтезом из них каротиноидных пигментов; изменение группировок в иононовых кольцах каротиноидов; взаимодействие каротиноидов с различными веществами.

Эксперименты не подтвердили большинство вышеупомянутых предположений.

Из вопросов, касающихся причин изменения спектральных свойств каротиноидов икры в процессе эмбрионального развития, остается не выясненным - взаимодействие каротиноидов с различными веществами. При его рассмотрении мы основывались на двух положениях. Во-первых, вещества, входящие в соединения с каротиноидами, должны влиять на электронные состояния системы двойных сопряженных связей, обуславливая изменение спектров поглощения света. Во-вторых, соединения исследуемых веществ с каротиноидами должны обладать теми же адсорбционными свойствами на силикагеле, что и исходные свободные пигменты, поскольку при анализе качественного состава каротиноидов икры на различных стадиях развития не было обнаружено образования новых полос, а наблюдалось лишь изменение интенсивности цвета имеющихся фракций пигментов.

Проведенные нами совместно с В.В.Петрунякой (лаборатория ультраструктуры биомембран института биофизики РАН) исследования показали, что в то время, как  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  и  $\text{Mn}^{++}$  в форме солей  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  и  $\text{MnCl}_2$  не вступают во взаимодействие с каротиноидами, продувание водно-ацетонового или водно-спиртового (70-80%) раствора каротиноидов с указанными солями углекислым газом приводит к образованию соединений этих элементов с каротиноидами, приводящих к падению экстинкции каротиноидных растворов.

Все исследованные ксантофиллы образуют комплексы с солями кальция, магния и марганца, причем легче всего с кальцием и хуже - с магнием. Эти комплексы, аналогично свободным каротиноидам, легко переходят из ацетона и спирта в серный и петролейный эфиры. Они сохраняют адсорбционные свойства исходных каротиноидов при разгонке на силикагеле, однако интенсивность цвета их полос на пластинке уменьшается.

Прямые определения кальция, магния и марганца в каротиноидной фракции икры на стадии замыкания желточной пробки методом атомно-абсорбционного анализа показали наличие этих элементов, а также кремния, при отсутствии их в липидной фракции.

Приведенные выше данные, а также взаимосвязь между изменением концентрации (оптической плотности) цветных каротиноидов в процессе эмбрионального развития рыб и изменением соотношения в спектре поглощения света каротиноидами первого и третьего максимумов как в ацетоновых вытяжках каротиноидов икры, так и спектрах каротиноидов, снятых непосредственно с живой развивающейся икры, свидетельствуют, что динамика колебаний цветности каротиноидов в икре, по-видимому, обусловлена различным соотношением свободных каротиноидов и соединений каротиноидов с солями двухвалентных металлов на разных стадиях эмбрионального развития рыб. Это подтверждается почти постоянным качественным составом каротиноидов на разных стадиях эмбрионального развития рыб при закономерных изменениях интенсивности цвета полученных фракций каротиноидов на хроматограммах.

### **Глава 3. Эколого-биохимические функции каротиноидов в эмбриогенезе рыб.**

#### **3.1. Ранние исследования в области функциональной роли каротиноидов.**

В этом разделе дан критический обзор различных взглядов на функциональное значение каротиноидов в животных клетках, таких как: роль каротиноидов икры в формировании хромофоров кожи личинок и мальков (Frish, 1911; Steven, 1949), в образовании витамина А (Буров, 1938; Гудвин, 1954;

Moog, 1957; Fox, 1976), в восприятии света, защите от света и продуктов метаболизма (Уолд, 1950; Боровик, 1962; Яржомбек, Грачев, 1964; Логинова, 1966, 1967), в процессе оплодотворения (Hartmann et al., 1947), в адаптации к различным кислородным условиям среды (Смирнов, 1947, 1950; Крыжановский, 1948; Соин, 1956, 1962, 1968а). Каждая из этих точек зрения на функциональное значение каротиноидов объясняет только одну из сторон функционального проявления каротиноидов в обменных процессах организма. Однако, при рассмотрении более широкого круга фактов, очевидно, что ни одна из этих теорий не может быть выдвинута в качестве универсальной теории функционального значения каротиноидов.

Поскольку все разнообразие функций каротиноидов обуславливается их физико-химическими свойствами, можно ожидать, что каждое из конкретных функциональных проявлений каротиноидов в отдельных органах животного является модификацией некой более общей их функции.

### **3.2. Каротиноиды и окислительно-восстановительные процессы.**

Механизмы участия каротиноидов в дыхании изучались по двум направлениям. Первое из них разрабатывалось, в основном, на растительных объектах. Его сущностью являлось изучение механизмов передачи кислорода каротиноидами путем взаимопревращения кислородсодержащих группировок ионовых колец молекул пигментов. Второе направление было основано на представлениях А.Н.Баха (1912, 1937), согласно которым каротиноиды могут играть в организме роль оксигеназ, образуя перекисные производные. Оба эти направления объединяет представление об участии каротиноидов в окислительно-восстановительных процессах, путем активации кислорода и передачи его на субстрат.

По схеме предложенной В.В.Сааковым (1964, 1965, 1967, 1968, 1969а,б, 1970, 1975) для растительных объектов,  $\alpha$ -каротин, присоединяя молекулярный кислород, переходит через  $\alpha$ -криптоксантин в лютеин. Подобно этому,  $\beta$ -каротин, присоединяя молекулярный кислород, переходит через  $\beta$ -криптоксантин в зеаксантин. Далее лютеин и зеаксантин, используя кислород воды

образуют эпоксикаротиноиды, которые в растениях под действием света могут отдавать кислород эпоксидных группировок субстрату окисления. В то время как лютеин и зеаксантин не способны отдавать кислород своих гидроксильных группировок субстрату (Чичестер, Накаяма, 1965). Из этого следует, что механизм переноса кислорода с использованием каротиноидов у растений сопряжен с фотолизом воды в процессе фотосинтеза и, следовательно, невозможен для животных клеток.

В.Н.Карнаухов (1988) предположил, что виолаксантиновый цикл может существовать не только в растительных, но и в животных клетках, где он может осуществляться без световой энергии, используя восстановленные пиридиннуклеотиды и градиент рН в трансмембранном переносе кислорода. Однако, виолаксантин не обнаружен в составе каротиноидов икры ни у одного из исследованных видов рыб. Таким образом, указанные механизмы участия каротиноидов виолаксантинового цикла в дыхании и транспорте кислорода не могут быть использованы для объяснения участия каротиноидов икры в процессах дыхания.

А.А.Яржомбек и А.Е.Грачев (1964) предположили возможность аккумуляции кислорода каротиноидами по двойным связям полиеновой цепи их молекулы. Однако в этой же работе было высказано мнение о невозможности отдачи аккумулированного каротиноидами кислорода субстрату, поскольку для этого нужна пероксидаза, отсутствующая в желточном мешке икры лососевых рыб (Зотин, 1961). Позднее В.Н.Карнаухов (1969, 1970а,б, 1971а,б, 1973а, 1979, 1986, 1988) вновь предположил, что основной функцией каротиноидов животных клеток является депонирование кислорода за счет использования двойных связей их молекул. Однако, нами не обнаружено какой-либо корреляции между изменениями интенсивности поглощения света в видимой (область поглощения света нативными каротиноидами) и ультрафиолетовой частях спектра (предполагаемая В.Н.Карнауховым область поглощения света оксигенированных форм каротиноидов) на разных стадиях эмбрионального развития рыб.

Каротиноиды обладают электронно-акцепторными и электронно-донорными свойствами (Pullman, Pullman, 1963; Комиссаров, Шумов, 1966; Майрановский и др., 1974, 1976а,б; Иоффе и др., 1976), а также протонной проводимостью (Ti Tien, 1974) и, следовательно, могли бы участвовать в окислительно-восстановительных процессах митохондрий. Однако, участки митохондрий, содержащие каротиноиды и ответственные за кальциевый обмен, и участки, участвующие в трансмембранном переносе электронов по дыхательной цепи, пространственно разделены в этих органеллах (Петруняк, 1976б, 1979б).

Таким образом, обсуждаемые выше механизмы участия каротиноидов в окислительно-восстановительных процессах не вносят ясности в понимание функциональной роли каротиноидов в клетках организмов животных.

### **3.3. Каротиноиды в качестве антиоксидантов перекисного окисления липидов.**

Наличие у каротиноидов полиеновой цепи,  $\pi$ -электронные облака которой способны делокализовать энергию, полученную от радикала, позволяет предполагать участие каротиноидов в процессах свободнорадикального перекисного окисления липидов в качестве антиоксидантов.

Это предположение подтверждают полученные нами данные о наличии корреляции между содержанием каротиноидов в жировых каплях и продолжительностью эмбрионального развития вида, при котором требуется более надежная и длительная защита липидов от окисления, а также данные о прямой зависимости степени пигментации жировых капель икры рыб различных экологических групп от кислородных условий ее развития.

По данным М.Н.Мерзляк (1972) антиоксидантная активность  $\beta$ -каротина, выражающаяся в дезактивации синглетного кислорода, в 50 раз выше, чем у  $\alpha$ -токоферола. При этом, антиоксидантная активность каротиноидов возрастает в ряду: каротины, гидроксикаротиноиды, кетокаротиноиды и наибольшей активностью обладает астаксантин (Terao, 1989; Miki, 1991; Palozza, Krinsky, 1992; Капитонов, Пименов, 1996).

Нами установлено, что эмбрионы рыб реагируют на изменения внешних условий среды (температура, кислородные условия, осмотичность) изменением соотношения свободных каротиноидов и их комплексов с кальцием. При этом, изменения воздействия различных факторов как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения, относительно нормы, приводят к однонаправленному изменению этого соотношения, что характерно для процессов, сопряженных с изменением уровня перекисного окисления липидов (Владимиров, Арчаков, 1972). На основании изложенного мы пришли к выводу о возможной взаимосвязи процессов перекисного окисления липидов в икре и взаимодействия каротиноидов желтка с ионами кальция.

### 3.4. Роль каротиноидов в кальциевом обмене.

Результаты исследований причин изменения интенсивности поглощения света каротиноидами в процессе эмбрионального развития рыб свидетельствуют (Микулин, 1978, 1993а; Mikulin, 1992) об обусловленности этих изменений взаимодействием каротиноидов с карбонатами двухвалентных металлов, в частности кальция. Наши результаты совпадают с мнением В.В.Петруняка (1979а,б) о том, что у беспозвоночных каротиноиды и витамин А участвуют в кальциевом обмене клетки.

Рассмотрим участие каротиноидов желтка и клеточной (плазменной) части икры в кальциевом обмене. Уже более 20 лет, как каротиноидсодержащие структуры клеток животных идентифицированы как модифицированные участки митохондрий (Петруняка, 1976б, 1979б). Эти структуры, называемые алькосферулы или кальцесомы, обратимо накапливают  $\text{CaCO}_3$  (Brand et al., 1960; Тимофеев, 1964; Andre, Faure-Fermit, 1967; Gouranton, 1968; Rojnel et al., 1973; Simkiss, 1976; Sminia et al., 1977) при участии карбоангидразы (Simkiss, 1976; Sminia et al., 1977).

Способность как каротиноидов, так и витамина А, образовывать комплексы с  $\text{CaCO}_3$ , а также замена в филогенезе животных каротиноидов на витамин А, позволили сделать вывод о единой функциональной роли этих полие-

нов, выражающейся в участии в кальциевом обмене в мембранных структурах клетки (Петруняк, 1979а,б).

Однако, у большинства рыб основная часть каротиноидов икры находится в желтке и не связана непосредственно ни с мембранными структурами, ни с трансмембранным переносом кальция.

На основании данных об изменении интенсивности поглощения света каротиноидами икры под влиянием меняющихся концентраций кислорода и солей, о наличии кальция в эфирных вытяжках каротиноидов из икры, а также о существовании положительной корреляции между изменением интенсивности поглощения света каротиноидами в ходе эмбриогенеза ряда видов рыб и оводненностью икры (Микулин, 1978, 1993а; Микулин, Котик, Дубровин, 1978; Mikulin, 1992) мы полагаем, что белково-каротиноидные комплексы желтка участвуют в водно-солевом метаболизме икры через кальциевый обмен.

Известна роль  $Ca^{++}$  в адгезивности клеток (Тринкаус, 1972). Нами показано, что изменения интенсивности поглощения света каротиноидами в процессе эмбрионального развития рыб сопоставимы с изменениями адгезивности клеточного материала, отражающими этапность развития рыб.

Полученные данные позволяют считать, что основной причиной изменения интенсивности поглощения света каротиноидами в эмбриогенезе рыб является взаимодействие этих пигментов с солями двухвалентных металлов, а основной функцией каротиноидов белково-каротиноидных комплексов желтка икры является регуляция водно-солевого обмена и адгезивности клеток в морфогенетических процессах зародыша.

Вопрос о причинах высокого разнообразия в содержании каротиноидов как в икре разных видов рыб, так и в икре, полученной от разных самок, в пределах одного вида долго оставался нерешенным.

Нами показана положительная корреляция между концентрацией каротиноидов в икре и размерами икры как в пределах вида, так и у рыб из разных экологических групп, при этом темп протекания морфогенетических процессов в эмбриональном развитии рыб отрицательно скоррелирован с содержа-



нием каротиноидов в белково-каротиноидных комплексах желтка. Более низкий темп развития, видимо, как и снижение температуры у пойкилотермных животных, приводящие к замедлению проходящих в организме процессов, требует более высоких концентраций веществ, участвующих в их регуляции. Следовательно, размеры икришки, количество желтка и, соответственно, содержание каротиноидов, температура и темп эмбрионального развития взаимосвязаны.

Основными участниками кальциевого обмена белково-каротиноидных комплексов желтка икры рыб являются: собственно каротиноиды, кальций, карбоангидраза и углекислый газ (Петруняк, 1979б). Положительная корреляция концентрации каротиноидов в водорастворимой части желтка с размерами самого желтка, видимо, определяется более легким накоплением  $\text{CO}_2$  в икре больших размеров.

Таким образом, разнообразие содержания каротиноидов в желтке икры рыб разных экологических групп объясняется через участие каротиноидов в кальциевом обмене.

## **Глава 4. Цитохромы в пигментации икры рыб.**

### **4.1. Цитохромы в икре различных видов рыб.**

Исследование спектров поглощения света живой икрой ряда видов рыб позволило обнаружить наличие гемопротеидов в икре речной камбалы, камбалы-ершоватки и трески, а также в супернатантах гомогенатов икры зубатки и корейской востробрюшки, речного окуня, атлантической сельди, щуки и иговых рыб. У большинства видов гемопротеиды сосредоточены в водорастворимой части желтка, у камбалы-ершоватки - в клеточной части икришки. В супернатанте икры всех исследованных видов сиговых рыб обнаружен цитохром  $b_{560}$  (Черняев, Арцатбанов, Микулин, Валушок, 1987, 1988). Гемопротеиды икры остальных видов рыб не идентифицированы. Сравнение спектральных характеристик супернатантов икры сиговых рыб и икры представителей

рыб других систематических групп показало, что цитохром  $b_{560}$  достоверно обнаружен только в икре сиговых рыб.

#### **4.2. Локализация и концентрация цитохрома $b_{560}$ в икринках и изменение его содержания в эмбриогенезе сиговых рыб.**

Цитохром  $b_{560}$ , обнаруженный только в водорастворимой части желтка сиговых рыб, имеет спектр поглощения с максимумами света в области 428, 530, 560 нм. Он не связан с мембранными структурами и не содержится в органах и тканях взрослых особей сиговых рыб, а также в плазменной части икры и теле зародыша.

Сравнение содержания гемопротеида в икре разных видов сиговых рыб обнаруживает тенденцию к возрастанию его концентрации у видов, нерестящихся на севере, и уменьшение у видов, нерестующих южнее.

Исследование динамики содержания цитохрома  $b_{560}$  в икре севанского сига в процессе эмбрионального развития показало, что от стадии двух бластомеров до стадии пигментации глаз существенных изменений не обнаружено. После вылупления личинки из оболочки наблюдается резкое снижение содержания цитохрома и его практически полное исчезновение к моменту рассасывания желточного мешка личинок, что еще раз подтверждает специфичность цитохрома  $b_{560}$  именно для желтка сиговых рыб.

#### **4.3. Функциональная роль цитохрома $b_{560}$ в икре сиговых рыб.**

Наличие гемопротеида  $b$ -типа только в икре сиговых рыб не случайно и обусловлено особенностями экологии этих рыб в эмбриогенезе.

Характерной особенностью подавляющего числа сиговых рыб является осенне-зимний нерест с продолжительным (150- 230 суток) периодом развития при низкой температуре: 0-3° на ранних этапах развития с последующим повышением до 5-8° перед вылуплением. Более того, отмечена возможность вмерзания икры сиговых в лед как приспособление для ее выживания в условиях замора в водоемах, гидрохимический режим и характер дна которых неблагоприятны для развития, а также как надежное средство от выедания (Юданов 1939).

Специфичность обнаруженного нами цитохрома  $b_{560}$  для икры сиговых рыб, а также сведения о возможности существования только яиц сиговых в состоянии “пагона” позволили нам (Черняев, Арцатбанов, Микулин, Валюшок, 1987, 1988; Черняев, Валюшок, Арцатбанов, Микулин, 1988; Tcherniaev, Artsatbanov, Mikulin, Valushok, 1988; Tcherniaev, Valushok, Artsatbanov, Mikulin, 1990, 1992) предположить участие цитохрома  $b_{560}$  в процессах, обеспечивающих выживание икры при отрицательных или близких к ним температурах.

Обладая слабой оксидазной активностью, цитохром  $b_{560}$  посредством окисления запасных веществ желтка, по-видимому, высвобождает тепловую энергию, чем поддерживает общее активное метаболическое состояние в икринке. Незначительная оксидазная активность, высокая концентрация и равномерное распределение цитохрома в желтке позволяют равномерно распределять тепло в икринке, не создавая высоких локальных температур.

Полученные данные дают основание предположить, что в процессе эволюции сиговых в суровых условиях Голарктики, их икра получила способность развиваться, будучи замороженной в лед, благодаря цитохрому  $b_{560}$ , который, вероятно, за счет окисления части веществ желтка позволяет получить энергию, необходимую для морфофизиологических процессов. Выявленная нами специфичность цитохрома  $b_{560}$  для икры сиговых, не исключает наличие у других групп рыб, развивающихся при низких температурах, иных гемопротеинов, выполняющих функции аналогичные цитохрому  $b_{560}$ .

#### **4.4. О систематическом ранге сиговых рыб.**

Проведенные нами исследования показали существенные различия как в содержании, так и в качественном составе каротиноидов в икре сиговых и лососевых рыб. Так, в икре сиговых рыб содержание каротиноидов находится в пределах 0,037-0,502 мг% и в среднем составляет 0,3 мг%, а в икре лососевых рыб - 0,145- 10,4 мг% и - 2,5 мг% соответственно. При этом основными каротиноидами икры сиговых рыб являются гидроксикаротиноиды, в то время как в икре лососевых рыб - кетокротиноиды.

Исследования содержания цитохрома  $b_{560}$  в икре рыб показало, что он имеется в икре всех сиговых рыб, в то время как в икре иных исследованных нами видов рыб, в том числе лососевых, сельдевых, щуковых, харациновых карповых, вьюновых, пецилиевых, тресковых, окуневых, зубатковых, керчаковых, круглоперых, голомянковых, камбаловых - цитохром  $b_{560}$  не обнаружен. Наличие цитохрома  $b_{560}$  в икре сиговых рыб в качестве маркера семейства позволяет выделить сиговых рыб в самостоятельное семейство Coregonidae подотряда Salmonoidei.

## Глава 5. Пигменты и пигментация кожи рыб.

### 5.1. Типы пигментных клеток, их дифференциация в онтогенезе и механизмы регуляции окраски рыб.

В разделе обсуждается классификация пигментных клеток, их строение и расположение в коже различных видов рыб, дифференциация в эмбриогенезе, пигментный состав и особенности синтеза отдельных пигментов, а также регуляция цветности этих клеток при различных физиологических состояниях организма.

Отмечено, что образование пигмента в меланофорах происходит практически в три стадии: тирозин последовательно окисляется до ДОФА и далее до индолил-5,6-хинона с последующей полимеризацией, в результате которой образуется меланин. ДОФА также является предшественником дофамина, норадреналина и адреналина (Мецлер, 1980).

Меланофоры в коже рыб располагаются в верхнем слое собственной дермы, около эпидермиса, иногда - и в верхнем, и нижнем слое дермы, реже эпидермисе. Эритрофоры и ксантофоры обычно расположены в собственной дерме и редко бывают в верхнем, пограничном с эпидермисом слое (Friscl 1912).

Местом образования хроматофоров в эмбриогенезе всех классов позвоночных являются скопления клеток нервного гребня. Вначале дифференци-

руются меланофоры дермы, затем ксантофоры и гуанофоры. В процессе онтогенеза от ксантофоров происходят эритрофоры (Ballowitz, 1913, 1914).

Изменения окраски рыб происходят двумя способами: за счет накопления, синтеза или разрушения пигмента в клетке и за счет изменения физиологического состояния самого хроматофора без изменения в нем содержания пигмента.

В регуляции процессов экспансии и контракции как меланофоров, так и эритрофоров важную роль играют как внутриклеточный, так и внеклеточный кальций (Patil, Jain, 1993).

## 5.2. Происхождение пигментации у рыб.

Качественный состав пигментов кожи, структура пигментных клеток и их расположение в коже рыб не случайны и должны отражать эволюционный путь изменения функций этих структур, в процессе которого возникла современная организация пигментного комплекса кожи ныне живущих рыб.

Мы полагаем, что изначально пигментная система участвовала в физиологических процессах организма в составе выделительной системы кожи. Естественно, что одной из задач снижения вредного действия конечных продуктов метаболизма является уменьшение их растворимости в воде путем полимеризации. Это, с одной стороны, позволяет нейтрализовать их токсическое действие и одновременно накапливать в специализированных клетках без значительных энергетических затрат на осморегуляцию с дальнейшим удалением этих полимерных структур из организма. С другой - сам процесс полимеризации часто сопряжен с удлинением структур, поглощающих свет, что может приводить к появлению окрашенных соединений.

В дальнейшем, пигментный комплекс кожи рыб стал участвовать в регуляции фотохимических процессов, протекающих в кориуме, а на поздних этапах эволюционного развития - стал выполнять функцию собственно окраски рыб.

Таким образом, сама окраска, видимо, являлась преобразованным следствием выполнения пигментами иных физиологических функций, связанных с поверхностью тела и, в результате отбора, приобрела самостоятельную функцию в мимикрии и для сигнальных целей.

### 5.3. Экологическое значение окраски для рыб.

В этом разделе мы не рассматриваем значение окраски покровов в коммуникации рыб, уделяя основное внимание возникновению различных типов окраски, как изменение физиологических функций кожи в различных условиях среды обитания рыб.

Так, окраска, сопряженная со специфическим распределением пигментных клеток в коже пелагических рыб, вероятно исходно имела физиологический смысл. В эволюционном плане при переходе бесчерепных из обитания в морском грунте в пресные воды Пангеи (Микулин, 1997а, 1998а,б), где инсоляция значительно выше, возникла необходимость пассивной регуляции светопропускания в кожу. Видимо у древних рыб, а также у наземных позвоночных вплоть до млекопитающих, меланин располагался в эктодермальных меланоцитах и через воздействие света организм регулировал производство самого меланина. В процессе дальнейшей эволюции рыб появились меланофоры, которые позволяли регулировать светопропускание через кожу, не изменяя количества самого меланина в клетках. Именно по этой причине у древних истинно пресноводных рыб отсутствует гуанин и каротиноиды в коже, так как в пресных водах света и ультрафиолета в избытке. С переходом к морскому обитанию появляется необходимость в увеличении светопрохождения через кожу. Поэтому у древних костистых, требующих более тонкой регуляции потока света в коже не только в глазах, но и в коже (сельди и др.) возникает гуанин, а далее - и каротиноиды, особенно у видов, вторично перешедших в пресные воды (лососи карповые).

Для обитателей приповерхностных вод, подверженных влиянию значительной инсоляции, на дорсальной части тела необходима мощная меланиновая пигментация в виде меланофоров верхней части дермы (для регуляции

ропускания света в кожу) и в нижнем слое дермы (для экранирования организма от избытка света).

На наш взгляд донные рыбы, ведущие малоподвижный образ жизни, для регуляции фотохимических процессов в коже должны обладать способностью быстрого изменения физиологического состояния отдельных групп пигментных клеток в соответствии с локальной фокусировкой света на поверхности кожи, возникающий в процессе преломления света поверхностью воды во время волнения и ряби. Эта способность вследствие отбора и могла привести к возникновению защитной окраски, выражающейся в быстром изменении тона или рисунка тела под цвет дна. Интересно отметить, что высокой способностью изменять свою окраску обладают обычно донные обитатели или рыбы, редки которых были донными.

Уменьшение освещенности с глубиной на наш взгляд, приводит к необходимости увеличения светопропускания через покровы, а следовательно, к снижению количества меланофоров с одновременным усилением регуляции зетопроникновения с помощью липофоров. Именно с этим, видимо, связано то, что с глубиной окраска рыб приобретает красный оттенок и у многих полугубоководных видов становится красной (Расс, 1964).

Следует отметить, что у всех древних, исходно пресноводных рыб с полным неравномерным дроблением яйца, икринки содержат гранулы меланина и практически не имеют каротиноидов, в то время как морские виды с внутренним оплодотворением (хрящевые, кистеперые) и вторично пресноводные с искоидальным дроблением, наоборот, как правило, имеют каротиноиды и не содержат меланина в яйцах. Возможно, это связано с изменением особенностей липидного обмена в связи с различиями в осморегуляции у пресноводных и морских организмов, а также с возрастанием роли изменения адгезивности клеточного материала в морфогенетических процессах развития костистых рыб (Ликулин, 1983).

Таким образом, столь сложная организация пигментной системы кожи, позволяющая изменять окраску многим рыбам и приспосабливаться к раз-

личным условиям обитания, имела свою предысторию со сменой функций, таких как участие в выделительных процессах, в фотопроцессах кожи и, наконец, в собственно окраске тела рыб.

## **Приложение.**

### **Методы сохранения естественной окраски гидробионтов.**

#### **Глава 6. Проблемы сохранения естественной окраски рыб и других гидробионтов при создании музейных препаратов.**

В этой главе на основании представленных в диссертации данных о структурной организации и физико-химических свойствах пигментов рыб, а также критического обзора существующих методов фиксации рыб, излагаются принципы создания методов фиксации с сохранением естественной окраски гидробионтов.

##### **6.1. Обзор методов изготовления музейных препаратов гидробионтов.**

Обзор методов изготовления музейных препаратов гидробионтов показывает, что не существует универсального метода фиксации гидробионтов, позволяющего длительно сохранять их естественную окраску.

##### **6.2. Принципы создания фиксирующих смесей для сохранения естественной окраски рыб и других гидробионтов.**

Компоненты фиксаторов, позволяющих сохранять естественную окраску гидробионтов, должны быть водорастворимыми, бесцветными или терять свой цвет в процессе дальнейшей обработки объекта.

Бальзамирующий агент в составе фиксатора должен предотвращать гниение объекта, а также останавливать лизирующее действие пищеварительных ферментов. Он не должен вызывать свертывание белков и побеление мукополисахаридов слизи кожи, входить в реакцию с пигментами или нарушать структурную организацию пигментов в клетке.

В связи с тем, что ряд пигментов, в частности каротиноиды, легко окисляемы, в составе фиксатора не должно быть кислорода и перекисных соединений.



Ранее было показано взаимодействие каротиноидных пигментов как *in vivo*, так и *in vitro* с солями двухвалентных металлов, приводящее к уменьшению интенсивности цвета пигментов. Для предотвращения или снижения этого взаимодействия в состав фиксатора введены вещества, хелатирующие эти катионы.

Важной проблемой в сохранении цвета жирорастворимых пигментов является поддержание нативного состояния липидных структур в объекте. Характерной особенностью ряда жиронерастворимых пигментов является стабильность их цвета в определенном диапазоне рН, что обуславливает необходимость поддержания определенного рН фиксатора в зависимости от состава пигментов.

Соблюдение всех вышеперечисленных принципов лежит в основе создания ряда новых фиксирующих растворов для различных систематических групп рыб и иных гидробионтов (Микулин, 1994б), позволяющих длительно сохранять их естественную окраску.

Помимо состава самих фиксирующих растворов, существует еще две группы проблем. Первая - это регуляция интенсивности самой окраски объекта до начала процесса ее фиксации. В нее входят задачи усиления естественной окраски объекта, вплоть до искусственного получения брачного наряда, или ослабление яркости и насыщенности цвета отдельных пигментных клеток для выявления тонов, замаскированных ими. Вторая - разработка способов поддержания при пространственном размещении одного или нескольких объектов в экспозиционной емкости. Эта проблема может быть решена путем введения в состав фиксатора водорастворимых мономеров водосодержащих прозрачных пластмасс, позволяющих после их полимеризации удерживать объект в заданном положении внутри экспозиционной емкости.

Компоненты фиксирующей среды должны также увеличивать жесткость структур объекта, что особенно важно для рыб с вуалевой формой плавников и для гидробионтов, имеющих мягкие структуры, особенно при большом содержании в их теле воды.

Теоретические основы решения этих проблем и экспериментальная разработка методов создания фиксаторов, сохраняющих прижизненную форму и естественную окраску гидробионтов, изложены в последующих главах.

## Глава 7. Фиксация рыб по методу “Формик”.

### 7.3. Способы, применяемые для быстрого изменения окраски рыб.

Экспансию меланофоров усиливают перекиси, в частности гидроперит, однако они способствуют перекисному окислению липидов и окислению каротиноидных пигментов. Экспансии меланофоров способствуют многие поверхностно-активные вещества (Строганов, 1962). В качестве эффективных веществ, осуществляющих экспансию и контракцию меланофоров, нами предложены растворы акриламида и  $KNO_3$ .

### 7.4. Составы фиксаторов для метода “Формик”.

В качестве бальзамирующего агента оптимален формальдегид или его водный раствор - формалин, однако его высокие концентрации разрушают гуанин и вызывают побеление тканей. В качестве вещества восстанавливающего поддерживающего или усиливающего прозрачность структур фиксируемого объекта нами предложен  $N,N,N',N'$ -тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД).

Для удаления кислорода из раствора предложена система, состоящая из ТЕМЭД и метилсенового синего. Удаление кислорода из раствора происходит на свету. Возбужденная молекула метилсенового синего, окисляя ТЕМЭД сама восстанавливается, затем вновь окисляется кислородом, растворенным данной системе. По мере удаления растворенного в фиксаторе кислорода растворе остается только бесцветная восстановленная форма метилсенового синего.

Процесс перекисного окисления липидов на начальных его этапах ингибировали путем хелатирования негеминового железа динатриевой солью этилендиамин- $N,N,N',N'$ -тетрауксусной кислоты (ЭДТА) с одновременным изытием кислорода из системы при помощи ТЕМЭД и метилсенового синего.

С учетом всех указанных требований к свойствам фиксирующего раствора были разработаны сравнительно универсальные фиксирующие раствор

серии “Формик” содержащие: формальдегид, ЭДТА, ТЕМЭД и метиленовый синий. Растворы с различным соотношением этих компонентов использовали для расправления плавников, придания им жесткости и последующей фиксации тканей с сохранением естественной окраски большинства видов рыб.

Для рыб с гуаниновым блеском чешуи необходимо осуществлять постепенное снижение содержания формальдегида в растворе, благодаря чему значительно увеличивается срок сохранности гуанинового блеска.

## **Глава 8. Изготовление препаратов по методу “Пластик”.**

Задачей данного метода являлось, помимо сохранения естественной окраски объекта, создание пространственной композиции из одного или нескольких объектов. В качестве наполнителя нами использован полиакриламидный гель (Микулин, 1990). Изготовление препаратов по методу “Пластик” включает 4 этапа: проведение объекта по методу “Формик”; отмывка объекта от формальдегида; пропитка объекта составом, включающим мономеры полиакриламида (ПАА); помещение объекта в заключающую среду с последующей полимеризацией мономеров акриламида.

### **8.1. Растворы для метода “Пластик”.**

Для большинства объектов (мелкие рыбы, земноводные, кишечнорастворимые и другие беспозвоночные) используются заключающие растворы состава: мономеры акриламида (АА) и N,N'-метилен-бис-акриламида (БИС), ЭДТА, ТЕМЭД и метиленовый синий.

Недостатком метода полимеризации мономеров АА с использованием персульфата аммония (ПСА) и ТЕМЭД является невозможность одновременной пропитки всеми этими компонентами объекта консервации, поскольку эти вещества вызывают полимеризацию еще до пропитки объекта.

Существуют иные способы полимеризации АА с использованием радиации, света в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, ультразвука, электрического тока. Фотополимеризацию АА сенсibiliзируют комплексы минокобальта с тиоцианатом калия, а также различные красители в присут-

ствии восстанавливающих агентов (Абрамова, Байбурдов и др., 1992). Мы в качестве инициатора фотополимеризации АА использовали метиленовую синь (МС), в качестве восстановителя - ТЕМЭД. При использовании этих соединений объект пропитывали в темноте одновременно всеми компонентами раствора с последующей полимеризацией АА при помощи света.

Перед помещением объекта в пропитывающий раствор, обязательно отмывка его от формальдегида, поскольку в присутствии железа, находящегося в составе гемоглобина, формальдегид под действием перекисей липидных мембран вызывает полимеризацию АА с образованием белых непрозрачных кристаллогидратов, приводящих впоследствии к разрыву тела рыбы в области брюшной полости и жаберных крышек.

Модификации этого метода позволяют также создавать препараты эмбриологического материала рыб.

## ВЫВОДЫ

1. В процессе онтогенеза рыб состав их пигментов закономерно меняется. На ранних стадиях эмбриогенеза основными пигментами у двоякодышащих и ганоидных рыб является меланин, у костистых рыб - каротиноиды, дополнительно к которым у некоторых из них, в частности сиговых обнаружены гемопротеиды, а у ряда видов скорпенообразных - биливердиноподобный пигмент и его белковый комплекс. На поздних этапах эмбриогенеза и в коже взрослых рыб появляются птерины, гуанин и меланин.

2. Качественный состав каротиноидов тела рыб и их икры обусловлены тремя основными факторами: поступлением пигментов с пищей; метаболическими процессами с участием каротиноидов в организме; особенностями перераспределения каротиноидов между различными органами и тканями, в том числе их транспортом из печени в яйцеклетки.

3. Качественный состав каротиноидов икры не является строго заданным для того или иного вида; в эмбриональном периоде не несет самостоятельной функциональной нагрузки. Каротиноиды развивающегося з

дыша не могут участвовать в процессах дыхания с переносом кислорода за счет преобразования кислородосодержащих группировок этих пигментов.

4. Полифункциональность каротиноидов в различных частях развивающегося эмбриона обусловлена их разным химическим состоянием и неодинаковой концентрацией в субклеточных структурах: в плазменной или зародышевой части икры свободные или этерифицированные каротиноиды находятся в мембранах органелл клеток; в водорастворимой части желтка или в мембранах желточных гранул - в форме белково-каротиноидных комплексов; в жировых каплях желтка - в свободном виде, растворенные в жирах.

5. Различия в распределении каротиноидов между структурными элементами икринок у разных рыб обусловлены экологическими условиями развития, характерными для вида. Наличие в той или иной степени каротиноидов в плазменной части икринки характерно для всех видов рыб. Белково-каротиноидные комплексы желтка отсутствуют у большинства пелагофильных и литофильных рыб. Высокие концентрации каротиноидов в жировых каплях желтка характерны для рыб, развитие которых происходит в условиях высокого содержания кислорода и для рыб с продолжительным периодом эмбрионального развития.

6. Размеры икринки и продолжительность эмбрионального развития, различающиеся у рыб различных экологических групп по размножению, являются определяющими факторами концентрации в ней каротиноидов.

7. В эмбриогенезе рыб происходят закономерные изменения интенсивности поглощения света каротиноидами, обусловленные различным соотношением в икре каротиноидов, связанных с углекислым кальцием и не связанных с ним, которое отражает специфику изменения адгезивности желточного материала на разных этапах эмбрионального развития рыб и зависит от изменений условий развития, таких как: температурные, осмотические и кислородные условия среды. В этом процессе участвуют только каротиноиды зародышевой части икры и белково-каротиноидные комплексы

желтка. В эмбриональном развитии рыб каротиноиды переходят из желтка в тело зародыша.

8. Основная функция каротиноидов мембранных структур клеточной части икры и белково-каротиноидных комплексов желтка состоит в участии в кальциевом обмене, благодаря которому осуществляется регуляция водно-солевого обмена и адгезивности клеток в морфогенетических процессах зародыша. Каротиноиды, являясь антиоксидантами перекисного окисления липидов, защищают их от спонтанного окисления.

9. В окраске икры всех видов сиговых рыб участвует цитохром  $b$  типа, находящийся только в водорастворимой части желтка икры, и не связанный с мембранными структурами. Его роль заключается в участии в несопряженном с получением АТФ окислении веществ желтка с выделением энергии, необходимой для эмбрионального развития сиговых рыб при низких температурах. Наличие цитохрома  $b_{560}$  исключительно в икре сиговых рыб является биохимическим маркером семейства Coregonidae.

10. В филогенезе рыб формирование пигментации кожи происходило в три этапа и сопровождалось преобразованием и сменой функции пигментной системы: 1. участие в выделительной функции кожи; 2. регуляция фотохимических процессов в коже; 3. использование пигментных клеток в формировании окраски рыб. В различных органах и тканях рыб и их икры пигменты осуществляют отдельные функции пигментного комплекса кожи.

11. На основании исследования структуры и функций пигментов пигментной системы кожи рыб разработан новый метод фиксации гидробионтов с сохранением их естественной окраски.

#### Основные публикации по теме диссертации.

1. Микулин А.Е., Соин С.Г. 1974. О возможном механизме участия каротиноидов в окислительном метаболизме развивающейся икры рыб // Тез. Всесоюз. конф. "Биология промысловых рыб и беспозвоночных на ранних стадиях развития (в связи с вопросами динамики численности)". Мурманск. С. 137-139.

2. Микулин А.Е., Соин С.Г. 1975. О функциональном значении каротиноидов в эмбриональном развитии костистых рыб // *Вопр. ихтиологии*. Т. 15. Вып. 5 (94). С. 833-844.
3. Микулин А.Е., Котик Л.В. 1978. Динамика количественного распределения каротиноидов в икре пинагора (*Cyclopterus lumpus L.*) в процессе эмбрионального развития // *Тез. докл. II Всесоюз. конф. "Вопросы раннего онтогенеза рыб"*. Киев: Наукова думка. С. 120-121.
4. Микулин А.Е., Герасимчук В.В., Дубровин В.Н. 1978. Пигментация икры пинагора *Cyclopterus lumpus L.* // *Вопр. ихтиологии*. Т. 18. Вып. 5 (112). С. 917-923.
5. Микулин А.Е., Котик Л.В., Дубровин В.Н. 1978. Закономерности динамики изменения каротиноидных пигментов в процессе эмбрионального развития костистых рыб // *Биол. науки*. N. 9. С. 31-37.
6. Микулин А.Е. 1978. Исследование роли каротиноидных пигментов в эмбриогенезе рыб. Автореф. дисс... канд. биол. наук. М.: МГУ, 24 с.
7. Микулин А.Е., Дубровин В.Н., Котик Л.В., Стешенко Е.М., Пахлавуни И.К., Аверьянова О.В. 1979. Роль каротиноидов в дыхании и водно-солевом обмене икры рыб // *Тез. докл. IV Всесоюзн. конф. по экол. физиол. и биохимии рыб*. Астрахань: Изд-во ЦНИОРХ. Т. 11. С. 135-136.
8. Микулин А.Е. 1981а. Причины разнообразия количественного содержания каротиноидов в икре пинагора *Cyclopterus lumpus L.* (*Cyclopteridae*) // *Вопр. ихтиологии*. Т. 21 Вып. 2 (127). С. 386-390.
9. Микулин А.Е. 1981б. Спектральные характеристики икринок некоторых видов рыб // *Вопр. ихтиологии*. Т. 21. Вып. 4 (129). С. 737-741.
10. Микулин А.Е., Стешенко Е.М. 1981. Влияние факторов среды на структурные изменения каротиноидов в икре рыб // *Биол. науки*. N 7. С. 18-23.
11. Микулин А.Е., Петруняка В.В. 1982. Роль качественного состава каротиноидов в метаболизме икры рыб // *Тез. докл. V Всесоюз. конф. по экол. физиол. и биохимии рыб*. Киев: Наукова думка. Ч. 3. С. 90-91.

12. Микулин А.Е. 1983. Каротиноиды и адгезия клеток в эмбриогенезе рыб // Тез. докл. III Всесоюз. совещ. "Проблемы раннего онтогенеза рыб". Калининград. С. 169-171.
13. Микулин А.Е., Сивцева Л.В. 1985. Каротиноиды кожи рыб // Тез. докл. V Всесоюз. конф. по экол. физиол. и биохимии рыб. Вильнюс. С. 154-155.
14. Черняев Ж. А., Арцатбанов В. Ю., Микулин А. Е., Валушок Д. С. 198 Цитохром "О" в икре сиговых рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 27. В. 5. С. 867-869
15. Черняев Ж. А., Арцатбанов В. Ю., Микулин А. Е., Валушок Д. С. 198 Особенности пигментации икры сиговых рыб // Сб. науч. тр. "Биология сиговых рыб". М.: Наука. С. 152-160.
16. Черняев Ж. А., Валушок Д. С., Арцатбанов В. Ю., Микулин А. Е. 198 Цитохром "О" в икре сиговых рыб как биохимический маркер семейства Coregonidae // Тез. докл. III Всесоюз. совещ. по лососевидным рыбам Тольятти. С. 372-374.
17. Tcherniaev G., Artsatbanov V., Mikulin A., Valushok D. 1988. The cytochrome b-type (cytochrome "O") in the eggs of Coregonidae how a family's marker // Congr. of Europ. Ichthyologists. Budapest. P. 192.
18. Микулин А.Е. 1988. Демонстрационные препараты гидробионтов // Тез. докл. XXII науч. конф. ВЗИП. С. 12.
19. Микулин А.Е. 1990. Фиксация икры и личинок рыб с сохранением их естественной окраски // Сб. науч. тр. ВНИИПРХ "Водные ресурсы и экология гидробионтов". М.: ВНИИПРХ. В. 59. С. 136-140.
20. Tcherniaev G.A., Valiouchok D.S., Artzatbanov V.J. and Mikulin A.E. 1990. The cytochrome b-type (Cytochrome "O") on the eggs of whitefishes: a family marker Coregonidae // Int. Symp. on Biol. and Manag. of Coregonid Fishes. Canada Quebec. P.145.
21. Микулин А.Е., Микодина Е.В., Коуржил Я., Гамачкова И., Наволоцкий В. 1992. Действие анестетиков хинальдина и менокaina на некоторые виды чужеродных рыб // Сб. науч. тр. ВНИИПРХ "Водные биоресурсы, воспроизводство и экология гидробионтов". М.: ВНИИПРХ. В. 66. С. 123-127.



22. Mikulin A.E. 1992. Composition and functions of pigments in bone fishes embryogenesis // Proc. of Sc. Conf. "Fish Reproduction-92". CSSR: Vodnany. P.76-81.
23. Tcherniaev G.A., Valyushok D.S., Artzatbanov V.Yu., Mikulin A.E. 1992. Cytochrome b<sub>560</sub> in the eggs of whitefishes as a biochemical marker of the family Coregonidae // Polsk. Arch. Hydrobiol. V. 39. N 3-4. P. 609-614.
24. Микулин А.Е. 1993. Причины изменения спектральных свойств каротиноидов в эмбриональном развитии костистых рыб // Сб. науч. тр. ВНИРО "Биологически активные вещества и факторы в аквакультуре". М.: ВНИРО. С. 163-177.
25. Микулин А.Е. 1993а. Останутся в коллекции // Аквариум. В. 2. С. 32-33.
26. Микулин А.Е. 1993б. Использование биологически активных веществ // Секреты аквариумного рыбоводства. М.: Нива России. С. 230-240.
27. Микулин А.Е. 1994. Метод фиксации рыб с сохранением их естественной окраски // Живые корма. М.: Дельфин. С. 101-103.
28. Микулин А.Е. 1997. Роль пигментов в онтогенезе рыб // Тез. докл. 1 конгр. ихтиологов России. Астрахань. М.: ВНИРО. С. 255.
29. Микулин А.Е. 1997а. Систематика, филогенез и зоогеография рыбообразных и рыб. М.: Центросоюз, 159 с.
30. Микулин А.Е. 1998. Особенности молекулярной структуры каротиноидов и их функциональное значение // Тез. междунар. науч.-техн. конф. "Приоритетные технологии в пищевой промышленности". В. 1. М.: МГЗИПП. С. 59-60.
31. Микулин А.Е. 1998а. Причины различий в степени ненасыщенности липидов различных клеточных структур // Тез. междунар. науч.-техн. конфер. "Приоритетные технологии в пищевой промышленности". В. 1. М.: МГЗИПП. С. 56-7.
32. Микулин А.Е. 1998б. Состав и физиологическое состояние пигментов, определяющих естественную окраску на разных этапах онтогенеза рыб, и принципы ее сохранения // Тез докл. Всерос. симп. "Возрастная и экологическая физиология рыб". Борок. С. 69-70.