

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Suzana Stanković

Potrošnja kisika u jajačima hridinskog ježinca
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) prije i
poslije oplodnje

DIPLOMSKI RAD

Dubrovnik, 2009.

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Suzana Stanković

Potrošnja kisika u jajačima hridinskog ježinca
Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) prije i
poslije oplodnje

DIPLOMSKI RAD

Mentor:
prof. dr. sc. Čedomil Lucu

Dubrovnik, 2009.

Ovaj završni rad izrađen je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Čedomila Lucua, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za Akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

Želim se zahvaliti svom mentoru, prof. dr. sc. Čedomilu Lucuu na omogućavanju svih uvjeta za obavljanje praktičnog rada kao i korisnim savjetima.

Također velika hvala kolegici Vidi Čadež na pomoći kod terenskog sakupljanja uzoraka te na pomaganju u laboratoriju.

I mojim roditeljima koji su mi bili potpora tijekom svih ovih godina studiranja.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1 Kratak pregled biologije i života morskog ježinca s osvrtom na hridinskog ježinca <i>Paracentrotus lividus</i>	1
1.2 Oplodnja i kratki opis razvojnih stadija.....	4
1.3 Aerobni metabolizam neoplođenih i oplođenih embrionalnih stadija ježinca.....	7
2. Materijali i metode.....	11
2.1 Sakupljanje ježinaca <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816).....	11
2.2 Metoda mjerena potrošnje kisika.....	11
2.3 Priprava elektrode za rad (baždarenje instrumenta).....	12
2.4 Mjerena potrošnje kisika neoplođenih jajašaca.....	16
2.5 Mjerena potrošnje kisika nakon oplodnje.....	17
2.6 Ubrizgavanje rotenona.....	17
2.7 Izračun potrošnje kisika.....	18
2.8 Mjerena koncentracije proteina.....	19
3. Rezultati.....	20
3.1 Prikaz ravnotežnog stanja u komorici prije mjerena potrošnje kisika u jajašcima hridinskog ježinca <i>Paracentrotus lividus</i>	20
3.2 Potrošnja kisika neoplođenih i oplođenih jajašaca hridinskog ježinca.....	21
3.3 Utjecaj rotenona na potrošnju kisika.....	23
3.4 Prikaz razvojnih stadija hridinskog ježinca <i>Paracentrotus lividus</i> s osobitim osvrtom na faze u kojima je izvršeno istraživanje.....	25
4. Rasprava.....	27
4.1 Povećana potrošnja O ₂ kod oplođenih jajašaca i njeni uzroci.....	27
4.2 Važnost energetike potrošnje kisika u ranim embrionalnim stadijima ježinca.....	29
4.3 Utjecaj rotenona na potrošnju O ₂ u embrionalnim stadijima ježinca.....	30
5. Zaključak.....	31
6. Literatura.....	32

SAŽETAK

Potrošnja kisika u jajačima hridinskog ježinca *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) prije i poslije oplodnje

Kisik ima središnju ulogu u metaboličkim procesima kod morskih ježinaca. Mjerenja metabolizma jaja i ličinki morskog ježinca važna su zbog spoznaje o energijskim potrebama njihova razvoja. Respiracija ježinaca je posredovana mitohondrijskom respiracijom, odnosno oksidativnom fosforilacijom. Potrošnja kisika kod jajačaca hridinskog ježinca *Paracentrotus lividus* (Lmk) mjerena je polarografskom metodom prije i jedan sat nakon oplodnje u metaboličkoj komorici sa ugrađenom Clakovom elektrodom. Prosječne vrijednosti potrošnje kisika neoplodenih jajačaca iznosile su $0,12 \mu \text{ mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$, dok je nakon oplodnje potrošnja kisika povećana oko 3,1 puta ($0,38 \mu \text{ mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Praćenjem potrošnje kisika nije došlo do malformacija jajačaca koja su formirana sa normalnim fertilizacijskim membranama i pojavom prvog brazdanja. Koncentracija $45,7 \mu\text{mol/L}$ rotenona dodana u metaboličku komoricu neposredno nakon oplodnje inhibirala je povećanje potrošnje kisika i održala potrošnju kisika na razini neoplodenih jajačaca. U uvjetima nakon dodavanja rotenona, stvorena je fertilizacijska membrana, te je vidljiv početak stvaranja perivitelinskog prostora i izostanak prvog brazdanja. Ustanovljena je složena uloga NADHa u pretvorbi stanične energije i mobilizaciji potrošnje kisika za zadovoljenje energetskih potreba ježinaca u prvom satu nakon oplodnje.

Ključne riječi: *Paracentrotus lividus* / potrošnja kisika /oplodnja / rotenon

ABSTRACT

Oxygen consumption in the eggs of edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) before and after fertilization

Oxygen has a central role in performing metabolic processes in sea urchins. Precise measurings of metabolism in the eggs and larvae of marine echinoids are important in order to learn about the energy needs for their development. Respiration of the sea urchin is mediated by mitochondrion respiration, that is, oxidative phosphorylation. Measuring the oxygen consumption in eggs of edible sea urchin

Paracentrotus lividus (Lmk) were measured with polarographic method before and one hour after fertilization in metabolic chamber with Clark's electrode. General values of oxygen consumption of the unfertilized eggs were $0,12 \mu \text{ mol O}_2 \text{ mg proteins}^{-1} \text{ h}^{-1}$, while after the fertilization the oxygen consumption was increased about 3,1 times ($0,38 \mu \text{ mol O}_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Monitoring of oxygen consumption shows that there was no malformation of the eggs, and the eggs were formed with normal fertilization membranes and appearance of first cleavage. Concentration of $45,7 \mu\text{mol/L}$ of rotenone added into the metabolic chamber after the fertilization inhibited the oxygen consumption and kept the level of oxygen consumption on the same level of as the unfertilized eggs. After adding rotenone, fertilization membrane was formed, also we can see the begining of formation of the periviteline space, but first cleavage was not observed. Complicated role of NADH was established in transforming of cell energy and mobilization of oxygen consumption with contentment of energetic needs of sea urchins in the first hour after fertilization.

Keywords: *Paracentrotus lividus* / oxygen consumption / fertilization / rotenone

1. UVOD

1.1 Kratak pregled biologije i života morskog ježinca s osvrtom na hridinskog ježinca *Paracentrotus lividus*

Ježinci su kozmopolitska skupina morskih beskralješnjaka koji naseljavaju većinom morska staništa diljem svijeta, od polova do ekvatora i od plitkih područja do 5000 m dubine. Pripadaju razredu Echinoidea, jednom od pet razreda koljena Echinodermata (bodljikaši), u koje spadaju i njegovi srodnici trpovi, zmijače, zvjezdače i stapčari. Detaljni fosilni podaci protežu se unazad 450 milijuna godina iz razdoblja kasnog ordovicia (Smith, 2001).

S obzirom na tjelesnu simetriju, morske ježince možemo podijeliti na regularne (pravilne) i iregularne (nepravilne) ježince (Yokota i sur., 2002). Regularni ježinci su se evolucijski pojavili ranije, a glavno obilježje im je pravilna, pterozrakasta simetrija tijela. Usta su im na sredini oralne strane, a crijevni otvor na vršnom polju. Njihove bodlje su dugačke i čvrste, a žive i pokreću se puzeći po morskom dnu (epifauna). Nešto kasnije pojavili su se ježinci sa bilateralnom simetrijom tijela te su se počeli zakopavati u mekani sediment (infauna). Čahura iregularnih ježinaca je rijetko kružnog obriša, najčešće je jajasta i spljoštena. Kod njih je došlo do evolucijskog pomaka usta prema naprijed i anusa prema unazad od originalne središnje pozicije kod ranijih oblika (www.bbm.me.uk). Bodlje su im mekane i četinaste.

Glavne značajke ježinaca koje ih razlikuju od drugih morskih organizama su unutarnji skelet, vodožilni sustav i pterozrakasta simetrija. Kao i svi bodljikaši, ježinci imaju skelet koji se sastoji od kalcitnih pločica presvučenih tankim epitelom zbog čega se njihov skelet naziva endoskelet (Black, 1988). Kod skoro svih vrsta ježinaca pločice skeleta su čvrsto povezane i tvore čahuru. Pločice imaju rupice kroz koje prolaze prionjljive (ambulakralne) nožice (podiji). Zbog toga se tih 5 dvoredova pločica zovu ambulakralne pločice (Yokota i sur., 2002). Između njih je 5 dvoredova interambulakralnih (međuzrakastih, interadijalnih) pločica, a s unutranje strane interambulakralnih pločica se nalaze gonade. Mekani dijelovi čahure su usni (oralni) i vršni (aboralni) pol. Na vršnom polju su spolni otvori, dok je crijevni otvor malo izvan vršnog polja. Usno polje je složenije građe od vršnog jer u njemu nalazi žvačni aparat (Aristotelova svjetiljka).

U obrani ježinca sudjeluju bodlje i pedicelarije koje se nalaze na površini čahure. Bodlje služe za obranu i pokretanje. Svaka bodlja sastoji se od tri dijela: dugog štapa bodlje, kratkog vrata i baze (Flugel, 2004). Svaka pojedina bodlja se može zaključati u čvrstu poziciju pomoću posebnoga tkiva i tako sudjelovati u obrani od predatora (www.nhm.ac.uk).

Na površini tijela ježinaca nalaze se i sitne štipaljke ili pedicelarije (Chenoweth, 1994). Sastoje se od drška na kojem su čeljusti, a funkcioniраju kao kljun kod ptica. Štipaljke služe za čišćenje površine tijela, obranu, hvatanje plijena, sakupljanje sitne hrane, ali i za držanje kamenčića i algi za one vrste koje se pokrivaju. Sa nekim vrstama ježinaca je teško rukovati jer imaju pedicelarije sa otrovnim žljezdama (Harrison 1994).

Za obranu ježinci znaju korisiti i maskiranje. Većinom se radi o ježincima koji imaju tanke bodlje kao što su oni iz reda Cidaroida. Područje između njihovih bodlji je idealno za razvoj algi i malih organizama što osigurava prirodno maskiranje. Druga vrsta maskiranja je primjećenja kod ježinaca sa čvrstim bodljama. Kod njih ambulakralne nožice drže alge i kamenčice na vršnome polu.

Na čahuri ježinca jasno se vide prionjljive ili ambulakralne nožice. Raspoređene su u 5 dvoredova od peristomalne membrane koja se nalazi oko usta do periprokta na analnom dijelu (Yokota i sur., 2002). Gradene su od dugog i kratkog drška koji na vrhu nosi prijanjalku. Osim u pokretanju, ambulakralne nožice igraju ulogu u donošenju kisika u tijelo i otklanjanju otpadnih plinova kao što je CO₂ (www.nhm.ac.uk). Ambulakralna nožica je povezana sa unutrašnjošću čahure pomoću ampule. Cirkulacija morske vode je konstantna i jednosmјerno kruži od unutarnje ampule do vanjske ambulakralne nožice i natrag u ampulu, a plinovi difuziraju preko tankih zidova vanjskih i unutarnjih organa.

Bitna morfološka značajka svih bodljikaša je i vodožilni sustav (Ferguson, 1995). On započinje od prstenaste cjevčice koja se nalazi oko žvačnog aparata a nadovezuje se na „stone“ kanal koji izlazi na vršnom polju (Black, 1988). Sa strana kružnog kanala se pružaju radikalne cjevčice koje prolaze do svake amulakralne pločice. Sa strana radikalnih cjevčica su ampule s kojima su povezane ambulakralne nožice. Ovaj sustav služi za pokretanje, hranjenje, otklanjanje štetnih proizvoda metabolizma i disanje (Lehmann i Hillmer, 1983).

Ježinci se mogu hraniti na različite načine. Regularni ježinci se primarno hrane koristeći žvačni aparat. Pomoću njega mogu gristi i strugati. Mnogi ježinci koji žive

u plićim područjima su biljojedi tj. hrane se algama, obraštajem i morskom travom. Druge vrste ježinaca se hrane sesilnim organizmima, leševima uginulih organizama i detritusom sa morskoga dna, pa čak i spužvama, dagnjama i prljepcima. Jako malo se zna o prehrani dubokomorskih regularnih ježinaca, ali smatra se da su karnivori i da se hrane sesilnim organizmima ili lešinama.

Iregularni ježinci su primarni filtratori organizmi („filter feederi“), koji žive na finom organskom materijalu koji se nalazi na morskom dnu. Oni gutaju velike količine sedimenta koji prolazi njihovim želucem, dok se organski materijal zadržava.

Ježinci su tijekom evolucije razvili brojne prilagodbe koje im pomažu da prežive: imaju osjet dodira (ako ih bilo što dotakne oni okrenu svoje bodlje prema dijelu gdje su osjetili dodir), osjetljivi su na svjetlo (zbog toga su nokturni organizmi) i morske struje (da bi se zaštitili od jakih strujanja i valova ulaze u rupe na stijenama). Posjeduju i mogućnost regeneracije ali za razliku od zvjezdače ona je djelomična, pa ne mogu regenerirati jako oštećenu čahuru dok otpale bodlje mogu.

Morski ježinci su odvojena spola, ali bez istaknutog spolnog dimorfizma. Životni ciklus zaopćinje sa izbacivanjem sperme i jaja u vodenim stupacima. Početak mriješta je sinkroniziran i vezan za određenu lokaciju naseljenju ježincima a potiče se kolebanjem abitoskih čimbenika (temperatura). Jaja su oplođena unutar vodenog stupca i nastavljaju se brzo razvijati u plivajuću ličinku koja se naziva echinopluteus. Ličinke migriraju u gornje slojeve vode i imaju duge cilijarne izdanke koje koriste za hvatanje fitoplanktona kojim se hrane.

Nakon nekoliko tjedana planktonskog života, kod ličinki dolazi do metamorfoze. Metamorfozom ličinke dobivaju druge nastavke koji se zovu rudimenti, te poprimaju izgled sličan adultnom ježincu, ali bez razvijenog usnog i analnog otvora (www.nhm.ac.uk). Idućih 7 dana metamorfozirana ličinka je endotrofni organizam tijekom čijeg razvoja se konačno definiraju i postaju funkcionalni svi unutarnji organi, pojavljuju se ambulakralne nožice, a ličinačke strukture se gube (www.nhm.ac.uk). Utroba se pretvara u novu čahuru, a skelet se preobražava u bodlje.

Metamorfozirana ličinka zatim se spušta na supstrat i započinje život na bentosu. Ježince koji moraju proći ličinački stadij hraneći se, naziva se planktropnima, a oni koji nemaju ličinačku fazu već neposredan razvoj su lecitotropni ježinci.

Opisano je oko 700 živućih vrsta morskih ježinaca (www.enchantedlearning.com) i pronađeno preko 5000 fosilnih ostataka. Dvadeset vrsta obitava u Jadranskom moru. Iako akvakultura ježinaca u Hrvatskoj nije razvijena, ježinac koji ima potencijal da postane nova komercijalna vrsta u uzgoju je hridinasti ježinac *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) koji živi uzduž europskih obala od sjevernog Atlantika (Španjolska, Irska, Francuska) i duž cijelog Sredozemlja (Lawrence, 2007). Obitava do 80 m dubine, iako je njegova gustoća najveća u prvih 20 m (Kempf, 1962; Fenaux, 1968). Ova vrsta je jedna od glavnih herbivora u sublitoralnom području u kojem nadzire biomasu algi (Verlaque, 1984). Studije o prstenovima rasta na skeletnim pločicama pokazuju da mogu živjeti i do 9 godina (Crapp i Willis, 1975).

U promjeru najveće jedinke dosežu i do 7.5 cm. Usprkos njegovom popularnom imenu („ljubičasti ježinac“) njegova boja varira od crno-ljubičaste, ljubičaste, crveno-smeđe, tamno ili svijetlo smeđe do zelenkaste. Nastanjuje dva tipa staništa, a to su kamenita dna i livade morskih cvjetnica (*Posidonia oceanica*). Na kamenitim dnima ježinci buše rupe u podlozi koje im služe za bolji upor a stijene ih štite od predadora. Ova populacija prati promjene dana i noći. Tijekom dana ostaju uz korjenje sakrivajući se od predadora, a noću izlaze te se penju na listove hraneći se najmekšim djelovima. U nedostatku optimalne hrane ježinci će se hraniti drugim algama, strvinom, kao i drugim malim beskralješnjacima.

Najčešće se može pronaći u područjima gdje je raspon zimske temperature između 10-15°C i ljetne 18-25°C (Lawrence, 2007). Temperaturne zone od 13-17°C smatraju se njihovim prirodnim optimumom (www.akvarij.net).

P. lividus je odvojena spola, a oplodnja je vanjska. Mrijest se odvija u rano proljeće i početkom jeseni. Sam razvoj gonada počinje rano, već pri veličini 4 – 6 mm, a puna spolna zrelost se postiže pri 2 – 2.5 cm.

Hridinski ježinac kao i mnoge druge vrste koristi svoje podije da bi na svoju dorzalnu stranu stavio različite materijale poput školjki, kamenja ili algi radi maskiranja i zaštite od intenzivnog osvjetljenja.

1.2 Oplodnja i kratki opis razvojnih stadija

Embrionalni razvoj ježinca je oduvijek bio zanimljiv model za proučavanje jer:

- morski ježinci proizvode veliki broj jaja,

- oplodnja i razvoj se događa izvan organizma pa ih je jednostavno proučavati u laboratoriju,
- jaja i embrij su skoro prozirni pa je razvoj jednostavan za promatranje,
- proces oplodnje i razvoja je relativno brz jer se u roku od 48 sati zigota razvija u slobodno plivajuću ličinku.

Razvoj ježinca započinje sa oplodnjom. Kod ježinaca mora biti zadovoljeno nekoliko ključnih koraka da bi oplodnja bila uspješna: jaje i spermiji moraju prepoznati jedno drugo, spermiji se moraju aktivirati tako da prodrú do membrane jajeta, membrana jajeta i spermija se mora spojiti a jaje blokirati ulazak drugih spermija, te se jezgre jajeta i spermija moraju spojiti kako bi stvoriti diploidnu jezgru zigote (www.bcs.whfreeman.com).

Prije nego spermij oplodi jaje, mora prvo penetrirati kroz vanjsku barijeru a to je želetinozna ovojnica. Kada spermij dotakne želetinoznu ovojnicu, započinje proces poznat po nazivu akrosomalna reakcija (Hansbrough i Garbers, 1981; Suzuki i sur., 1981)

U prvom koraku ove reakcije plazmatska membrana u spermiju se spaja sa akrosomalnom membranom, te dolazi do otpuštanja akrosomalnih enzima unutar jaja. To su hidrolitički enzimi koji razgrađivaju želatinoznu ovojnicu jajeta.

U sljedećem koraku u spermiju se počinje pružati tanko produljenje koje se zove akrosomalni nastavak a pruža se sve do vitelinske ovojnica. Akrosomalni nastavak sadržava aktinske filamente radi kojih je omogućeno produljivanje.

Akrosomalni nastavak je prekriven proteinima, koji se zovu povezivajući („binding“) proteini a povezuju se sa receptorima na jajetu. Receptori na jajetu prepoznaju povezivajuće proteine samo svoje vrste. Vezanjem spermija na jaje završava se proces akrosomalne reakcije i dolazi do spajanja membrane spermija sa membranom jajeta.

Nakon fuzije membrane, Na^+ ulazi u stanicu a time se mijenja polaritet na membrani jajeta, pa unutrašnjost jajeta postaje pozitivno nabijena. Pozitivan naboј pomaže u sprečavanju ulaska drugih spermija u jaje (blokada polispermije). Spajanjem membrane potaknuto je oslobođanje val Ca^{2+} iz intracelularnih rezervi u citoplazmu (Steinhardt i sur., 1982; Elsen i sur., 1984; Galione i sur., 1993). Ca^{2+} aktivira jaje, ali također sudjeluje u sporom blokiranju polispermije. Za vrijeme sporog blokiranja,

kortikalne granule se spajaju sa membranom jajeta (Paul i Epel 1971; Jaffe i sur., 1978), a polaritet membrane se vraća u normalu (www.nationmaster.com).

Iz kortikalnih granula ispušteni su enzimi, neki od tih enzima raskidaju molekularnu vezu između vitelinske ovojnica i membrane jajeta, dok drugi otklanjaju povezivajuće proteine s jaja. Kemijski spojevi otpušteni iz kortikalnih granula uzrokuju ulazak vode unutar vitelinske ovojnica osomozom odvajajući vitelinskiju ovojnicu od membrane. Drugi spojevi uzokuju očvršćivanje ovojnica koja se naziva fertilizacijska membrana i dodatno sprječavaju ulazak drugih spermija (Schuel, 1978).

Da bi se jezgra spermija približila jezgri jajeta, jaje stvara fertilizacijski konus. Konus okružuje jezgru spermija i povlači je unutar jajeta gdje dolazi do spajanja i stvaranja diploidne jezgre.

Ježinci su deuterostomični organizmi što znači da je brazdanje radijalno i nedeterminirano (www.facultyfiles.deanza.edu). Prve dvije diobe su meridionalne i sve 4 nastale blastomere su jednake veličine. Treća dioba je ekvatorijalna, odnosno okomita u odnosu na prve dvije čime nastaje osam jednakih blastomera: 4 gornje označavaju animlani pol, a 4 donje blastomere označavaju vegetativni pol. (www.accessexcellence.org). Četvrta dioba se u potpunosti razlikuje od prve tri diobe zbog toga što se blastomere animalnog pola brazdaju drugačije od blastomera vegetativnog pola. Taj 16 - stanični stadij embrija označavaju stanice diferencirane prema veličini u mezomere, makromere i mikromere, a to je bitno za kasnije stvaranje zametnih listića (Summers i sur. 1993).

Dalnjim diobama blastomera nastaje 32 - stanični, a zatim 64 - stanični stadij embrija. 64 - stanični stadiji embrija imaju oblik kugle koju čini veliki broj gusto pakiranih stanica (puna kugla). Taj stadij se zove morula. Kada embrij dostigne 128 stanični stadij (sedma dioba), iz morule nastane blastula koja ima oblik šuplje kugle i sve blastomere su jednake veličine, a šupljina unutar blastule naziva se blastocel. (www.ncbi.nlm.nih.gov). U stadiju blastule većina stanica dobiva trepetljike (cilije) na vanjskim membranama, pa se blastula počinje rotirati unutar fertilizacijske membrane (Masuda i Sato, 1984). Neposredno nakon toga, stanice vegetativnog pola počinju rasti u debljinu formirajući vegetativnu ploču. Stanice animalnog pola luče enzim za razgradnju fertilizacijske ovojnica, tzv. enzim izvaljivanja (Lepage i sur., 1992). Mladi embrio izlazi iz fertilizacijske ovojnica i postaje slobodno – plivajuća blastula koja započinje samostalan život.

Iz blastule procesom gastrulacije nastaje gastrula. Tijekom tog procesa prvo se pojedine stanice vegetativne ploče produljuju i kontrahiraju duge, tanke nastavke (filopodije), odjeljuju se od jednosloja i počinju migrirati u blastocel (Galileo i Morrill, 1985; Karp i Solursh, 1985). Te stanice su porijeklom mikromere i one grade primarni mezoderm (mezenhim) odnosno skelet ličinačkog stadija (www.ncbi.nlm.nih.gov). Nadalje, invaginiran je (uvraćanje) dio stanica (endoderm) u unutrašnjost blastule u području vegetativne ploče. Time nastaje pracićevo (archenteron) koje se na površinu gastrule otvara otvorom koji se naziva blastopor. Iz blastopora kod ježinca nastaje crijevni otvor (anus), a usta se otvaraju naknadno na udaljenom dijelu gastrule.

Na početku gastrulacije, gastrula se sastoji od 2 zmetna listića (diploblastična gastrula), ektoderm je izvana, a endoderm iznutra. Mezoderm čine stanice primarnog skeleta koje se zovu mikromere. Endoderm omeđuje šupljinu pracićeva iz kojeg će se kasnije razviti probavni trakt. Kasnije se između ekto i endoderma stvara treći zmetni listić (mezoderm), a gastrula postaje triploblastična.

Zadnji stadij gastrule se naziva prizma stadij u kojem gastrula ima potpuno formirano crićevo i usta te se može samostalno hraniti. Produljivanjem gastrule razvija se ličinka dipleurula koja je tipična za sve bodljikaše. Ona je bilateralno simetrična i na površini tijela mjestimice ima trepetljike pomoću kojih pliva (www.ncbi.nlm.nih.gov). Iz dipleurule se vremenom razvija slobodno plivajuća ličinka (pluteus). Ličinka raste tijekom 4 – 6 tjedana do nekoliko mjeseci, ovisno o vrsti. Pred kraj ličinačkog razdoblja počinju se razvijati skeletne pločice odraslog ježinca zbog kojih pluteus polako tone prema dnu i dolazi do preobrazbe ličinke u mladog ježinca. Metamorfoza je vrlo složeni proces ali traje vrlo kratko (oko 1 sat) i označava konačan prelazak na bentonski način života i pentaradijalnu simetriju. Mladi ježinac odmah izgleda poput odrasle životinje i nije veći od 1 mm.

1.3 Aerobni metabolizam neoplodenih i oplodenih embrionalnih stadija ježinaca

Kisik je od vitalnog značaja za život ježinaca. Bez kisika nije moguć proces oksidativne fosforilacije ili staničnog disanja koja se odvija na unutarnjim membranama mitohondrija. Respiracija ili disanje je proces u kojem se stvara ATP oksidacijom kemijskih spojeva. Glavna značajka respiratornog procesa je djelovanje transportnog sustava elektrona. Konačni akceptor elektrona je anorganska molekula, najčešće molekularni kisik, pa se taj tip respiracije naziva aerobna respiracija.

Elektroni se kreću od reduciranih koenzima do anorganske molekule tj. kisika pri čemu se osobađa energija koja omogućava sintezu ATP-a.

Neoplodena jaja morskog ježinca su u stanju mirovanja uz minimalnu metaboličku aktivnost. Nakon oplodnje aktivnost se povećava, a osim strukturalnih promjena tu su i fiziološke i biokemijske promjene, promjene tijekova iona, povećanje respiracije i metabolizma ugljikohidrata, sinteze proteina i stanične diobe.

Oplodnja morskog ježinca potiče brojne fiziološke reakcije potrebne za metabolizam stanice. Promjene u unutarstaničnoj aktivnosti iona Ca^{2+} i H^+ imaju složenu ulogu u regulaciji fizioloških procesa nakon oplodnje. Povećanjem unutarstanične aktivnosti Na^+ povećan je fertilizacijski potencijal i poticana Na^+/H^+ protuizmjena na staničnoj membrani.

Nakon oplodnje značajne su promjene u citoplazmatskoj koncentraciji Ca^{2+} . Signalom promjene u koncentraciji Ca^{2+} reguliraju metabolizam proteina i sintezu DNA te aktivaciju zigote. Citoplazmatska alkalinizacija je glavni neposredni uzrok povećane sinteze proteina. Spermij inducira unutarstaničnu aktivaciju Na^+/H^+ protuizmjene pa dolazi do ulaska Na^+ i izlaska H^+ iz oplođenog jaja (Swan i Whitaker, 1985). Arahidonska kiselina aktivira metabolizam morskog ježinca nakon oplodnje. Ona stimulira Na^+/H^+ protuizmjenu, tj. ekskreciju H^+ i time alkalinizaciju unutarstaničnog prostora, te povećanje unutarstaničnog Na^+ .

Kod ranih embrionalnih razvojnih stadija naglo raste zahtjev za ionsku regulaciju i održanje homeostaze osmotski aktivnih tvari. Povećanjem broja stanica povećan je broj kopija enzima Na^+, K^+ ATP-aze za održanje njihove energetike. Aktivnost enzima Na^+, K^+ ATP-aze istraživana je u ranim embrionalnim fazama razvoja morskog ježinca *Strongylocentrotus purpuratus* i *Lytechinus pictus* (Leong i Manahan, 1971; 1999; Marsh i sur. 2000). Zbog općenito važne energetike uloge enzima Na^+, K^+ ATP-aze istaknuta je mogućnost korištenja ovog enzima kao indikatora fiziološkog stanja u ranim embrionalnim stadijima.

Razumijevanje fizioloških mehanizama inteziteta metabolizma tijekom embrionalnog razvoja važno je zbog spoznaja o energetskim potrebama ovih stadija. Potrošnja kisika u embrionalnim razvojnim stadijima nije u korelaciji sa masom ličinki. Stoga u ovoj fazi treba podrobno ispitati između ostalog i metaboličke procese zbog praktičnog značenja u optimizaciji uzgoja svih organizama u marikulturi.

Količina energetskih potreba za embrionalni razvoj je prvi puta opisana početkom prošlog stoljeća (Tangl, 1903). Smatra se da za većinu metazoa sve do stadija vanjske prehrane, 40% energije jajnih stanica potječe iz endogenih pričuva (Weiser, 1994). Većina morskih organizama su sposobni, osim korištenja endogenih pričuva koristiti i otopljenu organsku tvar iz morske vode. Ovaj proces je aktiviran neposredno nakon oplodnje kao što je sugerirao i Epel (1972) i potvrdili Shilling i Manahan (1990).

Kod ličinki morskog ježinca *Lytechinus pictus*, 8 dan nakon oplodnje utvrđeno je da se 66% metaboličke energije odnosi na endogene rezerve (Shilling i Manahan, 1990). Energetski deficit morskih ježinaca *Strongylocentrotus purpuratus* nadoknađuje se apsorpcijom otopljenih organskih tvari iz morske vode. Niže vrijednosti omjera C:N u embriju jajašca sugeriraju da su lipidne rezerve jajašca potrošene tijekom ranog razvoja.

Neposredno nakon oplodnje potvrđeno je višestruko povećanje potrošnje kisika u odnosu na neoplodene jajne stanice (Epel, 1964). Odmah nakon toga povećana je unutarstanična koncentracija Ca^{2+} . Oko 30% respiracije jajašaca morskih ježinaca nije inhibirano cijanidima i ova vrijednost je nakon oplodnje povećana na 50%. Ovaj dio nemitohondrijske aktivacije respiracije predstavlja posljedično Ca^{2+} aktivirane oksigenaze što je potvrđeno aktivacijom oksidacije molekule arahidonične kiseline.

Međutim, potrošnja kisika neoplodenih jajašaca se ne razlikuje od oplodenih jajašaca crva echiuroida *Urechis unicinct*. Životinske stanice eukariota potroše 20-30% metaboličke energije na aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze (Siems i sur., 1992) a u nekim odraslim morskim beskralješnjaka na aktivnost Na^+ crpke otpada 30 do 70% od ukupnog metabolizma tkiva (Lucu i Pavičić, 1995). Povećanje broja stanica i posljedično povećanje njihove površine zahtjeva proizvodnju novih Na^+ / K^+ crpki za unutarstaničnu metaboličku regulaciju.

Leong i Manahan (1997) te Marsh i sur. (1999) su opisali promjene u Na^+ , K^+ ATP-azi tijekom embrionalnog razvoja ježinca *Sterechinus neumayeri*. Ekperimentalno su ustanovili povećanje aktivnosti enzima od nemjerljivih vrijednosti u neoplodenom jajašcu do vrijednosti 40% od ukupne metaboličke aktivnosti, 72 sata nakon oplodnje u stadiju pluteus. Metodom praćenja ugradnje izotopa ^{86}Rb (supstitucija K u transportnom sastavu Na^+ / K^+ ATP-aze) kod ježinca *Sterechinus*

neumayeri potvrđeni su rezultati o velikim energetskim potrebama za povećanu aktivnost Na⁺,K⁺ ATP-aze sve do ličinačkog stadija pluteusa.

U ovome radu u laboratorijskim uvjetima istraživana je potrošnja kisika kod neoplođenih i oplođenih jajašaca hridinskog ježinca *Paracentrotus lividus* sa ciljem optimizacije metode kao i uvođenja jednostavne metode indikatora fiziološkog stanja embrionalnih stadija važnih za komercijalizaciju u gospodarstvu.

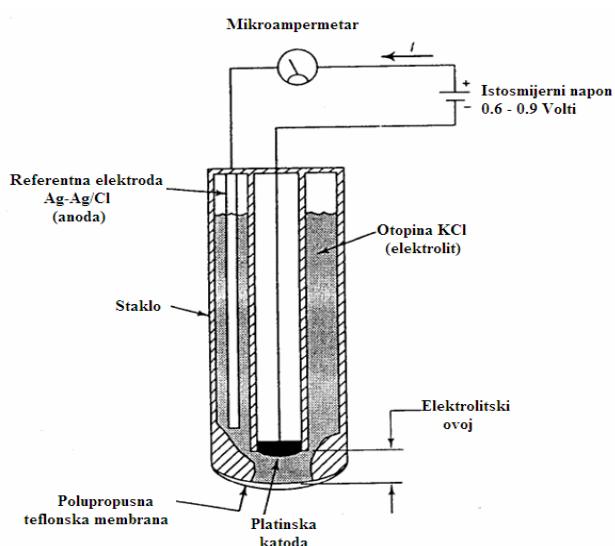
2. MATERIJALI I METODE

2.1 Sakupljane ježinaca *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Ježinci su sakupljeni u razdoblju od 16. ožujka do 21. travnja 2009. godine na području jugozapadnog dijela Gruškog zaljeva u Dubrovniku. U tom vremenskom razdoblju temperatura zraka je kolebala između $19\pm1^{\circ}\text{C}$, a mora $14\pm1^{\circ}\text{C}$. Temperatura zraka i mora je mjerena termometrom svaki put prije izvođenja pokusa. Izvađeni ježinci su bili podvrgnuti metodi ekstakcije gonada injektiranjem 0,9 M otopine KCl-a (50 ml destilirane vode i 3,5 g KCl-a) u područje peristomalne membrane morskog ježinca. Došlo je do ispuštanja jajašaca i spermija. Jajašca ženki su sakupljena u staklenu posudicu s filtrirana morskom vodom, dok je spermijkska tekućina sakupljena „na suho“ (da ne bi došlo do aktivacije spermatozoida) uz pomoć pipete i pohranjena u plastičnu posudicu od 1 ml. Za vrijeme ovog pokusa ukupno su sakupljeni uzorci gonada od 31 ženke i 13 mužjaka hridinskog ježinca.

2.2 Metoda mjerena potrošnje kisika

Kisik je izmjeran polarografskom metodom pomoću Clarkove elektrode (slika 1). To je kemijski senzor predstavljen još 1956. godine kao plod rada znanstvenika Lelanda C. Clarka. Clark je proučavao redukciju kisika na metalnim platinskim elektrodama, a u toku svoga rada je došao na ideju da uz površinu platine postavi enzime koji reagiraju sa kisikom. Pokazalo se točnim da se aktivnost enzima može pratiti promjenom koncentracije kisika oko elektrode (www.fer.hr/BioKemijskiSenzori).

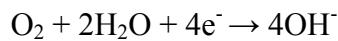


Slika 1. Clarkova elektroda (www.fer.hr/BioKemijskiSenzori)

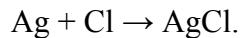
Clarkovom elektrodom je mjeren kisik na katalitičkoj platinskoj površini (Clark i sur., 1953). Ona se sastoji od negativne elektrode - anode (Ag/AgCl) i pozitivne platske elektrode - katode koje su u međusobnom doticaju uz pomoć otopine elektrolita (KCl). Elektroda je pokrivena polupropusnom polipropilenskom (teflonskom) membranom koja je permeabilna za plinove, ali ne i za otopljeni ione u vodi.

Kisik prolazi preko polupropusne membrane i elektrolitne otopine te se reducira u elektrodi. Kemijska redukcija kisika se obavlja na katodi i postiže se električnom strujom koju generiraju elektroničke komponente instrumenata, pa je redukcija kisika proporcionalna koncentraciji otopljenog kisika.

Polaziracijskim naponom na katodi (platska elektroda) vrši se redukcija kisika. Kisik je potrošen na katodi prema reakciji:

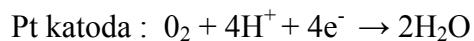
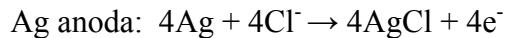


Kao odgovor na proizvodnju OH^- iona, na anodi ioni klorida reagiraju sa Ag da bi se održala ravnoteža naboja elektrolita (KCl):



Prema tome, srebro/srebro-klorid (Ag/AgCl) na anodi daje elektrone za reakciju na katodi. Struja je rezultat redukcije kisika na katodi.

Srebro na anodi je oksidirano reakcijom;



Redukcijom molekule kisika proizvodi se 4 elektrona, a rezultirajući napon je prikazan kao parcijalni tlak kisika ($p\text{O}_2$). $p\text{O}_2$ elektroda proizvodi struju kod konstantnog polarizacijskog napona od 0.6 V direktno proporcionalnu tlaku kisika koji difundira preko reaktivnih površina elektrode. $p\text{O}_2$ je generiran redukcijom kisika koji difundira prema katodi.

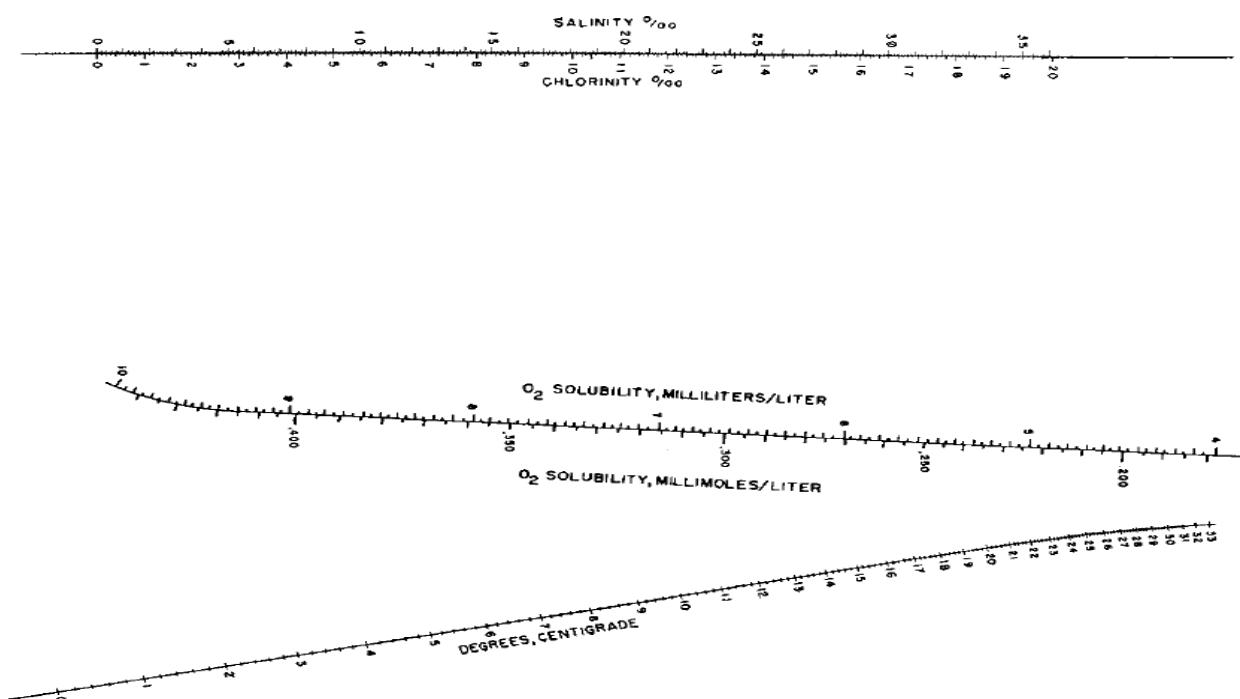
2.3 Priprava elektrode za rad (baždarenje instrumenta)

Uklonjena je brtva i stara polipropilenska membrana, te je provjereno da li je O-ring na elektrodi. Nakon dugotrajne uporabe potrebno je vrh elektrode pažljivo tretirati brus papirom te isprati destiliranom vodom. Nakon toga dodano je nekoliko kapi 6 M HNO_3 (384 μl koncentracije HNO_3 i 616 μl destilirane vode) na predmetno mikroskopsko stakalce i elektroda je uronjena u kiselinu (2 min) sa vrhom prema dolje kako bi uklonili nataloženo srebro s platske elektrode.

Nakon što je polipropilenska membrana namakana u destiliranoj vodi u trajanju od 1 sata, izvađena je i postavljena na vrh elektrodnog omotača, te je montiran O-ring na konusni uređaj za fiksiranje membrane na elektrodu. Rubovi membrane su povučeni da bi ih ispravili, a višak membrane je izrezan.

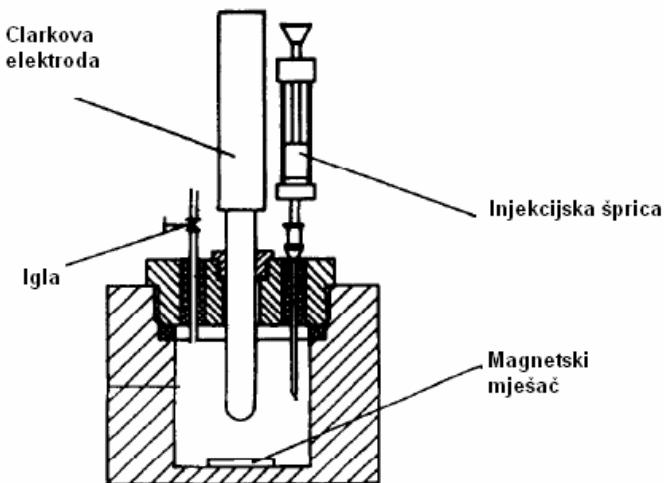
Elektroda je pažljivo unesena u omotač tako da vrh dira membranu. Elektrodnji omotač je napunjeno sa $800 \mu\text{l}$ elektrolitne otopine koja se satoji od $0,1 \text{ M KCl}$ uz dodatak 25 mM HEPES uz podešavanje pH na 7.5 pomoću TRIS/HCl. Elektroda je nakon punjenja stavljena u omotač da dira membranu a poslije njenog učvršćivanja višak otopine je istekao kroz mali otvor.

Nakon što je Clarkovu elektrodu pripremljena, izvršena je kalibracija uređaja. Filtriranoj morskoj vodi izmjerena slanost salinometrom i temperatura prije svake kalibracije. Temperatura morske vode je održavana na istoj temperaturi ($19 \pm 1^\circ\text{C}$). Na temelju slanosti i temperature iz nomograma je pročitana topivost kisika izražena u ml/l (slika 2).



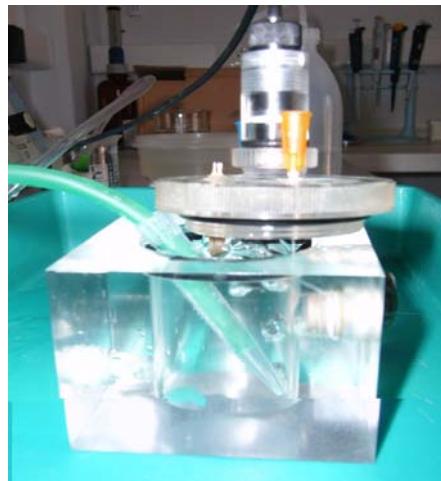
Slika 2. Nomogram koji pokazuje topivost kisika (Gilbert i sur., 1967)

Nakon što je temperatura morske vode izjednačena sa sobnom temperaturom, morska voda je stavljena u respiracijsku komoricu aparata (slika 3).



Slika 3. Respiracijska komorica u kojoj je mjerena koncentracija kisika kod jajašaca ježinca *Paracentrotus lividus* načinjena je od pleksiglasa volumena 43,7 ml (Lucu i Pavičić, 1995)

Kalibracija sustava vrši se istiskivanjem kisika iz morske vode dodavanjem dušika (slika 4) čime je parcijalni tlak sveden na 0. Pad pO₂ je promatran na aparatu (slika 5) Radiometar analizator (Copenhagen) čija je funkcija iniciranje struje koja dolazi na elektrodu. Na njemu je vidljiv modul kojim se regulira pO₂ (slika 6).



Slika 4. Dodavanje plinovitog dušika u otvorenu komoricu sa filtriranim morskom vodom



Slika 5. Radiometar analizator (Copenhagen)



Slika 6. Modul na Radiometru Copenhagen koji je zadužen za regulaciju pO_2

Izračunato je zasićenje kisikom koje je moguće ostvariti pod aktualnim uvjetima. Princip koji je korišten za izračunavanje pO_2 je:

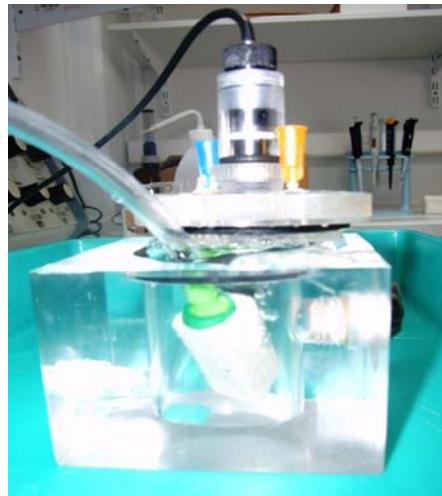
$$pa = (BT \times pO_2) - TVP$$

BT = barometarski tlak zraka (izražen u mmHg)

pO_2 = parcijalni tak kisika (koji iznosi 0.21%)

TVP = tlak vodenih para (koji se očitava iz tablice)

Nakon što je kisik istisnut iz morske vode koja se nalazi u komorici, uklonjen je dotok plinovitog dušika, a stavljen je aerator (slika 7). Aeratorom je postignuto zasićenje morske vode kisikom (pod uvjetima koji su trenutačno prisutni), pa je na Radiometru Copenhagen vidljiv rast pO_2 . Vrijednosti su bilježene svakih 10 minuta u trajanju od 1 sata. Nakon što su se vrijednosti stabilizirale, vrši se podešavanje parcijalnog tlaka kisika na instrumentu prema aktualnom tlaku koji je prethodno izračunat.



Slika 7. Uvođenje areatora u otvorenu komoricu sa filtriranom morskom vodom

Tek nakon što se vrijednost pO_2 stabilizirala, aerator je izvađen, a u komorici je stavljen magnetni mješač, te je komorica zatvorena. Komorica sa Clarkovom elektrodom je stavljena na mješač, a obje dvije strane igli se zatvaraju (slika 8) te se ponovno nadzire pO_2 pomoću Radiometra Copenhagen dok vrijednosti ne postanu stabilne.



Slika 8. Mjerenje vrijednosti pO_2 zatvorene komorice

2.4 Mjerenje potrošnje kisika neoplođenih jajašaca

Kada su vrijednosti parcijalnog tlaka kisika u morskoj vodi postale stabilne, u komorici je stavljena morska voda (slanosti 38 ppt) sa gustom suspenzijom jajašaca (slika 9). Brzina mješanja suspenzije jajašaca sa morskom vodom magnetskim mješačem iznosila je oko 200 okretaja/minuti. U komorici je izmjereno oko 470 jaja/ml to jest oko $2 \cdot 10^5$ jajašaca.

Vrijednosti promjene parcijalnog tlaka kisika koje nam je pokazivao instrument Radiometar Copenhagen su bilježene svakih 5 minuta, u trajanju od 1 sata i 30 minuta. Iz tih vrijednosti kasnije su dobiveni podaci o razlici pO_2 tijekom razdoblja mjerjenja (Δ torr).



Slika 9. Mjerjenje potrošnje kisika neoplođenih jajašaca hridinskog ježinca *P.lividus*

2.5 Mjerjenje potrošnje kisika nakon oplođnje

Prethodno ekstrahirani spermiji iz ježinaca aktivirani su u morskoj vodi. Količina od 1 ml ubrizgana je kroz iglu koja se nalazi na komorici. Vrijednosti koje je pokazivao instrument Radiometar Copenhagen su bilježene svakih 5 minuta, u trajanju od 1 sata i 30 minuta. Iz tih vrijednosti kasnije su dobiveni podaci o razlici pO_2 tijekom razdoblja mjerjenja, to jest Δ torr. Nakon zabilježenih vrijednosti, komorica je dignuta sa mješača i otvorena. Sa pipetom je uzeto dva puta po 100 μ l oplođenih jajašaca hridinskog ježinaca koji su kasnije prebrojani pod mikroskopom. Prosječan broj oplođenih jajašaca iznosio je 470/100 μ l.

2.6 Ubrizgavanje rotenona

U drugom dijelu pokusa, nakon mjerjenja potrošnje kisika oplođenih jajašaca, u komoricu je ubrizgan rotenon ($C_{23} H_{22} O_6$, slika 10). Dodan je rotenon u krajnjoj koncentraciji od 45,7 μ mol/l suspenzije jajašaca. Promatrane su se promjene u parcijalnom tlaku kisika na Radiometru Copenhagen te bilježile svakih 5 min u trajanju od 1 sata.



Slika 10. Rotenon ($C_{23} H_{22} O_6$)

Nakon završenoga eksperimenta sadržaj sa oplođenim jajačima je profiltriran kroz sito (100 mikrona okca) da ostane gušća suspenzija oplođenih jajačaca. Jaja su sakupljena i stavljena u centrifugu na 15 minuta. Sadržaj koji se koncentrirao u centrifugi (500 okretaja/minuti) je stavljena u plastičnu posudicu volumena 1 ml i zaleden. Uzorci su kasnije korišteni za mjerjenje koncentracije proteina.

2.7 Izračun potrošnje kisika

Koeficijent topivosti O_2 u morskoj vodi (α , izražen u ml/l) izračunat je prema:

$$\alpha = \frac{O_2 \times 273.2 (pA - pH_2O)}{159.1 \times 1000 (273.2 + t^\circ C)}$$

gdje je

O_2 = topivost O_2 morskoj vodi (ml/l)

273.2 = apsolutna temperatura

pA = aktualni uvjeti barometarskog tlaka (mmHg)

pH_2O = tlak vodenih para

151.1 = parcijalni tlak O_2 u zraku u uvjetima normalnog atmosferskog tlaka

$t^\circ C$ = aktualna temperatura morske vode

Nakon izračunatog koeficijenta topivosti O_2 u morskoj vodi, izračunata je potrošnja kisika (VO_2 , izražena u $\mu\text{ mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$) :

$$VO_2 = \frac{\alpha \times Vol_{ch} \times 60 \times \Delta\text{torr}}{mg \text{ proteina u jajašcima} \times t \text{ razdoblje mjerena} \Delta\text{torr}} \quad (\text{Lucu i Pavičić, 1995})$$

α = koeficijent topivosti O_2 u morskoj vodi (ml/l) u aktualnim uvjetima barometarskog tlaka

Vol = volumen komorice u kojoj se vršilo mjerenoje potrošnje kisika u jajašcima (43,7 ml)

Δtorr = razlika u parcijalnom tlaku kisika tijekom razdoblja mjerena (5 ili 10 minuta),

1 torr = 133.322368 paskala

Mjerenje je izvršeno tijekom 1 sata.

2.8 Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u homogenatima je procijenjena Bradfordovom metodom (1976). Mjerenje koncentracije proteina je izvršeno radi toga što će potrošnja kisika biti izražena u $\mu\text{ mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Na homogeniziran i centrifugiran uzorak je aplicirano 1 ml razrijeđene otopine Bio-Rad (Commassie Brilliant Blue reagent; 10 ml Bio-Rad koncentrata (bojilo, koncentrat, 450ml, Bio-Rad Laboratories GmBh. Sastav: fosfatna kiselina, metanol. Toxic.Lot.No:1087449 i 40 ml destilirane vode (otopinu pripremiti na dan mjerenja).

Mješavina je promješana 1-2 sekunde i ostavljena 15 minuta da miruje na sobnoj temperaturi. Nakon toga je spektrofotometrijski mjerena apsorbanca proteina na valnoj dužini od 595 nm. Kao standard je korišten BSA serum (Sigma-Aldrich Protein standard, 2 mg. 055K8805. BSA/ml (bovine serum albumine) in 0.9% NaCl, sadrži 0.05%NaN₃. SL05204).

Instrument koji je korišten za mjerenje koncentracije proteina zove se UV/VIS Perkin-Elmer spektrometer. Spektrofotometar mjeri apsorbanciju to jest intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak te ga uspoređuje s intenzitetom upadnog svjetla.

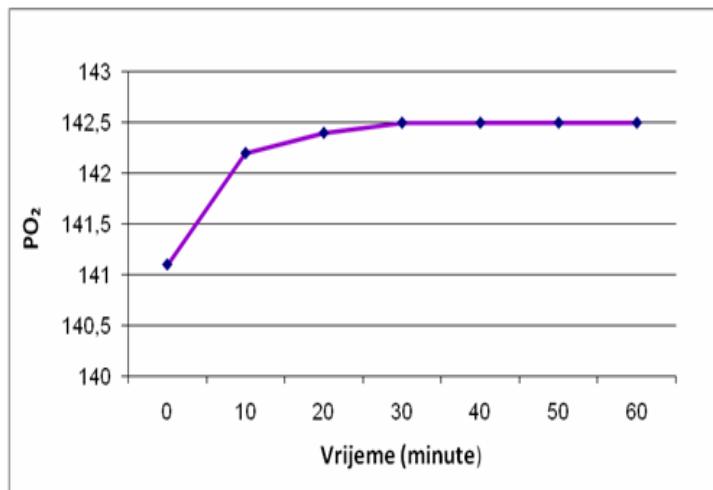
3. REZULTATI

3.1 Prikaz ravnotežnog stanja u komorici prije mjerena potrošnje kisika u jajašcima hridinskog ježinca *Paracentrotus lividus*

U tablici 1. prikazane su vrijednosti parcijalnog tlaka kisika dobivene mjeranjem na Radiometru Copenhagen iz kojih je vidljivo da je u prvih 10 minuta primjećena najveća razlika u porastu parcijalnog tlaka kisika. Već nakon 20-te minute promjene nisu bile toliko značajne te je u 30-oj minuti uspostavljena ravnoteža u potrošnji kisika između elektrode i morske vode sa ili bez suspenzije jajašaca (slika 11).

Tablica 1. Uspostavljanje ravnotežnog stanja parcijalnog tlaka kisika izraženog u mmHg u komorici bez prisutnosti jajašaca

Vrijeme (minute)	Vrijednosti pO ₂ (izražene u mmHg) izmjerene na instrumentu Radiometar Copenhagen
0	141,1
10	142,2
20	142,4
30	142,5
40	142,5
50	142,5
60	142,5



Slika 11. Uspostavljanje ravnotežnog stanja parcijalnog tlaka kisika izraženog u mmHg u komorici bez prisutnosti jajašaca

3.2 Potrošnja kisika neoplodenih i oplođenih jajašaca hridinskog ježinca

Za izračun potrošnje kisika neoplodenih i oplođenih jajašaca, potrebno je izmjeriti koncentraciju proteina (absorbancija). Prvo je mjerena apsorbancija standarda (0, 2.5, 5 i 7.5 μl) na valnoj dužini od 595 nm, a na temelju tri uzorka standarda su izračunate njihove prosječne vrijednosti (tablica 2). Nakon toga je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija 8 uzoraka, te su dobivene njihove prosječne vrijednosti (tablica 3).

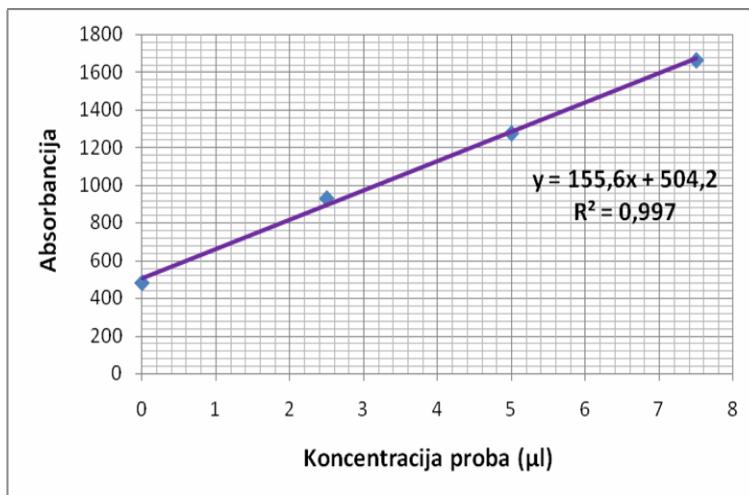
Tablica 2. Apsorbancija standarda proteina dobivenih spektrofotometrijskim mjerjenjem na 595 nm i njihove prosječne vrijednosti

0μl	a) 474 b) 487 c) 484	2,5μl	a) 860 b) 947 c) 984
Srednjak (0μl)	481,6666667	Srednjak (2,5μl)	930,3333
5μl	a) 1337 b) 1218 c) 1273	7,5μl	a) 1647 b) 1692 c) 1654
Srednjak (5μl)	1276	Srednjak (7,5μl)	1664,333

Tablica 3. Absorbancija 8 uzoraka dobivenih spektrofotometrijskim mjerjenjem na 595 nm i njihove prosječne vrijednosti

1	a) 632 b) 583	2	a) 644 b) 631
Srednjak (1)	607,5	Srednjak (2)	637,5
3	a) 927 b) 836	4	a) 770 b) 726
Srednjak (3)	881,5	Srednjak (4)	748
5	a) 812 b) 821	6	a) 693 b) 683
Srednjak (5)	816,5	Srednjak (6)	688
7	a) 789 b) 769	8	a) 584 b) 708
Srednjak (7)	779	Srednjak (8)	646

Na temelju koncentracije standarda proteina i apsorbancije dobiven je regresijski pravac (slika 12). Pomoću regresijskog pravca može izračunati koncentracija proteina (tablica 4) ako se dobivena apsorbancija svakog pojedinog uzorka umetne u regresijsku formulu, pomnoži sa faktorom 0,8, te korigira razrjeđenje.



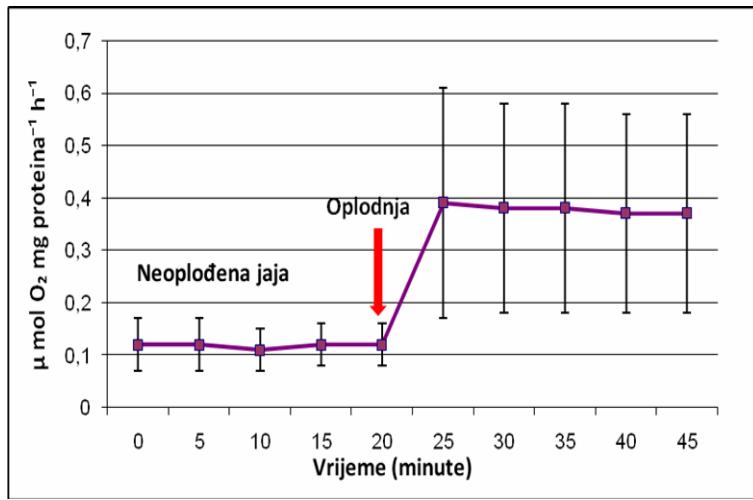
Slika 12. Regresijski pravac dobiven na temelju mjerenja goveđeg seruma albumina (2 µg/ml) na temelju kojeg je izražena koncentracija proteina u uzorcima jajašaca

Tablica 4. Izračun koncentracije proteina na temelju regresijskog pravca $y = 155,6x + 504,2$

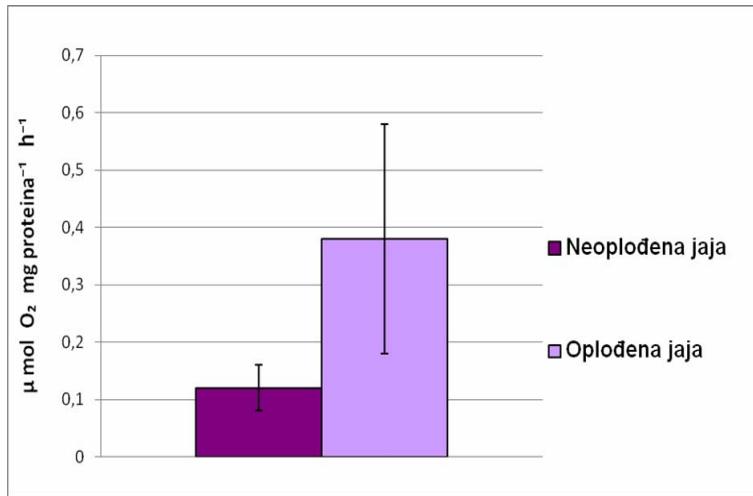
Uzorak	Apsorbancija proteina Aps (y)	Regresijska formula $f(x)=(y-540,2)/155,68$	Množenje s faktorom 0,8 *2µg prot.x 0,4	Koncentracija proteina (mg/ml)	Koncentracija proteina/uzorku nakon korekcije rezrjeđenja
1	608	0,44	0,8	0,35	5,474
2	638	0,63	0,8	0,50	9,384
3	882	2,20	0,8	1,76	24
4	748	1,33	0,8	1,07	9,874
5	817	1,78	0,8	1,42	8,797
6	688	0,95	0,8	0,76	5,431
7	779	1,53	0,8	1,23	7,537
8	646	0,68	0,8	0,54	5,964

Da bi se dobili konačni VO_2 , svaki od pojedinih mg proteina/uzorku množimo sa 22,39 (konverzijski faktor kojim se mijenja izračun $\mu\text{l O}_2$ u $\mu\text{mol O}_2$. Primjer: 5,474 \times 22,39/1000 $\times \text{VO}_2$ (izračunat bez proteina za svako mjerjenje od 5 minuta).

Prosječna vrijednost potrošnje kisika neoplođenih jajašaca iznosila je $0,12 \pm 0,04 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (slika 13) . Već nekoliko sekundi nakon ubrizgavanja spermija u komoricu sa jajašcima, vidljiv je nagli i značajan porast u potrošnji kisika za čak 3,1 puta (slika 14) u usporedbi sa neoplođenim jajašcima i iznosio je $0,38 \pm 0,2 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Razlika u potrošnji kisika je još veća ako se uzmu u obzir rezultati pojedinačnih pokusa, pa je potrošnja kisika povećana za 6 puta što je vidljivo iz podataka standardnih devijacija (slika 14).



Slika 13. Potrošnja kisika neoplodenih ($0,12 \pm 0,04 \mu \text{mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$) i oplodenih jajašaca ($0,38 \pm 0,2 \mu \text{mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$) hridinskog ježinca *Paracentrotus lividus*, podaci pokazuju prosječne vrijednosti \pm standardnu devijaciju, a dobiveni su na temelju obrade 5 pojedinačnih pokusa

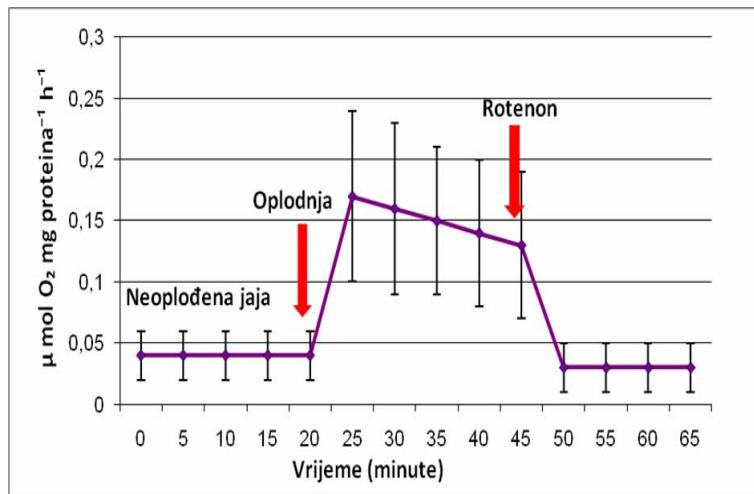


Slika 14. Vrijednosti potrošnje kisika neoplodenih i oplodenih jajašaca hridinskog ježinca *Paracentrotus lividus* koji pokazuju da je povećana potrošnja kisika nakon oplodnje za 3,1 puta, podaci uključuju prosječne vrijednosti \pm standardnu devijaciju, a dobiveni su na temelju obrade 5 pojedinačnih pokusa

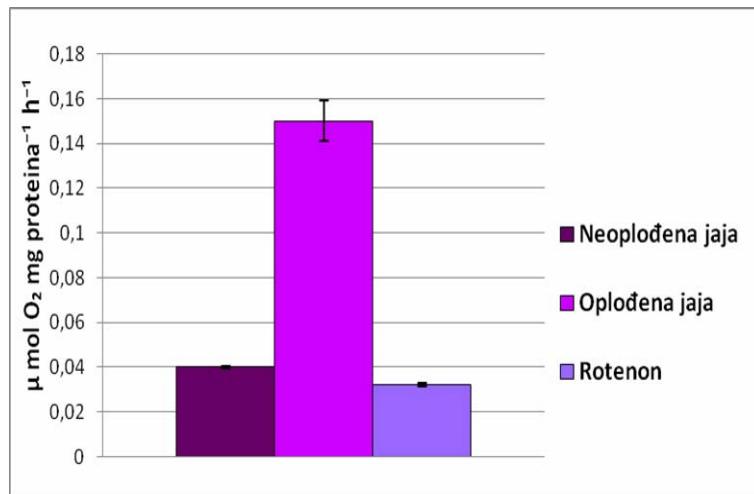
3.3 Utjecaj rotenona na potrošnju kisika

Nakon ubrizgavanja rotenona u komoricu sa oplodenim jajašcima, vidljiv je značajan pad u koncentraciji kisika u prvih pola sata, a nakon toga je došlo do stabilizacije vrijednosti potrošnje kisika (slika 15). Međutim, odmah nakon dodavanja rotenona izmjerene vrijednosti koncentracije kisika su za 2,5 puta manje od kontrolnih uvjeta (gdje nije dodan rotenon). Vrijednosti potrošnje kisika nakon ubrizgavanja rotenona iznose $0,031 \pm 0,008 \mu \text{mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Te vrijednosti nakon postignute ravnoteže su slične onim vrijednostima koji su dobivene kod neoplodenih

jajašaca, a manje su za 4 puta u usporedbi sa onim vrijednostima dobivenih kod oplođenih jajašaca (slika 16). Podaci su dobiveni na temelju obrade 6 uzoraka.



Slika 15. Potrošnja kisika neoplođenih ($0,04 \pm 0,005 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$) i oplođenih jajašaca ($0,15 \pm 0,009 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$), te nakon dodavanja rotenona ($0,032 \pm 0,008 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$) kod morskog ježinca *Paracentrotus lividus*, podaci pokazuju prosječne vrijednosti \pm standardnu devijaciju, a dobiveni su na temelju obrade 6 uzoraka



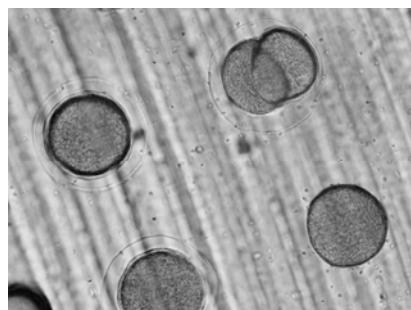
Slika 16. Potrošnja kisika neoplođenih i oplođenih jajašaca, te nakon dodavanja rotenona kod morskog ježinca *Paracentrotus lividus*, dobivene vrijednosti pokazuju smanjenje u potrošnji kisika nakon dodavanja rotenona za 4 puta, podaci uključuju prosječne vrijednosti \pm standardnu devijaciju, a dobiveni su na temelju obrade 5 uzoraka

3.4 Prikaz razvojnih stadija hridinskog ježinca *P. lividus* s osobitim osvrtom na faze u kojima je izvršeno istraživanje



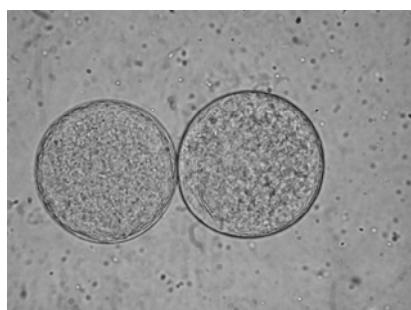
Slika 17. Neoplodena jajašca hridinskog ježinca *P. lividus*

Veličina neoplođenih jajašaca hridinskog ježinca je oko $100 \mu\text{m}$, a snimljeni su mikroskopom sa povećanjem od 40 puta (slika 17).



Slika 18. Oplođena jajašca hridinskog ježinca *P. lividus*

Mikroskopskom snimkom oplođenih jajašaca hridinskog ježinca primijećen je normalan razvoj jajašaca sve do stadija prvog brazdanja (slika 18). Prosječni broj jajašaca izmjerena u $100 \mu\text{l}$ na temelju 14 uzoraka iznosi 470. Malformacije nisu primijećene.



Slika 19. Jajašca hridinskog ježinca *P. lividus* nakon injektiranja rotenona

Kod jajašca hridinskog ježinca nakon ubrizgavanja rotenona vidljiva je fertilizacijska membrana, početak stvaranja perivitelinskog prostora i koncentrirani nukleus u sredini jajne stanice, međutim došlo je do izostanka prvog brazdanja (slika 19). Malformacije nisu primijećene.

4. RASPRAVA

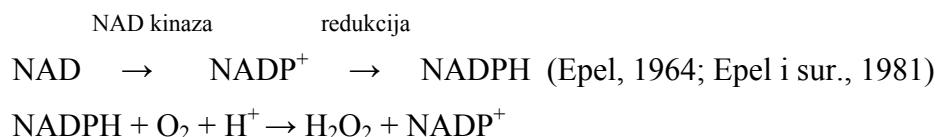
4.1 Povećana potrošnja O₂ kod oplodenih jajašaca i njeni uzroci

Brojne fiziološke promjene se događaju za vrijeme oplodnje koje duboko utječu na regulaciju aktivnosti jajašca, metabolizam ugljikohidrata, sintezu DNA i RNA i proteina. Neobična značajka aktivacije jajašca morskog ježinca je i dramatično povećanje u potrošnji kisika kod ježinaca *Pseudocentrotus depressus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina* i *Strongylocentrotus purpuratus* (Yasumasu i Nakano, 1963; Epel, 1965). To je potvrđeno na hridinskom ježincu ovim radom. Dramatično povećanje u potrošnji kisika je primjećeno odmah u prvoj minuti nakon ubrizgavanja spermija. Ti rezultati se podudaraju sa onima koji su objavili Yanagisawa i sur., (1991) objašnjavajući kako se unutar 10 minuta od vremena oplodnje, razina potrošnje kisika naglo poveća a nakon toga postupno opada i dolazi do stabilizacije vrijednosti potrošnje kisika. Vrijednost koja se stabilizirala je opet veća od one razine kod neoplodenih jajašaca, što je potvrđeno ovim radom.

Postavlja se pitanje zašto oplodena jaja troše više kisika od neoplodenih jaja. Predložen model koji govori o povećanoj potrošnji kisika (slika 20) se vidi u stvaranju vodikovog peroksida (H₂O₂). Postoji nekoliko dokaza koji upućuju da aktivirano jaje proizvodi vodikov peroksid. Kao prvo, H₂O₂ je primjećen i izvan stanice, a u trenutku aktivacije, jaje emitira svjetlo-kemoiluminiscencija (Foerder i sur., 1979). Vrijeme proizvodnje svjetlosti i povećanja potrošnje kisika su slični, što upućuje na to da su ovo dva povezana fenomena. Približno 2/3 vodikovog peroksida utječe na potrošnju kisika u prvih 15 minuta.

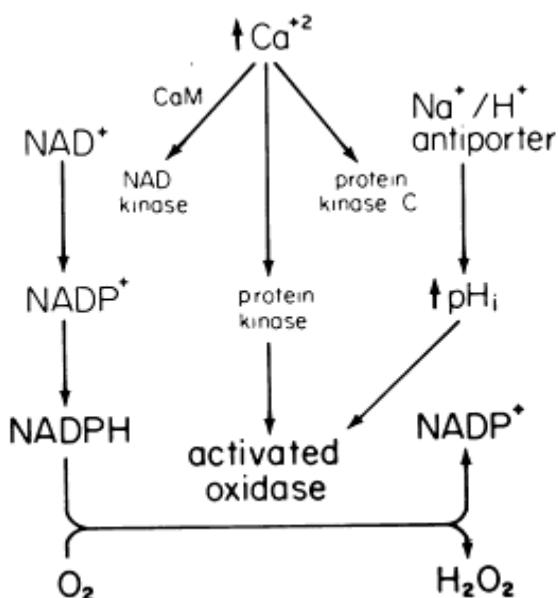
Inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3) utječe na otpuštanje Ca²⁺ iz unutarnjih pričuva. IP3 se veže na receptore, a to su Ca²⁺ kanali regulirani ligandom, te dolazi do otpuštanja Ca²⁺ iz endoplazmatskog retikulumu i aktivacije protein kinaza. Prepostavlja se kako Ca²⁺ pokreće kortikalne granule za stvaranje fertilizacijske membrane, a to je također unutarstanični signal koji aktivira povećanu potrošnju kisika (Heinecke i Shapiro, 1989).

Enzimi oksidaze kataliziraju neposrednu redukciju molekularnog O₂ do H₂O₂, a koriste NADPH kao kofaktor:



Aktivnost oksidaza ovisna je o pH. Za vrijeme oplodnje kod ježinca *Strongylocentrotus purpuratus* pH je povećan od 6,9 na 7,2 (Johnson i Epel, 1981) radi izlaska H⁺ iona, a ulaska Na⁺ iona. Ako se Na⁺ ioni zamijene sa Cl⁻ ionima nema povećanja pH, dolazi do inhibicije potrošnje O₂ i sinteze H₂O₂.

Za aktivaciju oksidaza potrebni su Ca²⁺ i MgATP. NADPH oksidazu i potrošnju kisika aktivira proteinska kinaza (Heincke i Shapira, 1992). Protein kinaza C je enzim stimuliran Ca²⁺ (Nishizuka, 1984 i 1988). Aktivnost protuizmjene Na/H regulirana je protein kinazom C. Ovime se postiže alkalinizacija citoplazme jajašaca.



Slika 20. Predloženi model regulacije povećane potrošnje kisika u trenutku oplodnje (Heinecke i Shapiro, 1989)

O Ca²⁺ je ovisna i pH osjetljiva dualna oksidaza (Uxd1), odgovorna za sintezu H₂O₂ (Wong i sur., 2004). Uxd1 transkript je prisutan u jajetu i jednostaničnoj zigoti (Wong i sur., 2004) pa se smatra da on igra ulogu u ranom razvoju. Taj enzim se nalazi u membrani jajašaca, a uloga mu je u stvaranju vodikovog peroksida (u stanicama neutrofilima) i u njegovoj razgradnji (jer je reaktivna vrsta kisika).

Povećanje u potrošnji kisika nakon oplodnje se događa unutar respiratornog lanca u rasponu od flavoproteina i citokroma c. Aktivnost respiratornog lanca u kojem elektroni prolaze s kompleksa na kompleks je izrazito niska (inhibirana) kod neoplodenih jajašaca (Yasumasu i sur., 1996).

Kod ježinaca je povećana respiracija i u stadiju ličinke te je popraćena vidljivim opadanjem unutarstanične koncentracije ATP-a, ali bez promjena unutarstaničnih razina ADP-a i AMP-a. Smatra se da respiracija u ranim embrionalnim stadijima ovisi o unutarstaničnoj koncentraciji ATP-a (Fujuwara i sur., 2000).

4.2 Važnost energetike potrošnje kisika u ranim embrionalnim stadijima ježinca

Za mnoge vrste morskih beskralježnjaka otkrivena je većina biokemijskih mehanizama koji određuju povećani metabolizam za vrijeme rasta i razvoja (Leong i Manahan, 1997; Pace i Manahan, 2006).

Douglas i Manahan (2007) dokazali su vezu između temperature i metabolizma organizma. Kod embrija i ličinki antarktičkog ježinca *Strechynus neumayeri* ustanovljena je visoka razina sinteze proteina, ali uz održavanje niske razine respiracije. U razvojnim stadijima na sintezu proteina otpada 40 – 54% ukupne metaboličke energije (Pace i Manahan, 2006). Na sintezu proteina otpada 34 – 40% potrošnje kisika što podržava teoriju o visokoj metaboličkoj potrošnji energije (Fraser i sur., 2002).

Kod iste antarktičke vrste Marsh i sur. (1999) su dokazali da je respiracija povezana sa iskorištavanjem energije i hranjenjem. Za vrijeme embriogeneze potrošnja kisika se stabilizirala, ali nakon prvog tjedna hranjenja nahranjene ličinke su pokazivale dvostruko veću potrošnju kisika od one kod ne nahranjenih ličinki iako je mitohondrijska aktivnost održavana na nižoj razini.

Naglašeno je kako 40% metaboličke energije kod ličinki ježinca opada na aktivnost Na^+,K^+ ATP-aze (Marsh i sur., 2000). Taj primarni aktivni transmembranski protein zahtjeva energiju u obliku ATP-a. Aktivnost Na^+,K^+ ATP-aze se povećava kod vrste *Strechynus neumayeri* za 3,9 puta kod nahranjenih ličinki u odnosu na nenahranjene ličinke (Leong i Mahahan, 1999). Ukupna aktivnost Na^+,K^+ ATP-aze se povećava kod embrionalnog razvoja i može činiti i do 77% potrošnje kisika kod ličinki (stadij pluteusa) ježinca *Strongylocentrotus purpuratus* i 80% kod vrste (prizma stadij) *Lytechinus pictus* (Leong i Manahan, 1997).

Precizna mjerena metabolizma jaja i ličinki morskog ježinca su bitna da bi se saznalo o energijskim potrebama njihova razvoja. Kisik je jedan od najvažnijih čimbenika kvalitete vode radi središnje uloge u izvođenju metaboličkih procesa kod morskih ježinaca. Da bi otkrili potrebe uzgajanih organizama, potrebno je poznavati povezanost između otopljenog kisika, rasta i potrošnje kisika pojedinog individua. Potrošnja kisika je povezana sa drugim faktorima kao što su temperatura vode, veličina ili starost organizma, nutricionalne potrebe, razmnožavanje, godišnje doba i drugi.

4.3 Utjecaj rotenona na potrošnju O₂ u embrionalnim stadijima ježinca

Rotenon je kemikalija koja se koristi kao organski insekticid i pesticid. Djeluje kao inhibitor elektronskog transportnog lanca na unutrašnjoj membrani mitohondrija sprječavajući NADH u pretvorbi stanične energije u ATP. On inhibira prijenos elektrona od željezo-sulfata na kompleksu I. (enzim NADH dehidrogenaza ili qinon oksidoreduktaza) na ubiqinon (koenzim Q₁₀). Kompleks prebacuje 4 protona po molekuli oksidiranog NADH, te dolazi do stvaranja elektrokemijskog potencijala korištenog za proizvodnju ATP-a:



Respiracija ježinaca je posredovana mitohondrijskom respiracijom. Oplodnjom stimulirana potrošnja kisika je inhibirana rotenonom što je i dokazano ovim eksperimentom. Već u prvoj minuti nakon injektiranja rotenona vidljivo je naglo smanjenje u potrošnji kisika za 4 puta. Respiracija prije i poslije oplodnje je osjetljiva na rotenon, antimicin i kalij-cijanid (Yasumasu i sur., 1984; 1988) što dokazuje učinak na razini respiratornog lanca. Vrijednosti potrošnje kisika nakon injektiranja rotenona u komoricu slične su vrijednostima neoplođenih jajašaca.

Vidljiva je fertlizacijska membrana te kromatin nukleusa u sredini, međutim, nije primjećen perivitelinski prostor. Došlo je do odgode prvog brazdanja. To je u suglasnosti sa rezultatima koji su objavili Shier i Mebs (1990) koji naglašavaju da rotenon inhibira diobu oplođenih jajašaca morskih ježinaca, ali i uzgajanih stanica sisavaca.

5. ZAKLJUČCI

Nakon ekstrakcije gonada morskog ježinca *Paracentrotus lividus*, izmjerena je potrošnja kisika u jajačima prije i poslije oplodnje. Mjerenje koncentracije kisika se obavljalo pomoću Clarkove elektrode – polarografskom metodom.

Nakon 20-te minute došlo je do stabilizacije potrošnje kisika kod neoplodenih jajašaca, odnosno uspostavljena je ravnoteža. Prosječna vrijednost potrošnje kisika iznosila je $0,12 \pm 0,04 \mu\text{ mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nekoliko sekundi nakon ubrizgavanja spermija u komoricu sa suspenzijom jajašaca višestruko je povećana potrošnja kisika za 3,1 puta te je iznosila $0,38 \pm 0,2 \mu\text{ mol O}_2 \text{ mg proteina}^{-1} \text{ h}^{-1}$. U ovim uvjetima primjećen je normalan razvoj jajašaca do stadija prvog brazdanja.

Nakon injektiranja rotenona koji je inhibitor oksidativne fosforilacije u mitohondriju, znatno je inhibirana potrošnja kisika za 4 puta što upućuje na važnost ovog mehanizma u disanju i razvoju ranih embrionalnih stadija.

Ovim istraživanjima ustanovljene su normalne vrijednosti potrošnje kisika prije i poslije oplodnje kod jajašaca hridinskog ježinca. Rezultati se mogu koristiti kao jedan od indikatora energetike normalne populacije i kod korištenja fiziološkog stanja hridinskog ježinca u konzumne svrhe.

6. LITERATURA

- Black R.M. (1988) The elements of Palaentology. Edition 2, Cambige University Press, 174-175.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-253.
- Chenoweth S. (1994) The Green sea urchin in Maine. Fishery and Biology, Maine Dept. of Marine resources, West Boothbay Harbour, 8-9.
- Clark L.C., Wolf R., Granger D., Taylor Z. (1953) Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physiol.*, 6: 189-193.
- Crapp G.B., Willis M.E. (1975) Age determination in the sea urchin *Paracentrotus lividus* whit notes on the reproductive cycle. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 20: 157-179.
- Douglas A.P., Manahan D.T. (2007) Cost of protein synthesis and energy allocation during development of Antarctic sea urchin embryos and larvae. *Biol. Bull.*, 212: 115-129.
- Elsen A., Kiehart D.P., Weiland S.J., Reynolds G.T. (1984) Temporal sequence and spatial distribution of early events of fertilization in single sea urchin egg. *J. Cell. Biol.*, 99: 1647-1654.
- Epel D. (1964) Simultaneous measurement of TPNH formation and respiration following fertilization of the sea urchin egg. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 17(1): 69-73.
- Epel D. (1965) Control of Energy Metabolism. Academic press, New York 267-272.
- Epel D. (1972) Activation of Na dependent amino acid transport system upon fertilization of sea urchin egg. *Exp. Cell Resw.*, 72: 74-88.
- Epel D., Patton C., Wallace R.W., Cheung W.Y. (1981) Calmodulin activates NAD kinase of sea urchin eggs: an early event of fertilization. *Cell* 23(2): 543-549.
- Fenaux L. (1968) Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *A. lixula*, *P. lividus* et *P. microtuberculatus* (echinides) a Villefranche-Sur. Mer. *Vie Milieu* 19: 1-52.
- Ferguson J.C. (1995) The structure and mode of function of the water vascular system of a brittlestar *Ophioderma appressum*. *Biol. Bull.*, 188: 98-110.
- Flugel E. (2004) Microfacies of carbonate rocks: analysis, interpretation and application. Springer, 556-557.
- Foerder C.A., Klebanoff S.J., Shapiro B.N. (1978) Hydrogen peroxide production, chemiluminescence and the respiratory burst of the fertilization: interrelated events in the early sea urchin development. *Proc. Natl. Acod. Sci., USA*, 75: 3183.

Fujiwara A., Kamata Y., Asami K., Yasumasu I. (2000) Relationship between ATP level and respiratory rate in sea urchin embryos. *Develop. Growth Differ.*, 43: 213-221.

Fraser K. P. P., Clarke A., Peck L.S. (2002) Low-temperature protein metabolism: seasonal changes in protein synthesis and RNA dynamics in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. *J. Exp. Biol.*, 205: 3077–3086.

Galileo D.S., Morrill J.B. (1985) Patterns of cells and extracellular material of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata; Echinoidea) embryo, from hatched blastula to late gastrula. *J. Morphol.*, 185: 387-402.

Galion A., McDougall A., Busa W.B., Willmott N., Gillot I., Whitaker M. (1993) Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. *Science*, Vol 261, Issue 5119: 348-352.

Gilbert W.E., Pawley W.M., Park K. (1967) Carpenter's Oxygen Solubility Table and Nomograph for Seawater as a Function of Temperature and Salinity. *Dept. Ocean Data Rep.*, No.29. 139.

Harrison F.W (1994) Microscopic anatomy of invertebrates. Willey-Liss, New York, CA, USA.

Hansbrough J., Garbers D. (1981) Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 256: 2235-2241.

Heinecke J.W., Shapiro B.M. (1989) Respiratory burst oxidase of fertilization. *J. Biol. Chem.*, 267(12): 7959-7962.

Jaffe L.A., Hagiwara S., Kadi R.T. (1978) The time course of cortical vesicle fusion in sea urchin eggs observed as membrane capacitance changes. *Dev. Biol.*, 67: 243-248.

Johnson C.H., Epel D. (1981) Intracellular pH of sea urchin eggs measured by the dimethyloxazolidinedione (DMO) method. *J. Cell Biol.*, 89: 284-291.

Karp G.C., Solursh M. (1985) Dynamic activity of the filopodia of sea urchin embryonic cells and their role in directed migration of the primary mesenchyme in vitro. *Dev. Biol.*, 112: 276-283.

Kempf M. (1962) Recherches d'ecologie comparee sur *Paracentrotus lividus* et *Arbacia lixula*. *Rec. Trav. St Mar. End.*, 25(39): 47-116.

Lawrence J.M. (2007) Edible sea urchins, Biology and Ecology, Chapter 13: Ecology of *Paracentrotus lividus*. Elsevier Science B.V., 243-244.

Lehmann U., Hillmer G. (1983) Fossil invertebrates. CUP Archive, 265-266.

Leong P.K.K., Manahan D.T. (1997) Metabolic importance of Na^+ , K^+ - ATPase activity during sea urchin development. *J. Exp. Biol.*, 200: 2881-2892.

Leong P.K.K., Manahan D.T. (1999) Na⁺/K⁺-ATPase activity during early development and growth of an Antarctic sea urchin. J. Exp. Biol., 202(Pt 15): 2051-2058.

Lepage T., Sardet C., Gache C. (1992) Spatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. Dev. Biol., 150: 23-32.

Lucu Č., Pavičić D. (1995) Role of seawater concentration and major ions in oxygen consumption rate of isolated gills of the shore crab *Carcinus mediterraneus* Csrn. Comp. Biochem. Physiol., 112A, 565-572.

Marsh A.G., Leong P.K.K., Manahan D.T. (1999) Energy metabolism during embryonic development and larval growth of an Antarctic sea urchin. J. Exp. Biol., 202: 2041-2050.

Marsh A. G., Leong P. K., Manahan, D. T. (2000) Gene expression and enzyme activities of the sodium pump during sea urchin development: Implications for indices of physiological state. Biol. Bull., 199: 100-107.

Masuda M., Sato H. (1984) Asynchronization of cell divisions is concurrently related with ciliogenesis in sea urchin blastulae. Develop. Growth Differ., 26: 281-294.

Nishizuka Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature 19-25; 308 (5961): 693-698.

Nishizuka Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and implications for cellular regulation. Nature 334: 661–665.

Pace D. A., Manahan D.T. (2006) Fixed metabolic costs for highly variable rates of protein synthesis in sea urchin embryos and larvae. J. Exp. Biol., 209: 158–170.

Paul M., Epel D. (1971) Fertilization-associated light-scattering changes in eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Exp. Cell Resw., 65: 281-288.

Saez A.G., Zaldivar-Riveron A. (2009) Evolutionary history of Na⁺, K⁺ ATPases and their role in osmoregulation. Genetica, in press, 136(3):479-490.

Shier T.W., Mebs D. (1990) Handbook of toxinology. CRC Press, 449-450.

Shilling F.M., Manahan D.T. (1994) Energy metabolism and amino acid transport during early development of antarctic and temperate echinoderms. Biol. Bull., 187: 398-407.

Schuel H. (1978) Secretory functions of egg cortical granules in fertilization and development: a critical review. Gamete Res., 1: 299-382.

Siems W., Mueller M., Dumdey R., Holzhutter H.G., Rathmann J., Rapaport S.M. (1982) Quantification of pathways of glucose utilization and balance of energy metabolism of rabbit reticulocytes. Eur. J. Biochem., 124: 567-573.

Smith A.B. (2001) Probing the cassiduloid origins of clypeasteroid echinoids using stratigraphically restricted parsimony analysis. *Paleobiology* 27(1): 392-404.

Steinhardt R., Zucker R., Schatten G. (1982) Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. *Dev. Biol.*, 58: 185-196.

Stenesh J. (1998) Biochemistry, Birkhäuser, 568: 300-301.

Summers R.G., Morrill J.B., Leith A., Marko M., Piston D.W., Stonebraker A.T. (1993) A stereometric analysis of karyogenesis, cytokinesis, and cell arrangements during and following fourth cleavage period in the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Develop. Growth Differ.*, 35: 41-58.

Suzuki N., Nomura K., Ohtake H., Isaka S. (1981) Purification and primary structure of sperm activating peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99: 1238-1244.

Tangl F. (1903) Beiträge zur Energetik der Ontogenese. Zweite Mitteilung. Über den Verbrauch an chemischer Energie während der Entwicklung von Bacterienkulturen. *Pflugers Arch* 98, 475.

Wieser W. (1994) Cost of growth in cells and organisms: General rules and comparative aspects. *Biol. Rev. Camb. Philos Soc.*, 69(1):1-33.

Wong J.L., Créton R., Wessel G.M. (2004) The oxidative burst at fertilization is dependent upon activation of the dual oxidase Udx1. *Develop. Cell.*, 7(6): 801-814.

Yanagisawa T., Yasumasu I., Oguro C., Suzuki N., Motokawa T. (1991) Biology of Echinodermata, Carbohydrate metabolism in sea urchin eggs. Balkema, 29-39.

Yasumasu I., Nakano E. (1963) Respiratory level of sea urchin eggs before and after fertilization. *Biol. Bull.*, 125: 182-187.

Yasumasu I., Hino A., Suzuki A., Mita M. (1984) Change in trygliceride level in sea urchin eggs and embryos during early development. *Dev. Growth. Differ* 26: 525-532.

Yasumasu I., Hino A., Fujiwara A., Tazawa E., Nemoto S., Asami K. (1988) Fertilization-induced change in the respiratory rate in eggs of several marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B: 69-75.

Yasumasu I., Tazawa E., Asami K., Fujiwara A. (1996) Does the low respiratory rate in unfertilized eggs result mainly from depression of the redox reaction catalyzed by flavoproteins? Analysis of the respiratory system by light-induced release of CO-mediated inhibition. *Develop. Growth Differ.*, 38: 359-371.

Yokota Y., Matranga V., Smolencika Z. (2002) The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture. CRC Press, 231: 3-4.

URL:

www.accessexcellence.org

www.akvarij.net

www.bcs.whfreeman.com

www.bbm.me.uk

www.enchantedlearning.com

www.facultyfiles.deanza.edu

www.fer.hr/BioKemijskiSenzori

www.nationmaster.com

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.nhm.ac.uk