

## **ДИНАМІКА ВМІСТУ БІЛКІВ ТА ВИЖИВАНІСТЬ ЕМБРІОНІВ В РАНЬОМУ ОНТОГЕНЕЗІ КОРОПА**

Досліджено динаміку вмісту білка під час ембріонального розвитку коропа. Виявлено, що кількість білка при заплідненні та обводненні ікри значно знижується, що пов'язано із процесами його розщеплення. На наступних стадіях розвитку відбувається ресинтез білків, в результаті чого збільшується їх кількість. На заключних стадіях розвитку ікри вміст білків зменшується. Також встановлено, що кількість білків позитивно корелює з показниками виживаності ембріонів на різних стадіях розвитку.

*Ключові слова:* ембріогенез, ікра, зародок, білки жовтка, динаміка білків, стадії розвитку, метаболізм, виживаність

Одним з найважливіших показників якості зрілих яєць риб є вміст в них білків. Підтвердженням тому слугує виявлений багатьма вченими взаємозв'язок між вмістом білків в зрілій ікрі риб та виживаністю ембріонів та личинок, що розвиваються з неї [3, 6, 7].

Розрізняють три джерела жовткових білків в оогенезі – синтез в самому яйці, синтез в оточуючих яйце клітинах, синтез у віддалених частинах організму та надходження в ооцит через кров [10]. Ендогенний білок вважається продуктом діяльності ендоплазматичного ретикулуму та апарату Гольджі. Із літературних джерел відомо, що білки жовтка також синтезуються в печінці. У переднерестовий період гонадотропіни гіпофізу риб, діючи на стероїдну тканину яєчників, індукує синтез естрогенів, що відповідають на синтез вітелогеніну – попередника жовткових білків ооцита - в печінці [21]. Процес починається з випуском гонадотропінів з гіпофіза [25]. Використання ультраструктурних, радіографічних, імунобіологічних та біохімічних методів дозволило встановити, що в гепатоцитах печінки синтезується «вітелогенін» - попередник жовткових білків, що являє собою складний ліпофосфо-протеїн [21], який потрапляючи в кровоносну систему переноситься з кров'ю до яєчників. Швидке надходження вітелогеніну в ооцити, очевидно, забезпечується специфічними рецепторними місцями на мембрані, оскільки інші білки проникають в ооцит набагато повільніше [35]. Тож найбільшу частину білків жовткових гранул (білкового жовтка) і, відповідно білка великих яєць складають ліповітелін та фосфітин [10]. Проникаючи в ооцити шляхом мікропіноцитозу, вітелогенін розпадається на фосфітин та ліповітелін, що є основними компонентами кристалічного жовтка [16], а також інші дрібні β-компоненти [13; 18; 28; 31]. Синтез цих білків супроводжується приєднанням до них кальцію, фосфату і ліпідів, що надходять в печінку з кров'яного руслу [34]. Фосфітин складає 3% від загальної кількості білка жовтка [21]. Саме завдяки фосфітину, вітелогенін зв'язується іонними зв'язками з кальцієм, забезпечуючи тим самим розвиток скелету ембріону та інші метаболічні процеси [19]. Нещодавні дослідження відкинули ідею єдиного вітелогеніну та встановили, що в оогенезі декілька генів є відповідальними за синтез вітелогеніну [22; 23; 28; 29]. Дослідники вважають, що різні форми білків жовтка можуть відігравати неоднакову роль в процесах ембріонального розвитку риб [23; 28].

Білки входять до складу внутрішнього шару оболонки ооцитів різних видів риб [9], а також до складу кортикальних гранул осетрових та костистих риб, де вони представлені мукопротеїдами [11, 15, 36]. Білки яйцевих оболонок відрізняються одне від одного, залежно від екології нересту виду [7]. У різних видів риб в процесі онтогенезу формується різна кількість білка в жовтку. Так, кількість протеїну в ікрі білуги становить 15,0-18,0%, тоді як у ляща його кількість становить 24,0%, у сазана 24,0-25,0%, у сома 30,0%, а у лосося – 14,1-27,7%

[5]. Значення вмісту білка значно коливаються навіть в межах одного виду, що пов'язано з різним ареалом їх мешкання. Також проявляються відмінності у фракційному складі водорозчинних білків ооцитів, залежно від виду риб [27].

Білки жовтка риб зазвичай знаходяться у вигляді складних сполук з ліпідами чи вуглеводами. Це ліпофосфопротеїди, глікопротеїди, фосфопротеїди тощо.

Згідно з літературними даними розвиток зародків і ранніх личинок коропа супроводжується значним підвищенням активності трипсиноподібних пептид гідролаз [7]. Деякі автори вважають, що наростання протезної активності під час ембріогенезу забезпечує перетворення білків жовтка у видоспецифічні клітинні білки. Відомо, що процес ембріогенезу супроводжується двома протилежно спрямованими процесами – синтезу та катаболізму білків. Дані дослідження вказують на роль протеолітичних ферментів не лише в процесі розпаду білків, але і в їх синтезі, оскільки участь протеолітичних ферментів в процесі розпаду поповнює фонд вільних амінокислот в клітині, які використовуються для синтезу нових специфічних білків зародку [7]. Хоч фізіологічні механізми наразі не до кінця зрозумілі, вважається, що гідратація яйця відбувається завдяки другого протеолізу білків жовтка. Катепсин L є ферментом, відповідальним за врегулювання другого протеолізу, але може відігравати різноманітні ролі, залежно від екології нересту риб [14; 24; 26]. Другий протеоліз поповнює пул вільних амінокислот [30; 13; 19; 29; 32].

Згідно з літературними даними, після запліднення ікринки швидкість синтезу білка не змінюється, однак на етапі дроблення відмічено підвищення інтенсивності синтетичних процесів [8]. За даними деяких авторів, в ембріогенезі в'юна, починаючи з пізньої бластули та початку гастрული, відбувається інтенсивне утворення білоксинтезуючих структур. На прикладі ікри пінагора показано, що від запліднення до формування кровоносної системи жовткового міхура, швидкість білкового росту зародків незначна. Після завершення формування кровоносної системи жовткового міхура, швидкість білкового росту постійно збільшується [8].

Під час ембріогенезу відбувається повна обробка білків жовтка. Ліповітелін розщеплюється на вільні амінокислоти, які слугують субстратом для аеробної енергії та синтезу білка зародку [24]. Очевидно, різноманітність форм ліповітеліну впливає на гетерогенність яєць. Частина ліповітеліну розщеплюється під час ембріонального розвитку, а частина лишається в кишечнику для забезпечення личинок енергією, доки вони не знайдуть сприятливі кормові умови [17]. Фосфітин дефосфорилується під час розвитку ембріону та личинок, а  $\beta$ -компоненти обробляються на більш пізніх етапах розвитку [19, 21].

Загальна картина метаболізму білків в ранньому онтогенезі риб, очевидно, визначається реалізацією генетичної програми їх синтезу та розпаду на послідовних етапах розвитку та впливом на неї зовнішніх умов розвитку статевих клітин, зародків та личинок [12].

Метою нашої роботи було встановити особливості динаміки вмісту білків в процесі ембріонального розвитку ікри коропа, отриманої від самок коропа на базі Білоцерківської гідробіологічної станції Інституту гідробіології НАН України.

### **Матеріал і методи досліджень**

Відбір та первинну обробку матеріалу проведено у 2013 році на базі Білоцерківської гідробіологічної станції Інституту гідробіології НАН України. Зрілі статеві продукти отримували заводським способом після ін'єктування гонадотропним гормоном гіпофізу, в самок коропа середньою масою 4 – 4,2кг. Запліднення здійснювали сухим методом,молоками, отриманими від 3 – 5 самців коропа. Знеклеювання ікри здійснювали цільним молоком, помішуючи гусячим пером протягом 40 – 45 хвилин. Інкубація ікри відбувалась в апаратах Вейса. Для досліджень відбирали незапліднену ікру, а також на стадіях дрібноклітинної морули, жовткової пробки, відділення хвоста, пульсації серця та передличинки, оскільки в ці періоди відбувається зміна метаболізму ембріонів та спостерігається підвищений ризик їх загибелі. На кожній з вказаних стадій вираховували процент виживаності ембріонів.

Дослідження процесів росту та розвитку ембріонів риб зазвичай ведуться традиційними методами: вимірюється довжина, маса зародків, маса жовтка або площі їх проєкцій. Такі вимірювання є приблизними, особливо на перших етапах ембріогенезу. Вивчають процеси росту зародку також з біохімічної точки зору, а саме як динаміку накопичення та використання в його тканинах білків – основних структурних компонентів клітин ембріона.

Біохімічний аналіз відібраних проб здійснювали в лабораторії відтворення риб Інституту гідробіології НАН України. Досліди виконувались у п'яти повторностях. На кожній стадії розвитку ікри визначали вміст загального білка методом Лоурі [20]. Вимірювання проводили на концентраційному фотоелектроколориметрі КФК-2МП за довжини хвилі 750 нм. Статистичну обробку цифрового матеріалу здійснювали за допомогою програми Statistica 10 та Microsoft Office Excel 2003.

### Результати досліджень та їх обговорення

Згідно з літературними даними, ступінь накопичення поживних речовин у жовтку ікри різних видів риб суттєво залежить від особливостей плідників, від яких вона була отримана, зокрема, від віку, виду, вгодованості, нагулу, ареалу мешкання тощо.

Відомо, що основними джерелами енергії під час ембріонального розвитку риб є вуглеводи та частково ліпіди, а білки є основним субстратом для побудови зародку. Проте залежно від виду риб, білки, тією чи іншою мірою, можуть виконувати функції енергетичного субстрату для метаболічних перетворень [8].

Динаміка вмісту білків досліджуваної ікри коропа показана на рис. 1. Набухання запліднених яєць в перші години розвитку у коропа, як і у багатьох інших видів риб, відображає процес інтенсивного надходження води в біолоїди яйцевих оболонок, перивітелінової рідини та власне яйця [12]. Дослідження динаміки вмісту білків на різних стадіях розвитку ікри коропа показали, що після обводнення ікри (що створює оптимальні умови для перебігу метаболічних процесів), вміст білків суттєво знижується, що свідчить про тимчасове розщеплення білків до вільних амінокислот, які мігрують до зародку. Підвищення вмісту білків на стадіях жовткової пробки та відділення хвоста вказує на переважання процесів синтезу білка зародку над процесами дисиміляції білків жовтка. Зростання білкової маси на цих стадіях, ймовірно пов'язано з інтенсивним органогенезом.

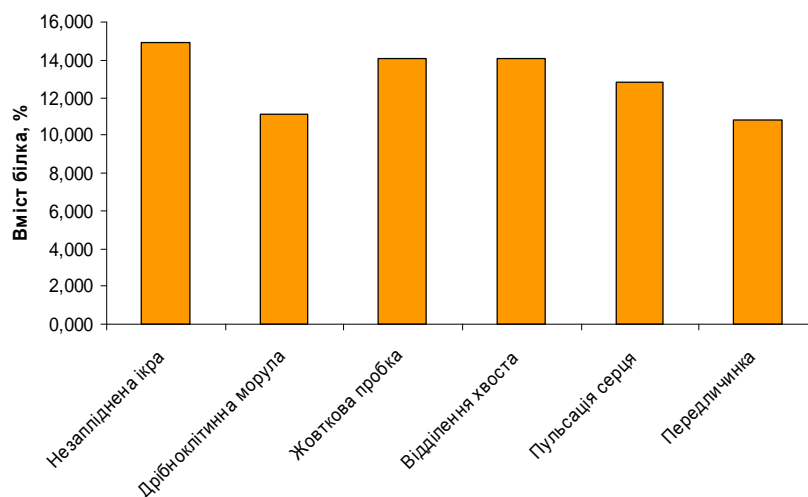


Рис. 1. Динаміка вмісту білка ікри коропа на різних стадіях розвитку

Відомо, що білок є субстратом для побудови тіла зародку. А отже його динаміка в ембріогенезі свідчить про перебіг метаболічних процесів та інтенсивність росту ембріона.

Виявлена тенденція до зниження кількості білка спостерігається на стадії пульсації серця та в тілі передличинки не суперечить літературним даним, де вказується, що на стадіях, що передують вильову личинки, відбувається незначне зниження вмісту білка [8; 12].

З літератури відомо, що динаміка вмісту білка протягом ембріонального розвитку не завжди є типовою та залежить від ступеню обводненості яєць, а також витрат накопиченого запасу загального білка та його поповнення на кожному з етапів [12]. З даних досліджень також видно, що співвідношення процесів синтезу та розпаду білка від стадії до стадії стрибкоподібно змінюється, хоча в середньому за два роки досліджень він підвищується на заключних етапах ембріогенезу. У перший рік досліджень спостерігається нерівномірне зниження вмісту білків протягом ембріонального періоду. Причиною нерівності в темпі розвитку яєць у 1970 році автори вважають нестабільність температурних та інших умов інкубації у зв'язку із затяжною

та дошовою весною. Гіршу якість ембріогенезу в більшості партій ікри коропа в цьому сезоні, що виражалось в різкому зниженні життєздатності личинок в період резорбції жовтка та при переході на зовнішнє живлення, можна пояснити масовою, але зовні не вираженою неповноцінністю зрілих статевих продуктів та несприятливими умовами інкубації [12].

Відомо, що рівні накопичення білків та вільних амінокислот в жовтку риб позитивно корелюють з показниками виживаності ембріонів та личинок [1; 2; 4]. Щодо виживаності ембріонів коропа на різних стадіях їх розвитку, то, як видно з рис. 2, найвища частка виходу була на стадії жовткової пробки. Спостерігається пряма кореляція між виживаністю ембріонів та кількістю білків на відповідних стадіях. Проте, хоч білок є основним структурним компонентом організму, не можна стверджувати, що лише вміст білка впливає на виживаність ікри, бо в процесі інкубації вона піддається впливу багатьох факторів зовнішнього середовища, а також, у випадку заводського відтворення виду, залежить від різноманітних технологічних особливостей господарства.

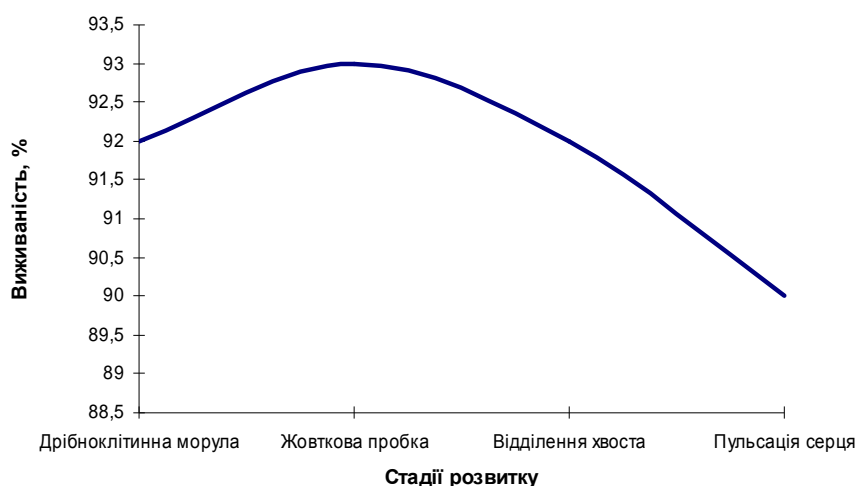


Рис. 2. Вживаність ікри коропа на різних стадіях розвитку, %

## Висновки

Кількість білків при заплідненні та обводненні ікри значно знижується, що пов'язано із його розщепленням. На наступних стадіях розвитку відбувається ресинтез білків, в результаті чого їх вміст збільшується. Через підготовку до вилуплення та руйнування оболонок яйця, вміст білків на заключних стадіях розвитку ікри зменшується.

Вміст білків позитивно корелює з показниками виживаності ембріонів на різних стадіях розвитку, що підтверджують літературні дані. Проте вміст білків далеко не єдиний фактор, що впливає на виживаність ембріонів та личинок в ранньому онтогенезі.

1. *Афонич Р.В.* О влиянии возраста самок осетра на качество их икры и личинок / Р.В. Афонич, О.Л. Гордиенко, М.Н. Кривобок, О.И.Тарковская // Осетровые СССР и их воспроизводство.// Труды. — Т. III, 1971. — С. 14—18.
2. *Владимиров В.И.* Влияние степени нагула самок на качество потомства в ранние периоды жизни у рыб. — Влияние качества производителей на потомство у рыб. — К.: Наукова думка, 1965 — С. 35—93.
3. *Белова Н.В.* Некоторые биохимические показатели молоди белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix*, выращенной из икры разного качества / Н.В. Белова, Ф.У. Кенгерлинский // Биол. Науки ВИНТИ №7740—В86 1986.
4. *Баденко Л.В.* О влиянии физиологического состояния самок белуги на качество икры и жизнестойкость личинок / Л.В. Баденко, Л.Я.Андросюк // Осетровые СССР и их воспроизводство Труды, 1971.— Т. III. — С. 26—33.
5. *Клейменов И.Я.* Пищевая ценность рыбы. — М.: Изд-во «Пищевая промышленность», 1971. — 78 с.
6. *Кондратьева Т.П.* Изменение содержания общего белка и фракционного состава белков сыворотки крови некоторых черноморских рыб в период нереста / Т.П. Кондратьева // [Гидробиол. Журнал](#), 1977 — [Т. 13, № 4](#) — С. 75—80.

7. Коновалов Ю.Д. Белки и их реактивные группы в раннем онтогенезе рыб. — К.: Наукова думка, 1984. — 196 с.
8. Куфтина Н.Д. Влияние температуры на некоторые морфофизиологические параметры икры пинагора (*Cyclopterus lumpus* L.) в период эмбрионального развития / Н.Д. Куфтина, И.И.Зайцева, Г.Г. Новиков // Биологические основы рыбоводства. Актуальные проблемы экологической физиологии и биохимии рыб. — М.: Изд-во «Наука», 1984. — С. 66—84.
9. Микодина Е.М. О некоторых особенностях строения яйцевых оболочек гнездящихся рыб – пинагора (*Cyclopterus lumpus* L.) и трехиглой корюшки (*Gasterosteus aculeatus* L.) / Е.М. Микодина // Науч.докл.высш.шк. Биол. науки, 1978. — № 12 — С. 60—65.
10. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития / Нейфах А.А., Тимофеева М.Я. — М.:Наука, 1977. — 310 с.
11. Сақун О.Ф. Химическая природа и значение включений в ооцитах костистых рыб / О.Ф. Сақун // Арх.анатомии, гистологии и эмбриологии, 1960. —Т. 38, № 1. — С. 38—42.
12. Семенов К.И. Обводнение яиц и содержание общего белка при эмбриогенезу разных потомств карпа и их жизнестойкость / К.И.Семенов, Ю.Д. Коновалов, Э.И. Несен, Л.Ф. Бабицкая, С.Н.Нагирный // Разнокачественность раннего онтогенеза у рыб. — К.: «Наукова думка», 1974. — С. 139—169.
13. Byrne B. M. The evolution of egg yolk proteins / B.M. Byrne, M. Gruber, G. Ab // Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1989. — Vol. 53.—P. 33—69.
14. Carnevali O. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases / O. Carnevali, R. Carletta, A. Cambi, A. Vita, N. Bromage // Biology of Reproduction, 1999. — Vol. 60. —P. 140—146.
15. Chopra H.C. A morphological and histological study of the oocytes of the fish, *Ophiocephalus*, with particular reference to lipids / H.C. Chopra // Quart. J. Microsc. Sci., 1958.— Vol. 29, № 2. — P. 149—157.
16. Dehn P.F. Sequestered and injected vitellogenin. Alternative routes of protein processing in *Xenopus* oocytes / P.F. Dehn, R.A. Wallace // J Cell Biol. 1.09. 1973. —Vol. 58 (3) P. 721-724.
17. Hartling R.C. Developmental fate of the yolk protein lipovitellin in embryos and larvae of winter flounder, *Pleuronectes americanus* / R.C. Hartling, J.G. Kunkel // Journal of Experimental Zoology — 1999. — Vol. 284. — P. 686—695.
18. Hiramatsu N. Vitellogenin-derived yolk proteins of white perch, *Morone americana*: Purification, characterization, and vitellogenin-receptor binding / N. Hiramatsu, A. Hara, K. Hiramatsu, H. Fukada, G.M. Weber, N.D. Denslow, C.V. Sullivan // Biology of Reproduction — 2002a. —Vol. 67. — P. 655—667.
19. Hiramatsu N. Vitellogenesis in aquatic animals / N. Hiramatsu, T. Matsubara, G.M. Weber, C.V. Sullivan, A. Hara // Fisheries Science — 2002c. — Vol. 68. — P. 694—699.
20. Lowry O.H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O.H.Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. 1951. —Vol. 193, № 1. — P. 265—275.
21. Lucey S.M. Characteristics of fish yolk proteins and a method for inducing vitellogenin - *Masters Theses*, 2009. — P. 334.
22. Matsubara T. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. / T. Matsubara, N. Ohkubo, T. Andoh, C.V. Sullivan, A. Hara // Developmental Biology, 1999. —Vol. 213. — P. 18—32.
23. Matsubara T. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts / T. Matsubara, M. Nagae, N. Ohkubo, T. Andoh, S. Sawaguchi, N. Hiramatsu, C.V. Sullivan, A. Hara // Fish Physiology and Biochemistry, 2003. — Vol. 28. — P. 295—299.
24. Matsubara T. Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs / T. Matsubara, Y. Koya // Journal of Experimental Zoology, 1997. —Vol. 278. — P. 189—200.
25. Pankhurst N. Gonadal steroids: function and patterns of change. 67-111 in Rocha M.J., Arukwe A. and Kapoor B.G. editors. Fish Reproduction. Science Publishers, Enfield, NH, State. 2008.
26. Patino R. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish / R. Patino, C.V. Sullivan // Fish Physiology and Biochemistry, 2002. — Vol. 26. — P. 57—70.
27. Popov D. Comparative asupra proteinelor si unor enzime din oocitele la unele specii de pesti teleostei / D. Popov, O. Gozia, M. Coloianu-Jordachel, M. Serban // Stud. si cerc. Biochim., 1977. —Vol. 20, № 1. — P. 71—75.
28. Reith M. Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) / M. Reith, J. Munholland, J. Kelly, R.N. Finn, H.J. Fyhn // Journal of Experimental Zoology, 2001. — Vol. 291. — P. 58—67.

29. *Sawaguchi S.* Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs / S. Sawaguchi, H. Kagawa, N. Ohkubo, N. Hiramatsu, C.V. Sullivan, T. Matsubara // *Molecular Reproduction and Development*, 2006. — Vol. 73. — P. 719—736.
30. *Selman K.* Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly or meiosis during maturation of sea bass oocytes / K. Selman, R.A. Wallace, J. Cerda // *Journal of Experimental Zoology*, 2001. — Vol. 290. — P. 265—278.
31. *Specker J.L.* Vitellogenesis in fishes: status and perspectives / J.L. Specker, C.V. Sullivan // *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council of Canada, Ottawa, State. 1995. — P. 304—315.
32. *Thorsen A.* Final oocyte maturation in vivo and in vitro in marine fishes with pelagic eggs; Yolk protein hydrolysis and free amino acid content / A. Thorsen, H.J. Fyhn // *Journal of Fish Biology*, 1996. — Vol. 48. — P. 1195—1209.
33. *Wahli W.* Vitellogenesis and the vitellogenin gene family / W. Wahli, I.B. Dawid, G.U. Ryffel, R. Weber // *Science*, 1981. — Vol. 212. — P. 298—304.
34. *Wallace R.A.* The induced synthesis and transport of yolk proteins and their accumulation by the oocyte in *Xenopus laevis* / R.A. Wallace, J.N. Dumont // *J. Cell. Physiol.* 1968. — 72 (2). — Vol. 1. — P. 73—89.
35. *Wallace R.A.* Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. V. Specificity for vitellogenin incorporation / R.A. Wallace, D.W. Jared // *J. Cell. Biol.* 1976. — Vol. 69 (2). — P. 345—351.
36. *Yamamoto K.* Studies on the formation of fish eggs. IV The chemical nature and the oocytes of the flounder, *Lepiopsetta obscura* / Yamamoto K. — *Jap. J. Zool.*, 1956. — Vol. 11, № 5. — P. 567—577.

*А.Г. Шерело, М.Ю. Евтушенко*

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

#### ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ КАРПА

Исследовали динамику содержания белка во время эмбрионального развития карпа. Установлено, что количество белка после оплодотворения и обводнения икры существенно снижается, что связано с процессами его расщепления. На последующих стадиях происходит ресинтез белка, в результате чего его количество повышается. На заключительных стадиях развития количество белка уменьшается. Также отмечено, что количество белка позитивно коррелирует с показателями выживаемости эмбрионов на различных стадиях развития.

*Ключевые слова:* эмбриогенез, икра, зародыш, белки желтка, динамика белков, стадии развития, выживаемость

*A. Sherelo, M. Yevtushenko*

National university of life and environmental sciences of Ukraine, Kiev

#### DYNAMICS OF PROTEINS AND SURVIVAL OF EMBRYOS IN THE EARLY ONTOGENY OF CARP

Investigated the dynamics of the protein content during embryonic development of carp. Found that the amount of protein after fertilization caviar significantly reduced, due to the processes of its cleavage. At subsequent stages occurs resynthesis protein, whereby the amount thereof is increased. In the final stages of development of protein decreases. Also noted that the amount of protein positively correlated with survival rates of embryos at different stages of development.

*Keywords:* embryogenesis, caviar, embryo, yolk proteins, protein dynamics, development stages, survival

Рекомендує до друку

В.В. Грубінко

Надійшла 13.02.2014