

А. И. ЗОТИН

## ФЕРМЕНТ ВЫЛУПЛЕНИЯ У ЗАРОДЫШЕЙ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

(Представлено академиком Е. Н. Павловским 7 VII 1953)

Известно, что выход зародышей костистых рыб из яйцевых оболочек осуществляется с помощью особого фермента, растворяющего яйцевые оболочки (1-3). Появление фермента в перивителлиновой жидкости связывают с деятельностью одноклеточных желез вылупления, расположенных в определенных участках покровов зародыша (4). О ферменте вылупления у зародышей осетровых рыб в литературе данных нет.

В предыдущей работе (5) было показано, что незадолго до вылупления зародышей происходит быстрое снижение прочности яйцевых оболочек, благодаря чему зародыши могут их разорвать. По аналогии с костистыми рыбами можно было думать, что снижение прочности оболочек перед вылуплением происходит под действием фермента.

Работа проводилась в низовьях Дона на Рогожкинском рыбозаводном пункте Аздоррыбвода в 1951 и 1952 гг. Исследовались зародыши севрюги (*Acipenser stellatus* Pallas), черноморско-азовского осетра (*Acipenser güldenstädti cholchicus* V. Marti) и белуги (*Huso huso* L.). Икру от гипофизированных самок осеменяли сухим способом и инкубировали в реке в аппаратах Сес-Грина.

Фермент вылупления, растворяя оболочки, вызывает снижение их прочности. Поэтому, измеряя уменьшение прочности оболочек, обработанных раствором, в котором предполагается наличие фермента, можно количественно определять активность последнего. Для измерения прочности оболочек применялся прибор, описанный раньше (5). Этим путем удалось установить, что на стадии вылупления в перивителлиновой жидкости яиц осетровых рыб имеется вещество, способное растворять яйцевые оболочки. Это вещество обладает ферментативной природой, так как оно инактивируется действием высокой температуры (рис. 2). Фермент растворим в воде и в растворенном виде сохраняет активность при температуре 20—22°, даже через 20 дней после его получения. Фермент с одинаковым успехом действует на яйцевые оболочки зародышей, начиная со стадии дробления и кончая стадией вылупления, а также одинаково легко растворяет как внешнюю, так и внутреннюю желточные оболочки. Фермент вылупления осетровых рыб не обладает видовой специфичностью: фермент зародышей белуги одинаково энергично растворяет оболочки яиц как

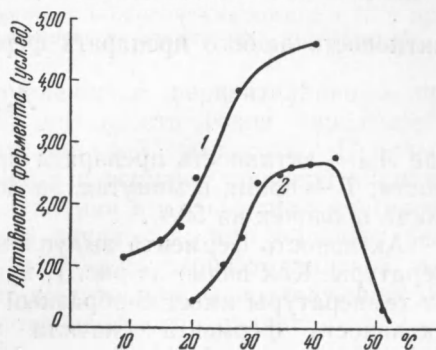


Рис. 1. Зависимость активности фермента вылупления осетра (1) и севрюги (2) от температуры

белуги, так и осетра, фермент вылупления осетра одинаково успешно растворяет оболочки яиц осетра и севрюги.

Исследование, проведенное совместно с Т. А. Детлаф, активности разных частей тела зародыша показало нам, что только нижняя часть головы зародыша на стадии вылупления обладает ферментативной активностью.

Следовательно, железистые клетки, выделяющие фермент, у зародышей осетровых рыб располагаются в области нижней части головы.

Эти данные позволили перейти к изучению кинетики накопления фермента в железе вылупления, времени выделения фермента в перивителлиновое пространство и кинетики накопления фермента в перивителлиновой жидкости, т. е. вопросов, непосредственно связанных с механизмом выхода зародышей из оболочек. Для выяснения этих вопросов нужно было ввести количественную меру активности фермента. В данной работе за единицу активности фермента вылупления принимается активность такого препарата, который при 20° за 600 мин. снижает прочность оболочек на 50%. В этих единицах

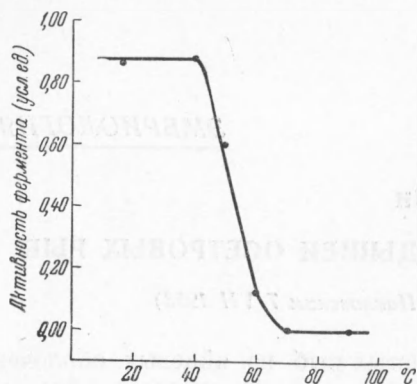


Рис. 2. Действие температуры на фермент вылупления зародышей севрюги (после 5 мин. действия температуры измерялась активность фермента при 20°)

активность любого препарата фермента при 20° равна:

$$A_{20} = \frac{600}{T}, \quad (1)$$

где  $A_{20}$  — активность препарата при 20°, выраженная в единицах активности;  $T$  — время в минутах, за которое данный препарат снижает прочность оболочек на 50%.

Активность фермента вылупления в большой степени зависит от температуры. Как видно из рис. 1, кривая зависимости активности фермента от температуры имеет S-образный характер: с повышением температуры активность фермента сначала увеличивается медленно, затем очень быстро и далее снова медленно. С повышением температуры выше 43—45° наблюдается резкое падение активности фермента (рис. 2), что связано с инактивирующим действием высокой температуры на фермент. Как видно из рис. 1, в интервале 16—27° для осетра и 23—30° для севрюги можно принять, что имеется линейная зависимость активности фермента от температуры. Это позволяет ввести в формулу (1) поправку на температуру:

$$A_t = A_{20} + (t - 20) \operatorname{tg} \alpha, \quad (2)$$

где  $\alpha$  — угол между спрямленной частью кривой зависимости активности от температуры и осью абсцисс (рис. 1). Вычисленный из кривых (рис. 1)  $\operatorname{tg} \alpha = 0,21$ . Отсюда активность любого препарата в указанных выше температурных интервалах равна:

$$A_{20} = \frac{600}{T} - 0,21 (t - 20). \quad (3)$$

Данные, приводимые на рис. 1, получены в полевых условиях, поэтому возможно, что значение  $\operatorname{tg} \alpha$  определено недостаточно точно.

Накопление фермента в железе вылупления и в перивителлиновой жидкости изучалось следующим образом. У зародышей осетра, начиная со стадии закладки сердца до стадии вылупления, определялась ферментативная активность головы. Для этого головы 30 зародышей растирались

в ступке и помещались в 10 мл воды. На тех же стадиях у тех же зародышей изучалась активность перивителлиновой жидкости; в этом случае в 10 мл воды у 30 зародышей снимались оболочки, зародыши удалялись и, следовательно, в жидкости оставались только оболочки и содержимое перивителлинового пространства.

На рис. 3 показаны кривые накопления фермента в железе вылупления и в перивителлиновой жидкости. Для сопоставления приводится кривая изменения прочности яйцевых оболочек зародышей той же партии икры,

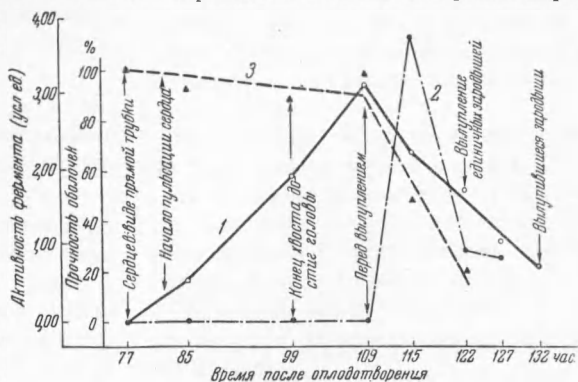


Рис. 3. Накопление фермента в железе вылупления (1), в перивителлиновом пространстве (2) зародыша осетра и изменение прочности оболочек яиц той же партии (3) (прочность оболочек выражена в % к прочности оболочек на стадии закладки сердца)

Прочность оболочек на этих стадиях снижается незначительно. Незадолго до начала вылупления происходит выделение фермента из железы вылупления в перивителлиновое пространство: снижается ферментативная активность голов зародышей и резко возрастает активность перивителлиновой жидкости. Прочность яйцевых оболочек с появлением фермента в перивителлиновой жидкости резко падает. Активность железы вылупления в дальнейшем постепенно снижается, хотя даже у вылупившихся личинок железа обладает некоторой ферментативной активностью. Активность перивителлиновой жидкости после резкого подъема в начале вылупления на последующих стадиях у зародышей, вылупляющихся позднее, быстро падает.

Последнее позволяет наметить пути для изучения причин растянутости периода вылупления, часто наблюдаемой в производственных условиях. Повидимому, для нормального течения процесса растворения оболочек необходимо быстрое и полное выделение фермента из железы в перивителлиновое пространство. Можно думать, что если по каким-либо причинам зародыш неспособен к быстрому выбрасыванию фермента и выделяет его постепенно, то фермент вымывается из перивителлиновой жидкости, ослабляя яйцевые оболочки, но не растворяя их настолько, чтобы зародыш был в состоянии быстро освободиться из них; в этих случаях вылупление будет происходить несколько позднее. Таким образом, можно предполагать, что растянутость периода вылупления у зародышей нормального строения связана с условиями деятельности желез вылупления.

Институт морфологии животных  
им. А. Н. Северцова  
Академии наук СССР

Поступило  
7 IV 1953

#### ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> P. Wintrebert, C. R., 72, 7240 (1912). <sup>2</sup> Г. И. Привольнев, Зоол. журн., 22, № 3 (1943). <sup>3</sup> F. Hayes, J. Exp. Zool., 89, № 3 (1942). <sup>4</sup> С. Г. Крыжановский, Тр. Ин-та морфол. жив. АН СССР, в. 1 (1949). <sup>5</sup> А. И. Зотин, ДАН, 92, № 2 (1953).