

Skořápka vajec

Eggshell

Ivan Mikšík

Souhrn

Přehledný článek podává stručně základní informace o složení skořápky vajec, jejím vývoji a funkci. Pozornost je věnována obzvláště kutikule a její antimikrobiální funkci, proteinovému složení a pigmentům, včetně současných trendů v jejím výzkumu.

Summary

This review article gives an overview about basic information regarding composition of eggshell, its development and functions. Special attention is given to cuticle and its antimicrobial function, protein composition and pigments, including the current trends in research.

Úvod

Všichni víme nebo si alespoň myslíme, že víme, co je to ptačí vejce. Prostě zárodek ptáka, který se vyvíjí chráněn před okolím tvrdou skořápkou. A pták, většinou samice, místo aby tento zárodek nosil po vzoru savců v břiše, tak na něm sedí, až ho vysedí. To by byla si ta správná dětská definice. Podívejme se ale na celý problém detailněji. Ale i zúženěji. Prostě na vejce pouze z pohledu skořápky. Nejdříve je ale důležité si uvědomit, jak se vejce v těle ptáka vyvíjí. Nejlépe je vše popsáno samozřejmě u slepice (samice kura domácího - *Gallus gallus f. domestica*) (např. Nys et al. 2011).

Vývoj vejce

Celý proces vývoje vejce začíná ve vaječnίκu, jehož hlavní funkcí je produkce samičích pohlavních buněk (ovogeneze) a produkce hormonů (estrogenů, androgenů a progesteronu).

Ovogenezi (proces tvorby samičích pohlavních buněk) lze rozdělit na období rozmnožování, zrání a růstu. Ve vaječnίκu je zhruba 3000 vaječných buněk, oocytů. Produkované steroidní hormony mají důležitou roli pro zdárný vývoj vejce:

estrogeny způsobují zvětšování vejcovodu slepice, změny v chemickém složení krve a zvětšení objemu krve a plasmy (ale i například ovlivňují sekundární pohlavní znaky a chování slepice). Androgen společně s estrogeny stimuluje vývoj vaječnicku, ovlivňuje retenci vápníku a podporuje růst kostí. Progesteron se spolu s estrogeny podílí na regulaci ovulačního cyklu a uvolňování gonadotropinů z hypofýzy.

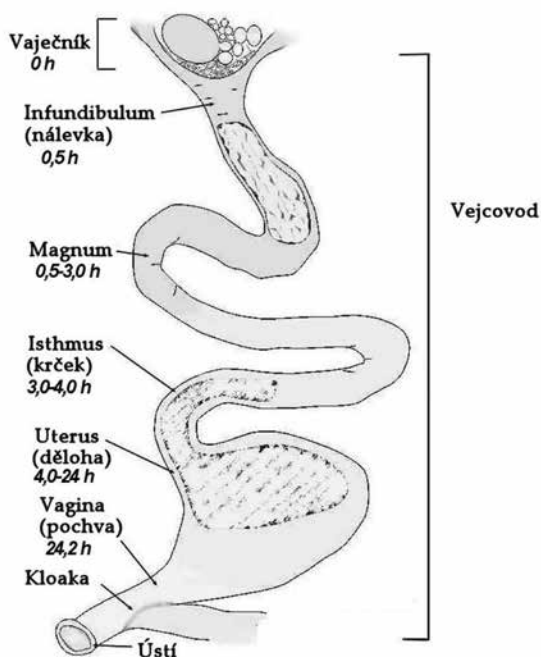
Vlastní vajíčko (ovum) se skládá ze žloutku, vitelinní membrány a zárodečného terčíku. Postembryonální vývoj vajíčka probíhá ve 3 stádiích: 1) Několik měsíců trvající stadium pomalého ukládání „počátečního“ žloutku (hlavně tuků); 2) Intermediální stadium, trvající asi 60 dní - při kterém dochází k tvorbě pravého žloutku, tvořeného převážně bílkoviny; 3) Stadium rychlého růstu (9–14 dní) zakončené ovulací. Vajíčko je uvolněno z folikulu prasknutím folikulární stigmaty a vypadáva do vejcovodu. Průměr žloutkové koule je asi 4 cm a váží cca 30–33 % celkového vejce. Je dobré zmínit, že se velmi často „lidský spotřebitel“ domnívá, že intenzita žluté barvy žloutku vajec slepic odráží jejich kvalitu. Tento názor je mylný – není žádný vztah mezi intenzitou žluté barvy žloutku a čerstvostí, nutriční hodnotou nebo chutí. Žluto-oranžová barva dokonce není syntetizována slepicí, ale dodána potravou (přínejmenším ve formě prekurzorů). Jedná se o oranžové a červené karotenoidy (např. lutein, canthaxanthin, zexanthin), které v chovech bývají často drůbeži přidávány do stravy.

K ovulaci dochází zpravidla až po snesení předchozího vejce. Doba mezi ovulací a snáškou vejce je v průměru 25 ± 1 hodina.

Vejcovod se skládá z 5 hlavních částí: nálevky (infundibulum), bílkotvorné části (magnum), krčku (isthmus), dělohy (uterus) a pochvy (vagina), zakončené kloakou (obr. 1).

Nálevka (infundibulum) slouží k zachycení žloutkové koule a k jejímu zavedení do vejcovodu. Právě zde dochází k oplození vajíčka (cca 5–10 minut po ovulaci). Na konci nálevky se začíná tvořit bílek - ukládá se přímo na žloutkovou blánu ve formě vláken tvořící základ chalázové vrstvy. Chalázy (poutka) se tvoří rotací žloutku při průchodu vejcovodem splétáním mucinózních vláken (tento proces pokračuje i v krčku a děloze). Další vrstvy bílku jsou přidány ve druhé části vejcovodu - magnum. V krčku (isthmus) jsou tvořeny vaječné blány (vnitřní bílková a vnější podskořápečná). Tyto blány jsou většinou těsně spojeny. Vnitřní je silná 22 μ m, vnější cca 48 μ m. Membrány jsou tvořeny těsně spletenou sítí proteinových vláken. Na tupém konci jsou blány rozděleny a vytváří vzdušný vak. Ukládání vápníku a tvorba skořáčky začíná v krátké tubulární sekci dělohy (uterus) známé jako skořápečná žláza (vápená žláza), kdy probíhá na bradavicím podobném zakončení vláken vnější podskořápečné blány. Krystaly uhličitanu vápenatého se ukládají právě na matici z proteinových vláken vnější podskořápečné blány. Tato matrice je velice důležitá - například pokud by byl použit ping-pongový míček místo vejce (blány), tak na jeho povrch se krystaly neuloží.

Vejce zůstává v děloze celkem 20 hodin, během kterých se tvoří skořápka včetně vnější vrstvy – kutikuly.

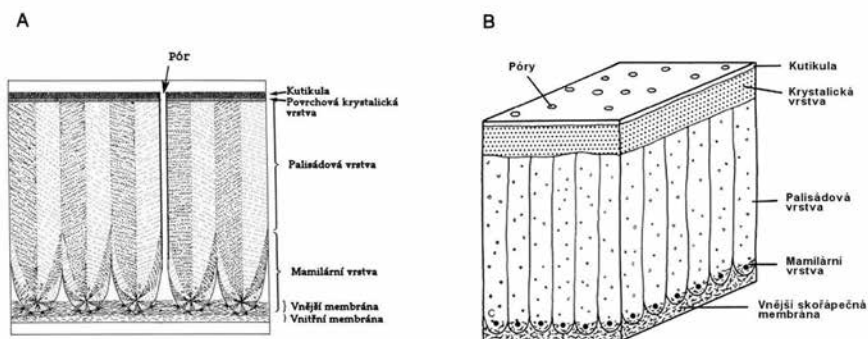


Obr. 1 – Schéma vejcovodu. Čísla udávají čas od ovulace.

Fig. 1 – Scheme of oviduct. Numbers represent time after ovulation.

Struktura skořápky

Kalcifikované matrice (například kosti, ale i zuby) jsou v biologii obratlovců dvoufázové kompozitní materiály skládající se z kolagenních a nekolagenních látek (proteinů), které jsou v těsném kontaktu s minerály. Obdobný princip platí i u skořápky ptačího vejce, kde dochází rovněž k překrytí dvou rozdílných složek: skořápečné membrány (tj. proteinů) a kompaktní mineralizované vrstvy. Ptačí skořápka je komplexní a vysoce členěný porézní vápenatý biokeramický materiál se značným promícháním organické a anorganické fáze, kdy dochází ke spojení nekalcifikované skořápečné membrány a kalcifikované skořápky. Skořápkou procházejí póry, které umožňují difúzi metabolických plynů a vodní páry, která je nezbytná pro správný vývoj embrya. Schéma struktury skořápky je na obr. 2.



Obr. 2 – Schéma skořápky. A – upraveno dle Roth 2009, B – dle Solomon 1991.

Fig. 2 – Scheme of eggshell. A – changed according Roth 2009, B – according Solomon 1991.

Kutikula

Kutikula vejce je vytvořena během poslední zhruba 1,5 hodiny před snesením vejce. Jedná se o nekalcifikovanou organickou vrstvu na povrchu vejce, tlustou cca 5–10 μm (uvádí se, že dokonce u některých druhů ptáků může i chybět). Je složena z glykoproteinů, polysacharidů, lipidů a anorganického fosforu včetně krystalů hydroxylapatitu (někdy nazýván mylně hydroxyapatit; je např. obsažen i v zubech nebo kostech, chemicky $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Složky kutikuly také ucpávají póry skořápky, a tak fyzicky omezují vstup bakterií dovnitř vejce. Kutikula hraje důležitou roli v kontrole výměny vody jejím odpuzováním a zamezením její ztráty. Má také funkci při omezení mikrobiálního osídlování povrchu skořápky. Právě tato antimikrobiální vlastnost kutikuly začíná být v současné době intenzivně zkoumána. Podle posledních výzkumů se zdá, že se jedná nejspíše o synergické působení více faktorů a látek, jako jsou antimikrobiální proteiny, pigmenty a zatím neidentifikované hydrofobní látky obsažené v povrchu vejce.

Krystalická vrstva

Mezi kutikulou a kalcifikovanými vrstvami, které tvoří podstatu stěny skořápky, je tenká krystalická vrstva z krystalů uhličitanu vápenatého orientovaných vertikálně. Právě tato vrstva je obalena kutikulou. Pigmenty vajec jsou obsaženy hlavně v kutikule a pravděpodobně i v této krystalické vrstvě.

Kalcifikované vrstvy

Ve skořápce je velice zajímavá propletená struktura organických a anorganických složek, která tvoří její takzvanou palisádovou a mamilární vrstvu. Tyto vrstvy jsou podstatou hmoty skořápky (např. 0,3–0,35 mm tloušťky vejce kura domácího). Jejich architektura je pozoruhodná z hlediska toho, jak se proteiny propojují a spojují s vápennou minerální fází a jejím výsledkem jsou unikátní mechanické vlastnosti skořápky. Skořápka je složena hlavně z kalcitu, nejstabilnějšího polymorfního stavu uhličitanu vápenatého CaCO_3 .

Mamilární vrstva

Mamilární tělíska jsou zúžené konce kalcitových sloupců/kuželů, které míří směrem k povrchu skořápky. Hrají klíčovou úlohu ve formování skořápky, ale i v resorpci. Právě tvorbou mamilárních tělísek (zárodků konců) začíná tvorba skořápky na podskořápečné membráně. Zdá se, že struktura mamilár je mnohem komplexnější než navazujících palisád. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že mají právě „zakládací“ funkci (zde začíná tvorba skořápky), ale i funkci zdroje vápníku pro kostru rostoucího zárodku v oplodněném a inkubovaném vejci.

Palisádová vrstva

Palisádová oblast skořápky je definována jako oblast, kde se mineralizované kuželovité struktury pocházející z mamilár těsně dotýkají a tvoří polygonální (mnohaúhlovou) sadu stlačených kuželů. Samozřejmě jsou mezi těmito kužely i tenké póry, které zajišťují výměnu plynů. Pórů bývá 7 000 - 17 000 a mají průměr 10–60 μm . Tato kuželovitá architektura, kdy kužely jsou směrem k povrchu skořápky širší, způsobuje odolnost vnějšímu tlaku a naopak umožňuje při líhnutí proklubání kuřete zevnitř vejce. V této vrstvě je obsaženo překvapivě široké spektrum proteinů.

Proteiny skořápky vajec

Že vejce, obzvláště žloutek, obsahuje proteiny, není nic překvapivého - každý to určitě očekává. Samozřejmě právě «tekutý obsah» vejce byl i přednostním předmětem zájmu z hlediska výzkumu proteinů, bílkovin. Skořápka vejce byla v tomto smyslu opomíjena i z důvodů metodické nesnadnosti výzkumu (například nízká citlivost metod). V současné době dochází zásluhou moderních analytických metod k velkému pokroku v popisu proteinů skořápky vajec. A došlo k překvapivým objevům. Ve skořápce jsou stovky různých proteinů!

Asi nejvíce byly studovány extrahovatelné proteiny z matrice skořápky vajec, kdy například Mann et al. (2006) popsali 520 proteinů. Pro srovnání například rovněž Mann et al. (2008) popsali 119 proteinů ve vaječném žloutku, 78 proteinů ve vaječném bílku a 528 proteinů v dekalifikované skořápce. Ovšem Farinazzo et al. (2009) zvýšili počet popsaných proteinů vaječného žloutku na 255. Proteiny, které jsou specifické pro skořápku vajec, jsou nazývány ovocleidiny a ovocalyxiny a jejich

hlavní funkcí je regulace mineralizace skořápky vejce a antimikrobiální obrana. V literatuře je poměrně dost popsán právě vliv těchto proteinů na růst krystalů uhličitanu vápenatého v biomateriálech a jejich funkce při tvorbě vaječné skořápky.

Většina výzkumu byla provedena na vejci kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*), avšak podobné proteiny lze najít i u vajec jiných druhů ptáků, jako např. u hus velkých (*Anser anser*) - ansocalcin, homologní protein ovocleidinu-17 nebo i podobné proteiny v matrici skořápky emu (*Dromaius novaehollandiae*). U vajec krocana (*Meleagris gallopavo*) bylo identifikováno 697 proteinů.

V celé skořápce vejce bylo zjištěno několik proteinů se známou antimikrobiální aktivitou (lysozym C, ovotransferin, ovocalyxin-32, ovoinhibitor), ale i možný nový „antimikrobiální“ ovocalyxin-36. Protein podobný Kunitz-like proteázovému inhibitoru patří mezi enzymatické regulátory a pravděpodobně má i antimikrobiální funkci.

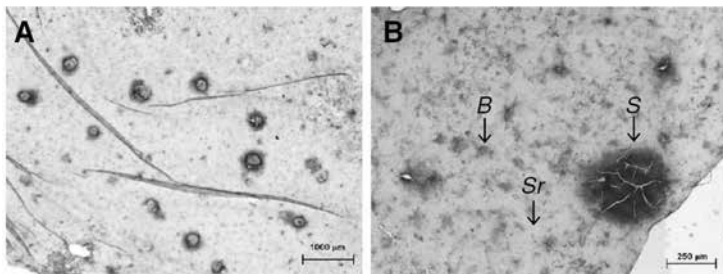
Jak již bylo zmíněno, je široce studována antimikrobiální aktivita obzvláště proteinů kutikuly skořápky vajec. Bylo například zjištěno, že zvýšená tvorba kutikuly zlepšuje přirozenou obranu proti vstupu bakterií. Při určení „původce“ antimikrobiálních vlastností kutikuly je limitujícím faktorem stanovení, determinace, těchto proteinů a určení jejich úlohy v porovnání s ostatními složkami kutikuly. Ještě nedávno bylo popsáno v kutikule pouze 7 proteinů (ovocalyxin-32 a 36, ovocleidin-116 a 17, protein podobný Kunitz-like proteázovému inhibitoru, clusterin a kolagen typu I) (Mikšík et al. 2010, Rose-Martel et al. 2012).

Nejnověji bylo zjištěno v kutikule 37 proteinů (Mikšík et al. 2014), které můžeme rozdělit do 3 charakteristických skupin:

- i) Proteiny a glykoproteiny přítomné i ve vaječném bílku: ovalbumin, lysozym
- ii) Proteiny přítomné v mnoha tkáních: clusterin, sérový albumin
- iii) Proteiny a glykoproteiny specifické pro matrici ptačí skořápky: C-typ lektinu-podobný protein, ovocleidin-17, ovocleidin-116, ovocalyxin-32, ovocalyxin-36.

Nejdominantnějšími proteiny jsou bílkoviny specifické pro matrici ptačí skořápky ovocleidin-17 a ovocleidin-116.

Zajímavý je už jenom pohled na strukturu vzniklou z proteinů kutikuly. Po jemné dekalifikaci je totiž vidět pevná vrstvička, jakási membrána. Při detailní analýze proteinů bylo zjištěno, že se jejich složení mění podle toho, jestli je přítomný pigment nebo ne (viz viditelné skvrny pigmentů na obr. 3). Již tato proteinová struktura napovídá, že kutikula, její proteiny, mohou působit jako fyzická bariéra proti průniku bakterií (obzvláště pokud tyto proteiny mají ještě i antimikrobiální účinky).



Obr. 3 – Fotografie kutikulární membrány (a) zobrazení menším zvětšením, (b) zobrazení větším zvětšením (viz měřítko). S: skvrna, B: malá skvrna, Sr: okolí (tj. oblast bez skvrn nebo malých skvrn). Skvrna (S) má plochu cca 166800 μm^2 (Mikšík et al. 2014).

Fig. 3 – Photograph of cuticular membrane (a) view at the lower resolution, (b) at higher magnification (see scale). S: spot, B: blotch (small spot), Sr: surroundings, i. e. area without spots or blotches. Spot (S) has area cca 166800 μm^2 (Mikšík et al. 2014).

Pigmenty skořápek vajec

Zabarvení a vytváření barevných vzorů ptačí skořápky je způsobeno dvěma hlavními typy pigmentů - protoporfyrin IX (hnědavé tóny) a biliverdin IXa (modré a zelené tóny) (Mikšík et al. 1994) a samozřejmě jejich kombinací. Protoporfyrin, který je tvořen během biosyntézy krevního hemu, je v kalcitových i kutikulárních vrstvách skořápky (s výraznou dominancí pro kutikulu), je přítomný ve skvrnách, ale i prakticky ve všech vrstvách skořápky. Je třeba říci, že tyto pigmenty obsahují prakticky všechna vejce, ba i úplně bílá. Pouze jejich množství je výrazně rozdílné. Je dobré v této souvislosti ještě upozornit na staré názory, že pigmentace vajec je způsobena krví při průchodu vejce vejcovodem (kloakou?). Tyto názory jsou již dávno vyvráceny, ale bohužel stále přetrvávají.

Úloha zbarvení vejce, jeho pigmentace, může mít rozdílné vysvětlení a biologický význam, počínaje kryptickou funkcí (maskování proti predátorům), termoregulační, zpevňující (v místě pigmentace je skořápka tenčí, ale může být i pevnější), ale i signální funkci. Pigmenty se mohou podílet i na antibakteriální obraně vejce. Dobrý přehled o zabarvení ptačích vajec a jeho úlohy podávají Večlová & Hořák (2009). Vzhledem k tomu, že je tento článek poměrně recentní a české amatérské ornitologické veřejnosti dostupný, tak tato problematika nebude dále rozebírána.

Závěr

Článek podává stručný přehled o problematice skořápky ptačího vejce. Snad laskavý čtenář z textu pochopí, že i když se jedná o relativně známou strukturu, tak vedle «filozofického problému» co bylo dříve, skýtá skořápka ještě mnoho tajů, jejichž rozřešení může přinést zajímavá fakta a poznání.

Literatura

- Farinazzo A., Restuccia U., Bachi A., Guerrier L., Fortis F., Boschetti E., Fasoli E., Citterio A. & Righetti P. G. 2009: Chicken egg yolk cytoplasmic proteome, mined via combinatorial peptide ligand libraries. - *Journal of Chromatography A*, 1216 (8): 1241–1252.
- Mann K., Mačėk B. & Olsen J. V. 2006: Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. - *Proteomics*, 6: 3801–3810.
- Mann K., Olsen J. V., Mačėk B., Gnad F. & Mann M. 2008: Identification of new chicken egg proteins by mass spectrometry-based proteomic analysis. - *World's Poultry Science Journal*, 64 (2): 209–218.
- Mikšėk I., Holáň V. and Deyl Z. 1994: Quantitation and variability of eggshell pigments content. - *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A: 769–772.
- Mikšėk I., Sedláková P., Lacinová K., Pataridis S. & Eckhardt A. 2010: Determination of insoluble avian eggshell matrix proteins. - *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397: 205–214.
- Mikšėk I., Ergang P. & Pácha J. 2014: Proteomic analysis of chicken eggshell cuticle membrane layer. - *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (29): 7633–7640.
- Nys Y., Bain M. & Van Immerseel F. (Eds.) 2011: Improving the safety and quality of eggs and egg products, egg chemistry, production and consumption. Vol. 1. - *Woodhead Publishing, Cambridge*.
- Rose-Martel M., Du J. & Hincke M. T. 2012: Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. - *Journal of Proteomics*, 75 (9): 2697–2706.
- Roth K. 2009: Allerlei vom Frühstücksei. Eine Oologisch-chemische Osterbetrachtung. - *Chem. Unserer Zeit*, 43 (2): 100–114.
- Solomon S. E. 1991: Egg and eggshell quality. - *Wolfe Publishing, Aylesbury*.
- Večlová B. & Hořák D. 2009: Příčiny proměnlivosti ve zbarvení ptačích vajec. - *Sylvia*, 45: 51–72.

Adresa autora:

Ivan Mikšėk,

Brabcova 2,

CZ - 147 00 Praha 4

email: IMiksik@seznam.cz