

ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ЛЬДА В ГОМОГЕНАТЕ НАТИВНЫХ ЯЙЦЕКЛЕТОК ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Фирсова А.В.

Южный научный центр Российской академии наук, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Аннотация. В работе исследован процесс формирования микрочастиц льда в тонком слое (0.2 мм) протоплазмы икры русского осетра при охлаждении до температуры -196°C . При постепенном охлаждении от комнатной температуры $+20^{\circ}\text{C}$ до -196°C наблюдали процесс замерзания, формирование и изменения микрочастиц льда. Форма и размер частиц зависела от состава замораживаемого раствора. Температура замерзания для всех слоев протоплазмы была различна, что обуславливается химическим составом.

Ключевые слова. Яйцеклетка, русский осетр, криоконсервация, микрочастицы.

FORMATION OF ICE MICROPARTICLES IN THE HOMOGENATE OF NATIVE EGGS OF STURGEON FISH DURING CRYOPRESERVATION

Firsova A.V.

Southern scientific centre of the Russian academy of sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. In this work, we studied the formation of ice microparticles in a thin layer (0.2 mm) of the protoplasm of Russian sturgeon caviar upon cooling to a temperature of -196°C . Upon gradual cooling from room temperature $+20^{\circ}\text{C}$ to -196°C , the process of freezing, formation and changes of ice microparticles were observed. The shape and size of the particles depended on the composition of the frozen solution. The freezing temperature for all layers of protoplasm was different, which is due to the chemical composition.

Keywords. Ovum, Russian sturgeon, cryopreservation, microparticles.

В результате воздействия антропогенного фактора на водные экосистемы увеличивается число исчезающих видов гидробионтов. Вместе с тем, искусственное воспроизводство ценных видов рыб изменяет генетическую структуру популяций. В данном случае наиболее перспективным является использование криоконсервированного генетического материала, позволяющего при искусственном воспроизводстве, получении гибридных форм и товарном выращивании рыб сохранять необходимую гетерогенность генофонда.

При охлаждении жидкостей до температуры, называемой температурой замерзания, начинается переход жидкого вещества в твердое кристаллическое состояние [1]. Образование и рост кристаллов льда хорошо описывает кластерная модель структуры воды, предложенной Х. Фрэнком и В. Уэном в 1957 г., согласно которой в жидкой воде постоянно появляются и распадаются кластеры молекул [2]. В работах Y. Rabin с соавторами [3] показано, что при охлаждении водных растворов с живыми тканями ниже -100°C термомеханическое напряжение в замороженной среде увеличивается из-за сжатия льда. Формирование растрескиваний зависит от физических свойств замораживаемого материала (эластичности и жесткости). Если кристаллы льда в замерзшей среде характеризуются высокой жесткостью, то аморфный лед, образовавшийся из высококонцентрированных растворов, может обладать значительной эластичностью. Увеличение эластичности материала ведет к снижению температуры, при которой начинается растрескивание и соответственно формирование микрочастиц льда [4].

Живые клетки гибнут при глубоком замораживании из-за образующихся повреждающих микрочастиц, если не осуществить специальные защитные мероприятия. Замораживая ткани или клетки до температуры стеклования, возможно сохранять их в таком состоянии неограниченное количество времени. Полученные при этом повреждения значительно меньше, чем при замораживании с кристаллизацией. Именно это явилось бы решением задач сохранения исчезающих видов рыб методами криоконсервации их яйцеклеток [5, 6].

В настоящей работе изучен процесс замерзания протоплазмы нативной икры русского осетра с целью дальнейшего поиска криопротектора для криоконсервации яйцеклеток рыб.

Материалом для исследований служила протоплазма икры русского осетра. Для отделения внутреннего содержимого икринок от оболочек первоначально подсушивали икру на фильтровальной бумаге от овариальной жидкости, а затем растирали икру в ступке. Получившуюся суспензию центрифугировали в течение 40 минут при 7000 оборотах в минуту. В результате оболочки оседали, а всё содержимое распределялось на 3 слоя (рис. 1).



Рисунок 1 – Ампула Эппендорфа с икрой русского осетра после центрифугирования

Для изучения форм микрочастиц и происходящих изменений в процессе охлаждения, смонтировали установку, состоящую из микроскопа, пенопластового бокса, камеры Фукса-Розенталя, термометра, видеокамеры и осветителя. Охлаждение пробы осуществляли сначала парами азота, а затем жидким азотом, регулируя подачу азота в бокс, доводя температуру пробы до -196°C . Каждый слой рассматривали по отдельности. Необходимый для эксперимента слой отбирали медицинским шприцем.

Согласно законам физики в процессе центрифугирования молекулы со схожей массой группируются друг с другом (фракционируются): наиболее тяжелые – белки, пектины, клетчатка и др. – оседают в виде пасты на дне и стенках сосуда; наиболее легкие – эфирные масла и прочие жиры – собираются на поверхности в виде тонкой пленки-эссенции; сахара, органические кислоты и соли остаются в жидком растворе между осадком и жировой пленкой. Из литературных данных [7] известно, что основные компоненты клетки осаждаются в следующей последовательности: сначала целые клетки и их фрагменты, затем ядра, митохондрии, лизосомы, микросомы и, наконец, рибосомы. Таким образом, в данной работе, предположительно, основную массу верхнего слоя образуют жировые вакуоли, средний слой образован цитозолем, а нижний слой – белками, в частности из желточных вакуолей.

При охлаждении образовавшегося после центрифугирования верхнего слоя содержимого яйцеклеток русского осетра началось застывание пробы при -20°C . Растрескивание пробы не наблюдали, вероятно произошло стеклование. Далее система оставалась неизменной до -105°C . С этой температуры и до -120°C шло формирование микрочастиц, после чего до температуры жидкого азота система снова оставалась стационарной. Микрочастицы льда имели различные формы, в том числе наблюдали округлые формы без острых краев.

Верхний слой гомогената является биологической суспензией. Образовавшиеся частицы с овальными краями не могут повредить целостность клеток при глубоком замораживании.

Второй слой отцентрифугированной икры русского осетра застыл при -5°C , формирование микрочастиц начали наблюдать при -70°C . С этого момента и до температуры жидкого азота микрочастицы делились на более мелкие. Микрочастицы льда здесь имели прямоугольные формы.

Нижний слой отцентрифугированной икры начал застывать при -2°C , а первое растрескивание пробы заметили при -65°C . Как и в предыдущем варианте, с этого момента и до температуры жидкого азота микрочастицы льда делились на более мелкие и имели форму прямоугольников.

Таким образом, исследование показало, что микрочастицы льда различных растворов имеют разные формы и размеры, а также растрескивание охлажденных проб происходит при различных температурах.

Содержимое яйцеклеток осетровых рыб начинает образовывать крупные микрочастицы льда лишь при достижении значения температур -65°C . Это дает возможность выдвинуть гипотезу о том, что протоплазма икры рыб содержит связанную воду, которая в отличие от свободной воды, при глубоком замораживании способна образовывать микрочастицы льда с округлыми формами и тем самым предотвращать яйцеклетку от внутренних повреждений при криоконсервации.

Список использованных источников

1. Water activity as the determinant for homogeneous ice nucleation in aqueous solutions / T.Koop [et al.]// Nature. - 2000. -Vol. 406.-P. 611-614.
2. Ion-solvent interaction. Structural aspects of ion-solvent interaction in aqueous solutions: a suggested picture of water structure / H. S. Frank, W.-Y. Wen // Discuss. of the Faraday Soc. - 1957. - №24. - P.133–140.
3. Fracture formation in vitried thin lms of cryoprotectants / Y. Rabin [et al.] // Cryobiology. - 2006. - №53. – P. 75–95.
4. Формирование микрочастиц льда в криозащитных растворах / А.А.Андреев [и др.]// Биофизика. - 2017. – Т. 62, Вып. 2. - С. 213–220.
5. Кристаллографические аспекты криоконсервации генетических ресурсов / Н.Н. Петропавлов [и др.] // Биофизика живой клетки. Криоконсервация генетических ресурсов в проблеме сохранения биоразнообразия. - Пущино, 1994. - Т. 6. -С 62-65.
6. Кристаллизация криозащитных растворов и выживание спермиев рыб при криоконсервации / А.А. Андреев [и др.] // Биофизика. - 2006. – С. 35-48.
7. Практикум по медицинской и биологической физике. Раздел «Биологическая физика»: Методы биофизических исследований / Л. М. Шейко, С. Б. Бокуть. – Минск: МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2011. – 64 с.

Исследование выполнено с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН №73602 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00208.