

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВОДЫ С ПЕРВИЧНЫМИ ОБОЛОЧКАМИ ЯЙЦЕКЛЕТОК РЫБ КАК СИГНАЛА К ИХ ПЕРЕСТРОЙКЕ¹

А. В. Фирсова^{1,2}, А. А. Красильникова¹, А. М. Тихомиров²

¹Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук,
Астрахань, Российская Федерация

²Астраханский государственный технический университет,
Астрахань, Российская Федерация

Цель работы – в контексте разработки методики криоконсервации исследовать взаимодействие воды с первичными оболочками яйцеклеток рыб как сигнала к их перестройке. Объектом для исследования служили репродуктивные клетки стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758), полученные в период нерестовой кампании. Вода – основной активатор функций репродуктивных клеток рыб – при контакте с первичными оболочками икры (двумя желточными и поверхностной студенистой) запускает механизм, изменяющий структуру и функциональную деятельность яйцеклеток, стимулирует подготовку яйцеклеток к оплодотворению, провоцируя перестройку органелл и изменения в оболочках. Последние при контакте с водой активируются и, вне зависимости от факта оплодотворения, приобретают различные свойства (клеякость, плавучесть, увеличение прочности), необходимые для дальнейшего развития эмбрионов в зависимости от условий инкубации. Изменения в свойствах оболочек обусловлены наличием определенных жирных кислот, дальнейшие химические превращения которых и являются основным фактором изменений согласно биологии размножения.

Ключевые слова: яйцеклетка, стерлядь, оболочка, жирные кислоты, вода, криоконсервация.

Для цитирования: Фирсова А. В., Красильникова А. А., Тихомиров А. М. Исследование взаимодействия воды с первичными оболочками яйцеклеток рыб как сигнала к их перестройке // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2020. № 4. С. 147–153. DOI: 10.24143/2073-5529-2020-4-147-153.

Введение

В настоящее время становятся все более актуальными не только формирование живых генфондных коллекций, но и сохранение генетического материала в виде глубокозамороженных спермиев, эмбрионов/предличинок в криобанках [1, 2].

Несмотря на то, что яйцеклетки или эмбрионы рыб, как было показано учеными, выживают в течение короткого времени при охлаждении до нулевых температур, успешная глубокая их заморозка – очень редкое явление. Выделяют два основных препятствия для криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов рыб: во-первых, низкая проницаемость мембран, что затрудняет удаление воды из клетки, а также проникновение криозащитных агентов; во-вторых, большая желтковая масса ооцита и раннего эмбриона. Обе эти особенности приводят к образованию кристаллов льда в процессе замораживания [3].

Изучение строения клеток и их оболочек, видоспецифических различий очень важно для понимания реакции оболочек на водные растворы и моделирования возможных реакций при двойном температурном шоке при криоконсервации. При разработке методов криоконсервации яйцеклеток нельзя недооценивать роль внешней и внутриклеточной воды.

Российские и зарубежные исследователи внесли свой вклад в описание внешнего строения оболочки яйцеклеток осетровых с применением световой микроскопии [4–7]. Структура оболочки и микропиле были описаны у белуги *Huso huso*, русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, сибирского осетра *Acipenser baerii*, севрюги *Acipenser stellatus*, стерляди *Acipenser ruthenus* [4–5, 8–11], белого осетра *Acipenser transmontanus* и адриатического осетра *Acipenser naccarii* [12, 13], а также веслоноса *Polyodon spathula* [14].

¹ Работы выполнены с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602 в рамках реализации ГЗ ЮНЦ РАН «Оценка современного состояния, анализ процессов формирования водных биоресурсов южных морей России в условиях антропогенного стресса и разработка научных основ технологии реставрации ихтиофауны, сохранения и восстановления хозяйственно ценных видов рыб», № госрегистрации 01201354245, и РФФИ в рамках реализации научного проекта РФФИ №19-016-00208.

Перед нерестом яйцеклетки, формирующиеся в яичниках осетровых рыб, растут и созревают. Каждая яйцеклетка окружена слоем фолликулярных клеток, непосредственно питающих яйцо. В течение периода созревания яйцеклетки накапливают большое количество желтка, который будет питать эмбрион во время развития до тех пор, пока личинки не перейдут на экзогенное питание. В течение продолжительного периода роста яйцеклетки ядро располагается в центре. Когда яйцеклетка приближается к своему финальному процессу созревания, ядро мигрирует от центра к анимальному полюсу, чтобы помочь генетическому материалу яйцеклетки легко смешаться с материалом спермы во время оплодотворения. Как только ооциты созревают, они отрываются от окружающего их фолликулярного слоя. Освободившиеся (овулировавшие) яйцеклетки стекают по трубкам и высвобождаются за пределы полости тела самки (нерест) и оплодотворяются. Овулированный ооцит покрыт оболочкой (хорионом), которая при воздействии воды набухает и затвердевает, защищая зародыш внутри. Кроме того, из хориона выделяется вещество, похожее на желе, которое позволяет ооцитам прилипать к субстрату на дне реки [15].

Целью работы было исследование взаимодействия воды с первичными оболочками яйцеклеток рыб как сигнала к их перестройке, что является важным для разработки методики криоконсервации.

Материалы и методы

Для изучения строения нативных оболочек яйцеклеток рыб использовали икру стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). Нативные яйцеклетки обезвоживали в спиртах возрастающей крепости, для чего последовательно использовали 50, 60, 70, 90, 96 и 100 °С спирт. После обезвоживания материал переносили в парафин. Для этого объекты помещали в термостат сначала в кашу (смесь равных частей хлороформа и парафина) при температуре 37 °С, а затем в две-три порции чистого парафина, расплавленного при температуре 56 °С. Пропитанные парафином кусочки наклеивали на деревянные блоки. Для приготовления срезов использовали микротом. Полученные парафиновые срезы наклеивали на предметное стекло, смазанное смесью белка с глицерином (1 : 1) и подсушивали в термостате при 37 °С. Для того чтобы удалить парафин, перед окрашиванием срезы последовательно провели через три порции О-ксилола, спирты нисходящей крепости (от 100 до 70 °С) и поместили в дистиллированную воду. Готовые препараты смотрели на микроскопе Olympus BX53 с использованием камеры для микроскопа Olympus XC50 (рис. 1).

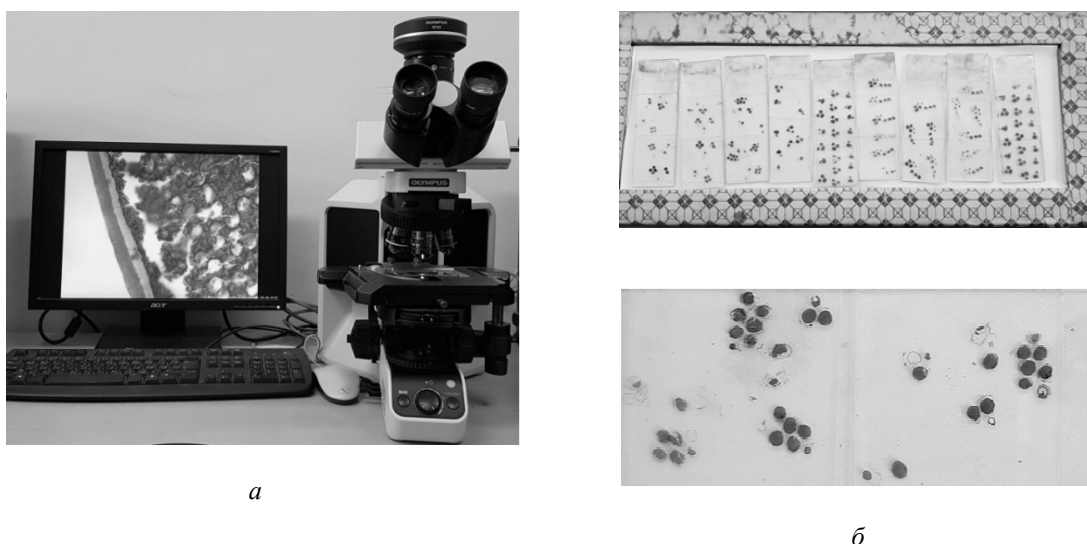


Рис. 1. Микроскоп Olympus BX53 с камерой Olympus XC50 (а) и препараты срезов икры (б)

Результаты и их обсуждение

При изучении оболочек нативных яйцеклеток осетровых рыб на примере стерляди обнаружено, что под фолликулярным эпителием ооцит покрыт яйцевыми оболочками – двумя желточными и поверхностной студенистой (рис. 2).

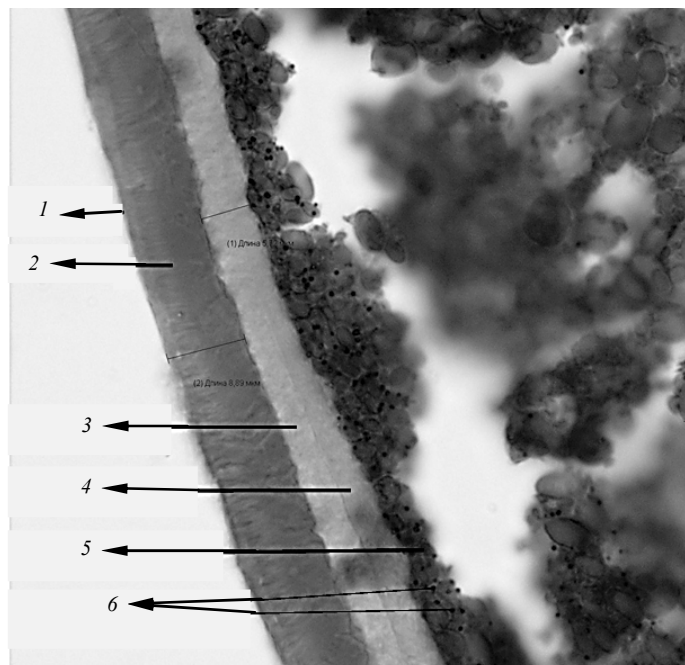


Рис. 2. Оболочка ооцита стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758):

1 – фолликулярный эпителий; 2 – студенистая оболочка (хорион); 3 – наружная желточная оболочка; 4 – внутренняя желточная оболочка; 5 – кортикальный слой; 6 – кортикальные гранулы

Хорион (студенистая оболочка) имеется только у клейкой икры и располагается поверх лучистой оболочки, он состоит из белков и кислых и нейтральных мукополисахаридов. Кислые мукополисахариды, локализованные по внешнему краю либо в кончиках ворсинок, гидратируясь в воде, становятся липкими, благодаря чему икра приклеивается к субстрату [12, 16, 17].

При работе с нативной икрой отчетливо видны обе желточные оболочки, вероятно, в силу различной степени их растяжения. Позже, после попадания яйцеклетки в воду и при дальнейшем оплодотворении, желточные оболочки плотно прилегают друг к другу, поэтому могут быть приняты за одну (рис. 3).

Вода в первую очередь контактирует с плазмолеммой и мембранами первичных оболочек, от проницаемости которых зависит как количество проникшей внутрь воды, так и путь происхождения энергии на обеспечение необходимых реакций. Перестройки органелл и дальнейшее дробление, которые начинаются внутри клеток у разных видов рыб после активации водой, идентичны. Однако изменение первичной оболочки яйцеклеток у разных видов рыб различно: у некоторых появляется клейкость (белуга, карп), а другие набухают и увеличиваются в размерах в несколько раз (толстолобик).

Разные экологические условия развития икры отразились на строении яйцеклеток и характерных особенностях, заключающихся в химическом составе органелл клеток, что,

по-видимому, определяется наличием определенных жирных кислот, дальнейшие химические превращения которых и являются основным фактором изменений клеток согласно биологии размножения (таб.).

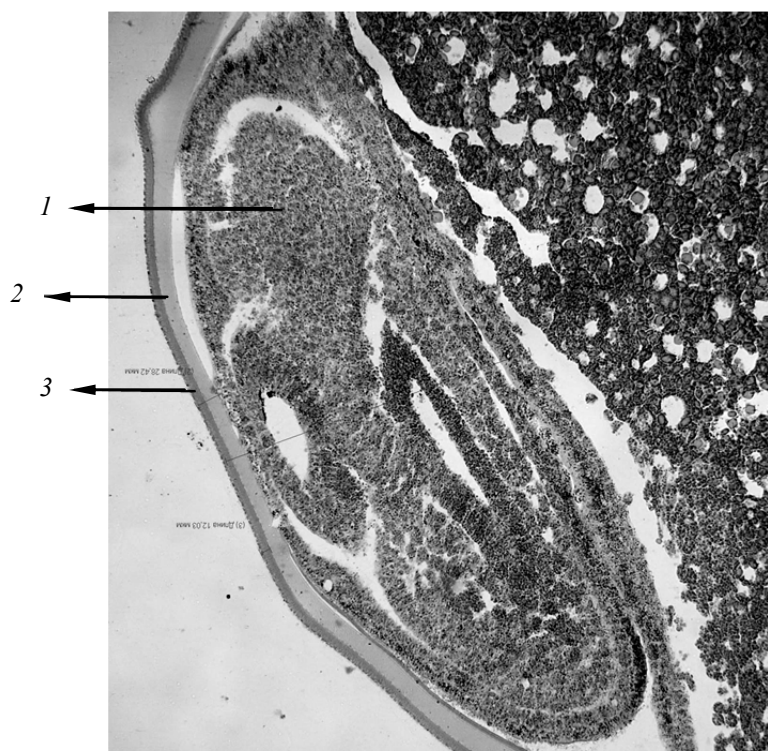


Рис. 3. Оболочка оплодотворенной яйцеклетки стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758):
1 – полость гастрюлы; 2 – желточная оболочка; 3 – студенистая оболочка (хорион)

Состав жирных кислот первичных оболочек рыб*

Тип икры	Состав первичных оболочек
Икра в буграх (лососевые)	Насыщенные кислоты 18,26 %, мононенасыщенные + полиненасыщенные 81,74 %
Приклеивающаяся икра (сазан)	Насыщенные 36,18 %, мононенасыщенные 35,02 %, полиненасыщенные 28,8 % кислоты
Плавающая икра (толстолобик)	Моноеновые кислоты 36,8 %, насыщенные кислоты 42 %, полиненасыщенные 21,2 %

*Составлено по [18].

Так, для икры, развивающейся в буграх (лососевые), характерно наличие пальмитиновой и олеиновой кислот, которые при взаимодействии с водой переходят в стеариновую кислоту, не растворимую в воде и способствующую повышению прочности первичных оболочек. Моноеновые кислоты вызывают внутренние перестройки в клетке, а именно концентрацию жировых вакуолей в районе микропиле. Вследствие такой перестройки яйцеклетка обретает плавучесть и пространственную ориентацию (микропиле вверх). Таким образом, вода при контакте с оболочками клеток запускает механизм, который изменяет структуру и функциональную их деятельность в зависимости от дальнейшего развития эмбриона.

Заключение

По результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что вода – основной активатор функций репродуктивных клеток рыб. При контакте с первичными оболочками икры она запускает механизм, изменяющий структуру и функциональную направленность яйцеклеток. При разработке протоколов криоконсервации очень важно учитывать реакцию оболочек клеток на воду, т. к. от этого фактора также зависит успех процедуры. Вода стимулирует подготовку яйцеклеток к оплодотворению, провоцируя перестройку органелл внутри них и в оболочках для дальнейшего обеспечения оптимальных условий развития эмбриона. Оболочки при контакте с водой активируются и, вне зависимости от факта оплодотворения, приобретают различные свойства (клейкость, плавучесть, увеличение прочности), необходимые для дальнейшего развития эмбрионов в зависимости от условий инкубации. Изменения в свойствах оболочек обусловлены наличием определенных жирных кислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пономарева Е. Н., Красильникова А. А., Тихомиров А. М., Фирсова А. В. Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток осетровых видов рыб // Юг России: экология, развитие. 2016. Т. 11. № 1. С. 59–68.
2. Пономарева Е. Н., Красильникова А. А., Фирсова А. В., Белая М. М. Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы // Рыбное хозяйство. 2017. № 4. С. 85–88.
3. Rawson D. M., Zhang T. New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos // The role of biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy. 2005. P. 209–210.
4. Детлаф Т. А., Гинзбург А. С., Шмальгаузен О. И. Развитие осетровых рыб. Созревание яиц, оплодотворение, развитие зародышей и предличинок. М.: Наука, 1981. 224 с.
5. Марков К. П. Изучение микроструктуры оболочки яиц русского осетра *Acipenser guldenstadti* В. с помощью электронного сканирующего микроскопа // Вопросы ихтиологии. 1975. Т. 15. Вып. 5. С. 822–832.
6. Doroshov S. I., Moberg G. P., Van Eenennaam J. P. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus* // *Environmental Biology of Fishes*. 1997. V. 48. P. 265–278.
7. Siddique M. A. M., Cosson J., Psenicka M., Linhart O. A review of the structure of sturgeon egg membranes and of the associated terminology // *Journal of Applied Ichthyology*. 2014. V. 30 (6). P. 1246–1255.
8. Le Menn F., Pelissero C. Histological and ultrastructural studies of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* // *Acipenser*. P. Williot (Ed.). Cemagref Publ., Springer, Netherlands, 1991. P. 113–127.
9. Debus L., Winkler M., Billard R. Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons // *International Review of Hydrobiology*. 2002. V. 87. P. 585–603.
10. Psenicka M., Rodina, M., Linhart O. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy // *Animal Reproduction Science*. 2010. V. 117. P. 147–154.
11. Zelazowska M. Formation and structure of egg envelopes in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* (*Acipenseriformes: Acipenseridae*) // *Journal of Fish Biology*. 2010. V. 76. P. 694–706.
12. Cherr G. N., Clark W. H. Fine structure of the envelope and micropyles in the eggs of the white sturgeon *Acipenser transmontanus* Richardson // *Development, Growth and Differentiation*. 1982. V. 24. P. 341–352.
13. Spinaci L., Lamia L. C., Cataudella S., Cotteli F. Preliminary contribution to the study of structural modifications of egg envelope during embryogenesis in *Acipenser naccarii* // *Journal of Applied Ichthyology*. 1999. V. 15. P. 320–321.
14. Linhart O., Kudo S. Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization // *Journal of Fish Biology*. 1997. V. 51. P. 573–582.
15. Frank A. Ch., Joel P., Eenennaam V. Technically Speaking, What Is Sturgeon Caviar? // *University of Florida IFAS Extension*. 2016. P. 1–5.
16. Макеева А. П., Микодина Е. В. Строение яйцевых оболочек карповых рыб и некоторые данные об их химической природе // *Науч. докл. высш. шк. Биолог. науки*. 1977. № 9 (165). С. 60–64.
17. Микодина Е. В. О структуре поверхности оболочек икринок костистых рыб // *Вопр. ихтиологии*. 1987. Т. 27. Вып. 1. С. 106–113.
18. Лебская Т. К., Менчинская А. А. Сравнительная характеристика пищевой ценности икры некоторых рыб // *Вестн. науки и образования Северо-Запада России*. 2015. Т. 1. № 2. С. 1–7.

Статья поступила в редакцию 04.08.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Фирсова Ангелина Валерьевна – Россия, 414056, Астрахань; Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук; младший научный сотрудник отдела водных биологических ресурсов бассейнов южных морей; Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; лаборант кафедры аквакультуры и рыболовства; firsovaangelina1991@mail.ru.

Красильникова Александра Андриановна – Россия, 414056, Астрахань; Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук; канд. биол. наук; старший научный сотрудник отдела водных биологических ресурсов бассейнов южных морей; alexandra.kras@yandex.ru.

Тихомиров Андрей Михайлович – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; канд. биол. наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии сохранения и воспроизводства ценных видов рыб; tikhomirov41@mail.ru.



INVESTIGATING INTERACTION OF WATER WITH PRIMARY MEMBRANES OF FISH EGGS AS SIGNAL FOR THEIR RESTRUCTURING

A. V. Firsova^{1,2}, A. A. Krasilnikova¹, A. M. Tikhomirov²

¹Federal Research Center The Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Astrakhan, Russian Federation

²Astrakhan State Technical University, Astrakhan, Russian Federation

Abstract. The article outlines studying the interaction of water with the primary membranes of fish eggs as a signal for their restructuring, which is important for developing the cryopreservation techniques. The reproductive cells of sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) obtained during the spawning campaign served as the object of research. Water as a main activator of the functions of fish reproductive cells contacting with primary membranes of eggs (two yellows and one surface jelly-like) triggers a mechanism that changes the structure and functional activity of eggs, stimulates the preparation of eggs for fertilization, provoking the rearrangement of organelles and changes in the membranes. The latter are activated contacting with water and, regardless of the fact of fertilization, acquire various properties (stickiness, buoyancy, increased strength) necessary for the further development of embryos, depending on the conditions of incubation. Changes in the properties of the membranes are stipulated by the presence of certain fatty acids, further chemical transformations of which are the main factor of their changes, according to the biology of reproduction.

Key words: egg cell, sterlet, membrane, fatty acids, water, cryopreservation.

For citation: Firsova A. V., Krasilnikova A. A., Tikhomirov A. M. Investigating interaction of water with primary membranes of fish eggs as signal for their restructuring. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry*. 2020;4:147-153. (In Russ.) DOI: 10.24143/2073-5529-2020-4-147-153.

REFERENCES

1. Ponomareva E. N., Krasil'nikova A. A., Tikhomirov A. M., Firsova A. V. Novye biotekhnologicheskie metody kriokonservatsii reproductivnykh kletok osetrovyykh vidov ryb [New biotechnological methods of cryopreservation of reproductive cells of sturgeon species]. *Iug Rossii: ekologiya, razvitie*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 59-68.
2. Ponomareva E. N., Krasil'nikova A. A., Firsova A. V., Belaia M. M. Kriokonservatsiia reproductivnykh kletok ryb: istoriia i perspektivy [Cryopreservation of fish reproductive cells: history and prospects]. *Rybnoe khoziaistvo*, 2017, no. 4, pp. 85-88.
3. Rawson D. M., Zhang T. *New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos. The role of biotechnology*. Villa Gualino, Turin, Italy, 2005, pp. 209-210.
4. Detlaf T. A., Ginzburg A. S., Shmal'gauzen O. I. *Razvitie osetrovyykh ryb. Sozrevanie iaits, oplodotvorenii, razvitie zarodyshei i predlichinok* [Sturgeon development. Maturation of eggs, fertilization, development of embryos and prelarvae]. Moscow, Nauka Publ., 1981. 224 p.
5. Markov K. P. Izuchenie mikrostruktury obolochki iaits ruskogo osetra *Acipenser guldenstadti* V. s pomoshch'iu elektronogo skaniruiushchego mikroskopa [Studying microstructure of egg shell of Russian sturgeon *Acipenser guldenstadti* V. using electron scanning microscope]. *Voprosy ikhtiologii*, 1975, vol. 15, iss. 5, pp. 822-832.
6. Doroshov S. I., Moberg G. P., Van Eenennaam J. P. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, vol. 48, pp. 265-278.
7. Siddique M. A. M., Cosson J., Psenicka M., Linhart O. A review of the structure of sturgeon egg membranes and of the associated terminology. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, vol. 30 (6), pp. 1246-1255.

8. Le Menn F., Pelissero C. *Histological and ultrastructural studies of the Siberian sturgeon Acipenser baerii*. Acipenser. P. Williot (Ed.). Cemagref Publ., Springer, Netherlands, 1991. Pp. 113-127.
9. Debus L., Winkler M., Billard R. Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons. *International Review of Hydrobiology*, 2002, vol. 87, pp. 585-603.
10. Psenicka M., Rodina, M., Linhart O. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (Acipenser), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Animal Reproduction Science*, 2010, vol. 117, pp. 147-154.
11. Zelazowska M. Formation and structure of egg envelopes in Russian sturgeon Acipenser gueldenstaedtii (Acipenseriformes: Acipenseridae). *Journal of Fish Biology*, 2010, vol. 76, pp. 694-706.
12. Cherr G. N., Clark W. H. Fine structure of the envelope and micropyles in the eggs of the white sturgeon Acipenser transmontanus Richardson. *Development, Growth and Differentiation*, 1982, vol. 24, pp. 341-352.
13. Spinaci L., Lamia L. C., Cataudella S., Cotteli F. Preliminary contribution to the study of structural modifications of egg envelope during embryogenesis in Acipenser naccarii. *Journal of Applied Ichthyology*, 1999, vol. 15, pp. 320-321.
14. Linhart O., Kudo S. Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization. *Journal of Fish Biology*, 1997, vol. 51, pp. 573-582.
15. Frank A. Ch., Joel P., Eenennaam V. *Technically Speaking, What Is Sturgeon Caviar?* University of Florida IFAS Extension, 2016. Pp. 1-5.
16. Makeeva A. P., Mikodina E. V. Stroenie iaitseykh obolochek karpovykh ryb i nekotorye dannye ob ikh khimicheskoi prirode [Structure of egg shells of cyprinids and data on their chemical nature]. Nauchnye doklady vysshei shkoly. *Biologicheskie nauki*, 1977, no. 9 (165), pp. 60-64.
17. Mikodina E. V. O strukture poverkhnosti obolochek ikrinok kostistykh ryb [On structure of egg shell surface of teleost fish]. *Voprosy ikhtiologii*, 1987, vol. 27, iss. 1, pp. 106-113.
18. Lebskaia T. K., Menchinskaia A. A. Sravnitel'naiia kharakteristika pishchevoi tsennosti ikry nekotorykh ryb [Comparative characteristics of nutritional value of some fish eggs]. *Vestnik nauki i obrazovaniia Severo-Zapada Rossii*, 2015, vol. 1, no. 2, pp 1-7.

The article submitted to the editors 04.08.2020

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Firsova Angelina Valer'evna – Russia, 414056, Astrakhan; Federal Research Center The Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; Junior Researcher of the Department of Aquatic Biological Resources of the South Sea Basins; Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Laboratory Assistant of the Laboratory of Aquaculture and Fisheries; firsovaangelina1991@mail.ru.

Krasilnikova Aleksandra Andrianovna – Russia, 414056, Astrakhan; Federal Research Center The Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; Candidate of Biology; Senior Researcher of the Department of Aquatic Biological Resources of the South Sea Basins; alexandra.kras@yandex.ru.

Tikhomirov Andrey Mikhaylovich – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Candidate of Biology; Leading Researcher of the Research Laboratory of Biotechnologies of Conservation and Reproduction of Valuable Fish Species; tixomirov41@mail.ru.

