

ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ЛЬДА В ОВАРИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ГОМОГЕНАТЕ НЕОПЛОДОТВОРЕННЫХ ЯЙЦЕКЛЕТОК РУССКОГО ОСЕТРА ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ ДО -196°C

© 2020 г. Е.Н. Пономарева*, А.В. Фирсова*, А.М. Тихомиров**, А. А. Андреев***

*Южный научный центр РАН, 344006, Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41

**Астраханский государственный технический университет, 414056, Астрахань, ул. Татищева, 16

***Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290, Пущино Московской области, Институтская, 3

E-mail: firsovaangelina1991@mail.ru

Поступила в редакцию 07.10.2019 г.

После доработки 10.03.2020 г.

Принята к публикации 25.03.2020 г.

Проблема криоконсервации икры рыб и земноводных на сегодняшний день не решена. При глубоком замораживании яйцеклеток рыб основным повреждающим фактором является образование кристаллов льда внутри и вне клеток, а также разрастание этих кристаллов (рекристаллизация, перекристаллизация). Для предотвращения таких повреждений требуется разработка эффективных криопротекторных сред. Присутствие в криозащитной среде дополнительных компонентов, снижающих термомеханические напряжения и растрескивание замороженной среды, может увеличить выживаемость ооцитов после процедуры замораживания-оттаивания. Представляется возможным использовать в качестве таких добавок естественные компоненты икры и овариальной жидкости. Целью исследований явилось изучение процесса формирования микрочастиц льда в тонком слое (0.2 мм) овариальной жидкости и компонентов гомогената икры русского осетра при их охлаждении до температуры жидкого азота (-196°C). При постепенном понижении температуры наблюдали процесс замерзания, растрескивания льда и формирование микрочастиц. Форма и размер микрочастиц зависели от состава замораживаемого раствора. Сделано предположение что некоторые фракции гомогената икры могут быть использованы как компоненты криозащитной среды.

Ключевые слова: замораживание, растрескивание льда, микрочастицы, икра осетра.

DOI: 10.31857/S0006302920030151

Резкое сокращение популяций рыб как поверхностных континентальных вод, так и мирового океана требует принятия срочных мер для сохранения генетического материала с использованием методов криоконсервации. Технология криоконсервации спермы рыб в значительной степени отработана. Проблемой является криоконсервация ооцитов, которые сложно обратимо заморозить из-за крупного размера клеток, высокого содержания желтка и низкой проницаемости мембран для криозащитных соединений [1]. Необходим поиск новых подходов к созданию сред для консервации ооцитов. Один из таких возможных подходов — использование криозащитных сред с низким содержанием воды (например, растительного жира), чтобы уменьшить повреждения, вызываемые внеклеточными кристаллами льда.

Вода и водные растворы при замораживании в зависимости от условий охлаждения (скорости охлаждения, объемной доли воды, формы и раз-

меров объекта и т.д.) могут переходить в аморфное, полностью кристаллизованное и частично кристаллизованное состояние (т.е. образовывать аморфно-кристаллическую структуру). Зависимость температуры замерзания водного раствора от концентрации растворенных веществ определяется криоскопической константой $1.86^{\circ}\text{C}/\text{M}$ [2]. В процессе кристаллизации воды концентрация растворенных веществ в незамерзшей части раствора увеличивается. Процесс формирования кристаллов льда и увеличение концентрации раствора продолжается по мере охлаждения вплоть до тех пор, пока незамерзший раствор не достигает пороговой степени вязкости, в результате чего образуется аморфный (витрифицированный) лед [3]. Формирование льда при градуально повышающейся концентрации растворенных веществ в охлаждаемой жидкости образует неоднородную среду. Из-за разных коэффициентов температурного расширения/сжатия кристаллов льда и витрифицированных областей замороженного

раствора возникают термомеханические напряжения и растрескивание в замороженной среде [4–7].

При относительно малых напряжениях наблюдаются деформации, пропорциональные величине этих напряжений. Когда термомеханические напряжения становятся чрезмерными, возникает растрескивание замороженного материала. Формирование растрескиваний зависит от физических свойств замораживаемого материала — эластичности и жесткости [8].

Кристаллы льда в замерзшей среде характеризуются высокой жесткостью, а аморфный лед, образовавшийся из высококонцентрированных растворов, — значительной эластичностью. Увеличение эластичности материала ведет к понижению температуры, при которой начинается растрескивание и соответственно формирование микрочастиц льда [9].

Являясь крупными клетками (0.7–7.0 мм), оocytes рыб могут получать значительные повреждения как за счет внеклеточного и внутриклеточного формирования кристаллов льда [10], так и за счет растрескивания замороженной среды и формирования микрочастиц льда. Один из способов снизить повреждения при растрескивании криозащитной среды — повысить эластичность замороженного криозащитного раствора. Для этого используют добавки в криозащитную среду яичного желтка [11], липосом [12–15], водорастворимых высокомолекулярных органических соединений [14–17], растительных жиров [18]. Представляется возможным использовать в качестве таких добавок также естественные компоненты икры и овариальной жидкости рыб.

В данной работе с целью поиска перспективных криозащитных сред для консервации ооцитов нами изучены особенности замерзания овариальной жидкости и отдельных фракций гомогената икры русского осетра, а также растительного жира при охлаждении до температуры -196°C .

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили: овариальная жидкость русского осетра, три различные фракции гомогената неоплодотворенных яйцеклеток русского осетра и растительное масло «Кубаночка» (подсолнечное нерафинированное вымороженное холодного отжима, производитель ООО «Гранд-Стар», Краснодар, Россия).

Для разделения внутреннего содержимого яйцеклеток икру подсушивали на фильтровальной бумаге от овариальной жидкости, а затем растирали в ступке. Получившийся гомогенат центрифугировали в течение 40 мин на центрифуге ЦЛН-2 (Россия) при 7000 об/мин, что соответ-

ствует 4500 g. В результате оболочки икры оседали. Остальное содержимое икры распределялось на три слоя. В процессе центрифугирования молекулы со схожей массой группируются друг с другом (фракционируются): наиболее тяжелые оседают на дне и стенках сосуда; наиболее легкие собираются на поверхности. Сахара, органические кислоты и соли остаются в растворе. По нашей оценке верхний слой состоял преимущественно из содержимого жировых вакуолей, средний слой был образован цитозолем, а нижний слой — содержимым желточных вакуолей. Каждый слой изучали отдельно.

Для регистрации изменения температуры образца (термограммы), температуры замерзания и формирования микрочастиц в процессе охлаждения смонтировали установку [19], состоящую из микроскопа, пенопластового бокса, камеры Фукса–Розенталя, электронного термометра, видеокамеры (рис. 1).

Образцы (10 мкл) вносили в кварцевую камеру Фукса–Розенталя, которую помещали в пенопластовый бокс. Камеру охлаждали до -196°C сначала парами азота, а затем жидким азотом, регулируя подачу жидкого азота в бокс. Температуру измеряли с помощью электронного термометра АТТ-2004 с медь-константановой термопарой. Скорость охлаждения составила около $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Видеорегистрацию процесса замерзания осуществляли при помощи видеокамеры (Alpha A57, Sony, Япония), установленной на микроскопе «Биолам» (ЛОМО, Россия), объектив — 4×10 , окуляр — $\times 7$. Фоторегистрацию микрочастиц проводили при температуре жидкого азота.

При постепенном охлаждении образцов наблюдали изменения состояния и фиксировали температуры фазовых переходов на протяжении всего процесса. После охлаждения до температуры жидкого азота -196°C фотографировали микрочастицы, сформированные в ходе растрескивания замороженного материала (рис. 2).

Эксперименты были проведены в трех повторностях по каждому из пяти образцов. Статистическую обработку проводили с помощью программы SigmaPlot 12. Результаты были представлены в виде среднеарифметического \pm стандартная ошибка среднего арифметического ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллизация растительного масла. При охлаждении жидкого растительного масла не наблюдали процессов образования микрочастиц вплоть до $-80 \pm 7^{\circ}\text{C}$ ($n = 3$). При охлаждении до -196°C проба с растительным маслом изменилась дважды — при температуре ниже 0°C регистрировали застывание; при температуре $-80 \pm 7^{\circ}\text{C}$

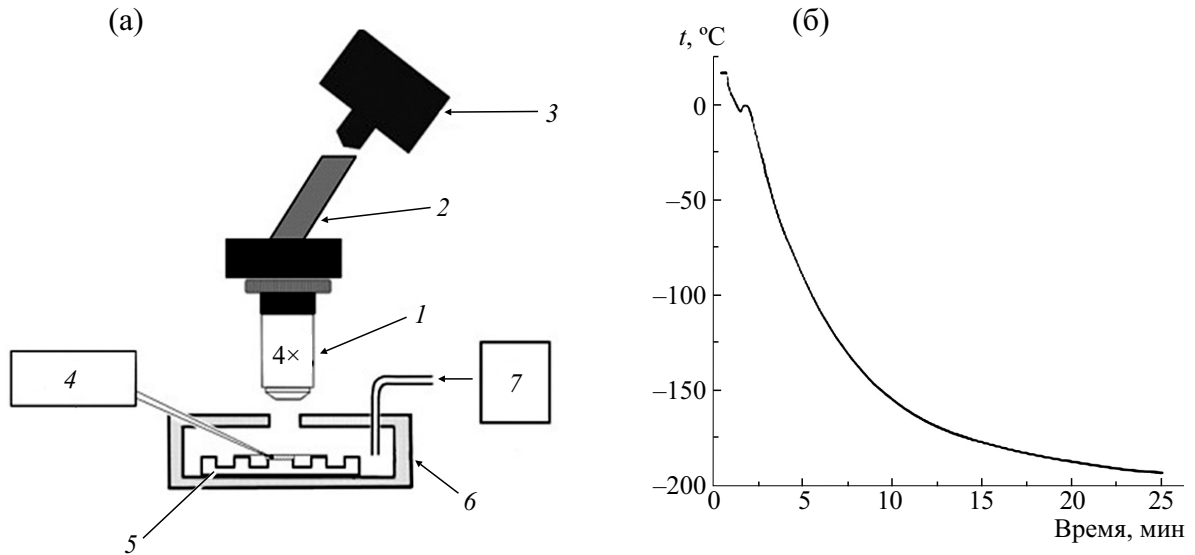


Рис. 1. (а) – Блок-схема установки для замораживания образцов: 1 – объектив микроскопа, 2 – видеоокуляр микроскопа, 3 – видеокамера Sony Alpha A57, 4 – электронный термометр, 5 – камера Фукса–Розенталя, 6 – пенопластовый бокс, 7 – регулируемая система подачи охлажденного и жидкого азота. (б) – Типичная температурная кривая процесса охлаждения образца (дистиллированной воды).

($n = 3$) – формирование микрочастиц. Микрочастицы имели продолговатую форму с округлыми краями. (рис. 2а) и не меняли своих форм и раз-

меров в процессе охлаждения до -196°C . Возможная причина формирования микрочастиц – неоднородность состава жирных кислот в расти-

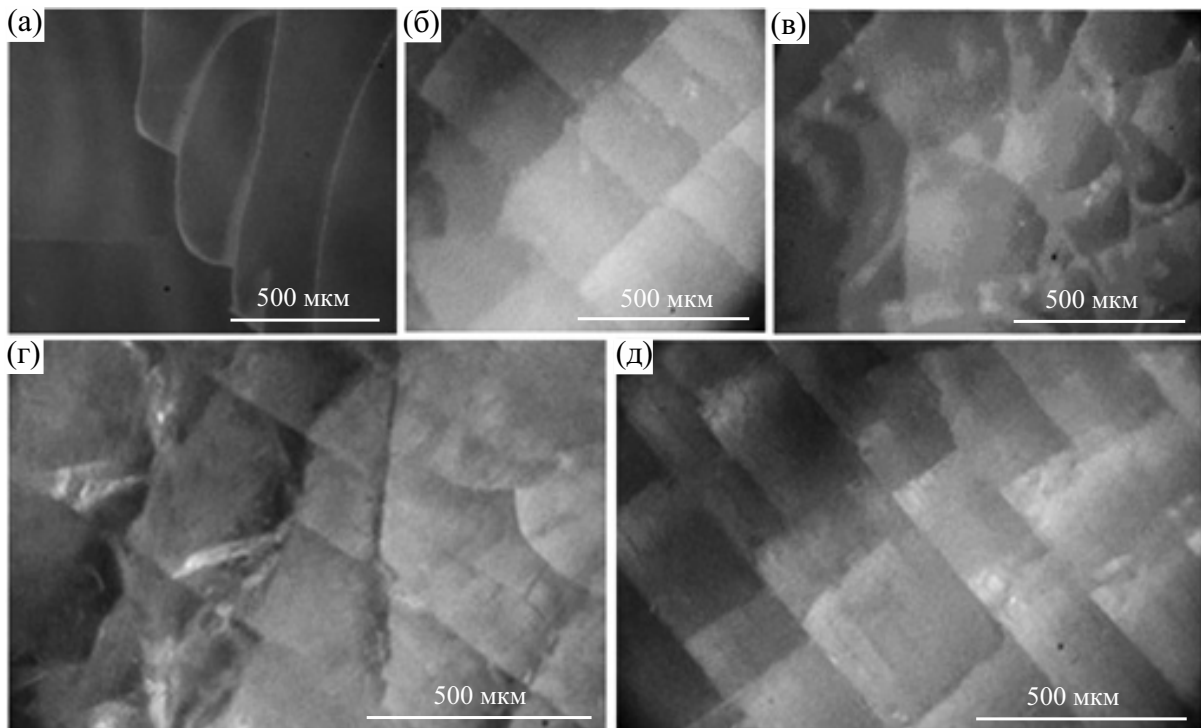


Рис. 2. Микрочастицы льда в замороженных образцах: (а) – растительный жир, (б) – средний слой отцентрифугированного гомогената икры русского осетра, (в) – верхний слой отцентрифугированного гомогената икры, (г) – овариальная жидкость самки русского осетра, (д) – нижний слой отцентрифугированного гомогената икры. Фотографии сделаны при -196°C .

тельном жире [20]. Даже небольшая разница в температурах заморозания отдельных компонентов формирует неоднородную замороженную среду, что при низких температурах приводит к образованию округлых микрочастиц.

Кристаллизация овариальной жидкости. Овариальная жидкость, имеющая вид прозрачной или полупрозрачной вязкой жидкости, по структурно-механическим свойствам является коллоидным раствором (сложным гидрозоле) белковых веществ с незначительными примесями неорганических соединений [13]. В наших экспериментах овариальная жидкость замерзала при $-5 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n = 3$), незначительно или совсем не отличаясь по этому параметру от очищенной воды. При температуре $-70 \pm 6^\circ\text{C}$ ($n = 3$) регистрировали начало растрескивания массива льда. Окончательно сформированные микрочастицы при -196°C имели неоднородные формы и размеры (рис. 2б).

Кристаллизация трех фракций гомогената ооцитов. Замерзание пробы верхнего слоя, по нашей оценке состоящего из жировых вакуолей, регистрировали при $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Растрескивание наблюдали при температуре ниже $-105 \pm 7^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Микрочастицы, сформированные в результате растрескивания, имели различные формы, в том числе округлые, без острых краев (рис. 2в). Похожие по форме микрочастицы льда были получены при замораживании растворов криопротекторов – диметилсульфоксида, формамида, диметилформамида, этиленгликоля, глицерина [9].

Средний слой гомогената ооцитов застыл при $-5 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n = 3$), растрескивание и начало формирования микрочастиц регистрировали при $-70 \pm 8^\circ\text{C}$ ($n = 3$). В отличие от верхнего слоя микрочастицы льда при -196°C имели прямоугольную форму (рис. 2г).

Фазовый переход при охлаждении третьего, нижнего слоя гомогената ооцитов, регистрировали при $-2 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n = 3$), растрескивание пробы – при $-65 \pm 5^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Микрочастицы льда при -196°C имели прямоугольную форму (рис. 2д).

Из всех изученных компонентов только верхний слой отцентрифугированного гомогената яйцеклеток осетра, формировал лед, обладающий повышенной эластичностью. На это указывают низкая температура начала растрескивания массива льда ($-105 \pm 7^\circ\text{C}$ ($n = 3$)) и образование округлых микрочастиц. Вероятно, эластичность замороженной среды значительно повышалась, вследствие присутствия в пробе компонентов жировых вакуолей и за счет этого увеличения доли аморфного (наиболее эластичного) льда в общем объеме замороженной среды. Подобные структуры, как ранее было показано нами, образует замороженный раствор таурина [19], одного из воз-

можных добавочных компонентов криозащитных растворов.

Второй и третий слой гомогената ооцитов в замороженном состоянии обладали сходными термомеханическими свойствами и формировали регулярную структуру из микрочастиц льда.

Овариальная жидкость, очевидно, за счет более высокого содержания воды образовывала неоднородные структуры. Наблюдаемая картина кристаллизации в целом соответствовала картине кристаллизации очищенной воды. Вероятно, белковые компоненты овариальной жидкости практически не повлияли на термомеханические свойства льда при охлаждении до сверхнизких температур.

Растительные масла (жиры) – продукты растительного происхождения, содержащие в основном триглицериды жирных кислот [20]. Растительный жир из-за низкого содержания воды не претерпевал значительных растрескиваний, при охлаждении формируя округлые микрочастицы из замороженных жирных кислот.

Основываясь на полученных данных, с точки зрения поиска новых эффективных сред для консервации ооцитов, перспективным представляется использование в качестве добавок в криозащитную среду верхнего самого легкого компонента гомогената ооцитов осетра. Данная фракция, по нашим предположениям, состоит преимущественно из содержимого жировых вакуолей икры. По своим свойствам она сходна с водными растворами, в составе которых присутствуют водорастворимые липиды или липосомы, для которых показан криозащитный эффект [14, 15]. Присутствие этой фракции в растворе снижало температуру начала растрескивания и обеспечивало морфологическую картину кристаллизации, сходную с картинками, наблюдаемыми при замораживании растворов известных криопротекторов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работы выполнены с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб Южного научного центра РАН № 73602.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках реализации ГЗ ЮНЦ РАН, № государственной регистрации 01201354245 (Апробация методики криоконсервации репродуктивных клеток), и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-016-00208 (Изучение процессов образования микрочастиц льда).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Zhang and D. M. Rawson, *Cryobiology* **55**, 354, (2007),
2. А. Г. Стромберг и Д. П. Семченко, *Физическая химия* (Выш. шк., М., 1999).
3. D. E. Pegg, M. C. Wusteman, and S. Boylan, *Cryobiology* **34** (2), 183 (1997).
4. C. Kroener, B. J. Luyet, *Biodynamica* **10** (201), 47 (1966).
5. Y. Rabin and P. S. Steif, *ASME J. Appl. Mech.* **65** (2), 328 (1998).
6. Y. Rabin and P. S. Steif, in *Advances in Heat and Mass Transfer in Biotechnology, Abstr. Book of Int. Mechan. Engineer. Congr. and Exposition* (Nashville, TN, HTD, 1999), pp. 183–188.
7. Y. Rabin and P. S. Steif, *Int. J. Solids Struct.* **37**, 2363 (2000).
8. Y. Rabin, P. S. Steif, K. C. Hess, et al., *Cryobiology* **53** (1), 75 (2006).
9. Y. Rabin and P. S. Steif, in *Advances in Biopreservation*, Ed. by J. G. Baust and J. M. Baust (Taylor & Francis Group, 2007), pp. 359–379.
10. F. W. Kleinans, J. F. Guenther, D. M. Roberts, and P. Mazur, *Cryobiology* **52** (1), 128 (2006).
11. L. Briand-Amirat, D. Tainturier, and M. Anton, in *Bioactive Egg Compounds*, Ed. by R. Huopalahti, R. Lypetz-Fandico, M. Anton, and R. Schade (Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg, 2007), pp. 259–264.
12. K. M. Wilhelm, J. K. Graham, and E. L. Squires, *Cryobiology* **33**, 320 (1996).
13. L. He, J. L. Bailey, and M. M. Buhr, *Biol. Reprod.* **64** (1), 69 (2001).
14. A. A. Andreev, D. G. Sadikova, C. Labbe, et al., *Biofizika* **53** (4), 598 (2008).
15. A. A. Andreev, D. G. Sadikova, E. N. Gakhova, et al., *Biophysics* **54** (5), 612 (2009).
16. D. A. Balentine, S. A. Wiseman, and L. C. M. Bouwens, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **37**, 693 (1997).
17. U. Rauen and H. de Groot, *Cryobiology* **56**, 88 (2008).
18. А. М. Тихомиров, Патент РФ №2010142589/13 (2010).
19. А. А. Андреев, Д. Г. Садикова, Н. А. Ивличева и А. В. Борода, *Биофизика* **62** (2), 213 (2017).
20. *Химический состав пищевых продуктов*, под ред. И. М. Скурихина и М. Н. Волгарева, кн. I., 2-е изд., перераб. и доп. (Агропромиздат, М., 1987).

Formation of Ice Microparticles in Ovarian Fluid and Homogenate of Unfertilized Eggs of Russian Sturgeon during Cooling to -196°C

E.N. Ponomareva*, A.V. Firsova*, A.M. Tikhomirov**, and A.A. Andreev***

*Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

**Astrakhan State Technical University, ul. Tatishcheva 16, Astrakhan, 414056 Russia

***Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

There are a variety of approaches to increasing cryopreservation efficiency of fish and amphibian eggs, although some hurdles still remain to be overcome. During deep freezing of fish eggs, the main detrimental factor is the formation of ice crystals inside and outside the cells, as well as the growth of these crystals (recrystallization, repeated recrystallization). To avoid injury from freezing, there is a need for the development of effective cryoprotective media. The presence of additional components in the cryoprotective media that reduce thermomechanical stresses and cracks of the frozen tissues might increase survival of oocytes after freezing-thawing. It is probable that natural components of caviar and ovarian fluid may act as such additives. The aim of the research was to study the process of the formation of ice microparticles in a thin layer (0.2 mm) of ovarian liquid and components of the homogenate of Russian sturgeon caviar when they were cooled to the temperature of liquid nitrogen (-196°C). With a gradual decrease in temperature, the processes of freezing, cracking of ice and the formation of microparticles were observed. The shape and size of the microparticles depended on the composition of the frozen solution. Therefore, we assume that some fraction of the homogenate of caviar can be used as a component of cryoprotective medium.

Keywords: freezing, cracking ice, microparticles, sturgeon eggs