

BIOLOGIJA JAČNE CELICE PRI KRAPU

Krap je najbolj pomembna ribja vrsta zmernega klimatskega območja. Proizvodnja krapa v svetu je zelo intenzivna in kljub temu v stalnem naraščanju. Potrebe za ličinkami krapa je v intenzivni vzreji nemogoče zadovoljiti s pomočjo naravnega drstenja, zato si pomagamo s kontroliranim drstenjem, ki pa zahteva med ostalim poznavanje biologije spolnih celic krapa. Reproductivne lastnosti krapa so zelo visoke in se lahko izkoristijo v vzrejne in znanstvene namene.

Cilj seminarske naloge je opisati biologijo jajčne celice krapa od trenutka ovulacije in ejakulacije do začetka embrionalnega razvoja.

Zgradba jajčne celice pri krapu

Jajčna celica pri krapu je sestavljena iz jedra, plazma membrane, ki ovija citoplazmo z jedrom in zone pelucide (zunanje membrane), ki vsebuje mikropilo. Med membranama se nahaja po aktivaciji jajčne celice perivitelinski prostor.

Količina, oblika in velikost jajčnih celic

Samice se v naravnih pogojih drstijo le enkrat na leto. V enem ciklu ovulirajo od 100 000 do 300 000 jajčnih celic/kg telesne mase.

V ovarijah krapovskih samic so oociti poliedrične oblike zaradi navzočega pritiska. Suhe jajčne celice krapa imajo premer od 1.24 do 1.42 mm in maso od 0.86 do 1.41 mg. Po ovulaciji jajčne celice v stiku z vodo nabreknejo in dobijo obliko krogle. Premer nabreknjenih jajčnih celic je od 1.5 do 2.5 mm.

Jedro

Oocita je med rastjo v fazi leptotena prve mejotične delitve. Končna zoritev oocite oziroma nadaljevanje mejoze nastopi malo pred ovulacijo. V tem obdobju potuje zarodni mešiček proti animalnem polu oocite in »izgine« (v literaturi znano kot GVBD, germinal vesicle breakdown). S tem se konča profaza 1 mejotične delitve. Sledi kondenziranje kromosomov, delitveno vreteno se formira in prvo polarno telo se izrine; s tem se tudi konča prva mejotična delitev. Prisotnost germinativnega mešička in njegovo izginjanje sproži verižne reakcije posredovane s hormoni in ionskimi pretoki, ki pripeljejo do končne zoritve jajčne celice. V tej fazi je jajčna celica ovulirana.

Indukcija drstenja z egzogenimi hormonskimi pripravki je inicijacija opisanega procesa. V praksi je zelo težko spremljati dogodke v celici na ravni jedra in je zato ključnega pomena spremljanje potovanja zarodnega mešička. Zato se pred aplikacijo hormonskih pripravkov opravi pregled jajčnega vzorca. Le - tega se dobi s pomočjo tube (dimenzije notranjega premera 4 mm) katero se vrine čez spolno odprtino samice do jajčnika in se izsesa 40 – 50 jajčnih foliklov. Sledi pregled pod svetlobnim mikroskopom. Folikli krapa niso transparentni za svetlobo in jih je potrebno obdelati s Serra raztopino (etanol: formalin (40%): očetna

kislina; 6:3:1 v/v/v). Jajčni folikli postanejo prosojni čez 3 minute in ostanejo prosojni še nadaljnjih 6 - 7 minut. V tem kratkem obdobju je potrebno določiti položaje germinativnih mešičkov v jajčni celici. Namreč samo pri samicah, ki imajo vsaj 65 % oocitov v fazi potovanja germinativnega mešička proti periferiji oocite, lahko uspešno opravimo hormonsko indukcijo ovulacije. Samice, ki imajo manj od 60 % oocitov v fazi potovanja germinativnega mešička se lahko vrnejo nazaj v ribnik in se kasneje hormonsko inducirajo.

Jedro jajčne celice krapa po ovulaciji ostane v metafazi 2. mejozne delitve dokler se ne aktivira z raztopino sladke vode ali pa v solni aktivacijski raztopini.

OOPLAZMA

Ooplazma vsebuje velike količine rumenjaka in razne organele (endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, mitohondrije), kortikalne granule in alveole.

Velikost jajčne celice je odvisna od količine rumenjaka v citoplazmi. Krap ima mezolecitalne jajčne celice s telolecitalno razporeditvijo rumenjaka. V procesu oogeneze, krapovske jajčne celice nabirajo energetske zaloge v obliki rumenjakovih granul in lipidnih inkluzij (oljne kapljice), katere zavzemajo celotni centralni predel zrele oocite. Manjše rumenjakeve granule so pretežno locirane periferno, za razliko od večjih rumenjakovih granul katere zavzemajo centralni položaj zrele oocite. Premer rumenjakovih granul je različen in variira od 6 - 24 mikrometrov. Število in razporeditev oljnih kapljic je variabilno, premer le - teh je pa 1 - 1.5 mikrometrov. Oljne kapljice imajo razen energetske tudi hidrostatsko vlogo.

Starejše samice imajo večje jajčne celice. Kvaliteta jajčne celice je odvisna od količine rumenjaka (oziroma od velikosti celice). Ličinke, ki imajo večji rumenjaka, imajo daljšo zalogo hrane in se začnejo pozneje hraniti s hrano iz okolja, kar je v vzreji zaželeno, saj ličinke nimajo takoj po valitvi razvitih prebavnih organov. Če okolje ni bogato s hrano v katerem so ličinke, je preživetje ličink z večjo zalogo rumenjaka višje in mladice imajo večjo končno maso.

Na nabiranje rumenjaka je možno vplivati z dietno prehrano samic in zato morajo biti samice v zasebnih ribnikih z zelo dobrimi pogoji. Priprava samic na drstenje se začneja takoj po samem drstenju in to (med ostalim) s kvalitetno in načrtno prehrano.

Če se samice držijo pod kontroliranimi pogoji na temperaturi od 20 do 24 C ob visoko proteinski prehrani, drstenje lahko nastopi do pet krat na leto, ampak število jajčnih celic je po ciklu manjše (50 000 jajčnih celic/kg telesne mase). Jajčne celice ovulirane pod takimi pogoji vsebujejo tudi sorazmerno manj energetske zaloge in prav tako je preživetje ličink sorazmerno manjše. Raziskave so pokazale da je optimalni interval med dvema drstoma 2000 dnevni stopinj. Ta čas je potreben, da se nakopiči zadostna količina energetskega materiala v jajčno celico.

Med rastjo oocite so dobro vidni kortikalni alveoli (rumenjakevi mešički). Nahajajo se v neposredni bližini notranje plasti plazma membrane in vsebujejo filamentozni material. Tako kot pri ostalih vretenčarjev sprostitjo ti mešički svojo vsebino med oploditvijo in bi se morali smatrati homolognim s kortikalnim granulam pri vretenčarjih.

Uporaba le - tega termina ni najbolj primerna, ker kortikalni alveoli pri krapovski jajčni celici ne preskrbijo hrano embriju. Kortikalni alveoli merijo v premeru 2.0 - 2.8 mikrometra,

nimajo ribosomov in so razvrščeni v eno ali dve plasti. Razlikujemo A in B kortikalne granule. V kortikalnih alveolah zrele jajčne celice krapa najdemo vrstno specifične A granule. Merijo 0.4 - 2 mikrometra v premeru in so encimsko in citokemično različne od granul ostalih kortikalnih alveol, ker nimajo aktivnost kisle fosfataze. B granule se tako kot A granule pojavljajo po inicijaciji kortikalne reakcije v skupinah znotraj kortikalne citoplazme in so produkt Golgijevega aparata.

Plazma membrana (PM)

PM je lipidni dvoslojnik, ki oddeljuje citoplazmo in jedro od perivitelinskega prostora. V lipidnem dvoslojniku se nahajajo tudi proteini, ki imajo pomembno vlogo v transportu snovi med embrionalnim razvojem.

Zona radijata (membrana pelucida, horion ali kapsula)

Zona pelucida je zunanja ovojnica jajčne celice, ki pred aktivacijo tesno ovija plazma membrano. Po aktivaciji in imbibiciji se ustvari med plazma membrano in zono pelucido perivitelinski prostor kateri obkroža embrij do momenta valitve.

Sestava zone pelucide je kompleksna. Sestavljena je iz dveh osnovnih plasti. Notranja plast se imenuje zona radijata in predstavlja ogrodje zone pelucide. Ima številne radijalne kanale, ki omogočajo pretok vode in ionov. Zunanja plast zone pelucide se v dotiku z neslano vodo (kar ne drži za solno raztopino) pojavi kot homogena lepljiva plast. Ultrastruktura le-te je gosta mreža zgrajena iz filamentov, ki izhajajo iz dehidriranih ogljikovih hidratov in vsebujejo majhne kapljice (glukoproteini ?). Po nabrekanju jajčne celice krapa (čez 0.5 – 1 h) je debelina lepljive plasti 4.3 – 4.5 mikrometra. Zona radijata po nabrekanju meri v debelino 5 – 6 mikrometra.

V področju animalnega pola imajo vsi ciprinidi eno mikropilo. Mikropila je kanal na zoni pelucidi in je edino mesto kjer spermij lahko vstopi. V primerjavi s salmonidnimi vrstami je kanal mikropile krapa mnogo širši. Na notranji odprtini mikroplnega kanala je mesto vezave spermija, ki ima obliko nežne citoplazemske oteklina z 19 - 27 prstom podobnih štrlin.

Lepljivost jajčne celice omogoča, da se v naravnih pogojih jajčna celica krapa zalepi za rastline in ostane v višjih plasteh vode, kjer so pogoji za embrionalni razvoj ugodni (višja temperatura, večje koncentracije kisika). Tiste jajčne celice, ki se ne zalepijo za vodne rastline padejo na dno biotopa in propadejo. Če želimo omogočiti krapovskim samicam pogoje za naravno drstenje, moramo priskrbeti rastline na katere se bodo zalepile jajčne celice. Obraslost biotopa z rastlinami je eden od dejavnikov, ki vplivajo preko hipotalamusa na zoritev in ovulacijo. V ribnikih, ki nimajo dovolj makrofitov običajno ne pride do drstenja.

Poznavanje opisanih lastnosti zone pelucide so zelo pomembne tudi pri tehniki kontroliranega drstenja. Da se prepreči lepljivost se ikra osmuka v suhe posode. Nato se doda sperma samcev in enakomerno premeša. V tem obdobju še ne pride do oploditve, ker je za aktivacijo spermija potrebna voda ali Woynarovicheva rastopina (vsebuje 10 l vode, 40 g kuhinjske soli in 30 g uree). Z dodajanjem le - te raztopine preprečimo lepljivost jajčnih celic in podaljšamo čas oploditve, saj se tako perivitelinski prostor počasneje polni.

Po opravljenem mešanju ikre je potrebno odstraniti lepljivost oplojenih jajčnih celic preden se ikra premesti v inkubatorje. Inkubacija ikre se opravlja v Zugerjevih aparatih, kjer vodni tok z optimalnim fizikalno-kemičnim parametrom oplahuje ikro. Zlepljena ikra bi onemogočala vsem zigotam oskrbo s kisikom in uspešno valjenje. Lepljivost ikre odstranimo s 0.15 % raztopino taninske kisline, ki koagulira zunanjo plast zone pelucide. Čas kontakta med ikro in raztopino taninske kisline mora biti kratek (nekaj sekund), da se ne poškoduje zona radijata.

Pri tehniki kontroliranega drstenja je potrebno biti pozoren tudi na občutljivost zone radijate v prvih urah po oploditvi. Zato mora biti pretok vode v prvih urah inkubacije majhen.

OVARIJALNA TEKOČINA

Ovarijalna tekočina krapa vsebuje 0.66% mineralnih snovi in 88.34% vode. Delež aminokislin v ovarijalni tekočini je pet krat višji kot v krvni plazmi. Osmotski pritisk ovarijalne tekočine je 306 mOsm, vrednost pH je pa 8.36.

V ovarijalni tekočini krapa najdemo hidrolaze, hidrogenaze, glukozo in mlečno kislino ter ostale organske kisline. Signifikantne so spremembe v sestavi ovarijalne tekočine 24 ur po ovulaciji in to v porastu koncentracije glukoze in proteinov ter v zmanjšanju koncentracije amino kislin.

Sestava ovarijalne tekočine deluje stimulatивно na gibanje spermija.

OPLODITEV

Prehod jajčne celice iz ovarija v peritonealno votlino in potem v vodo sproži pri njej niz sprememb. Po vstopu jajčne celice v vodo ostane mikropila tri minute odprta in tako zmožna oploditve. Kontakt z vodo sproži tudi proces nabiranja vode v perivitelinskem prostoru, strjevanje zone pelucide in razvoj pojava lepljivosti.

Neposredno pred polarizacijo (že omenjeno potovanje in izginjanje germinativnega mešička) je jedro jajčne celice v fazi metafaze druge mejotične delitve. Po aktivaciji, ki jo sproži kontakt s spermijem se mejoza nadaljuje..

Fertilizacijska cona

Jajčna celica krapa na mestu vstopa spermija formira fertilizacijsko cono. V tej fazi kortikalna reakcija še ni sprožena. Glava spermija postane združena z membrano pelucido v obliki male okroglaste izbokline.

Znotraj tridesetih sekund po kontaktu oplojene jajčne celice z vodo se formira zgodnja fertilizacijska cona (5 - 10 mikrometra dolga in 3 - 4 mikrometra debela), ki je locirana na mestu vstopa spermija.

Čez nadaljnjih deset sekund se dolžina fertilizacijske cone poveča in meri 10 - 21 mikrometrov; v tej fazi okroglasti povečani vrh le-te doseže vestibulum mikropile. Opisani mehanizem podaljševanja fertilizacijske cone ni mogoče razložiti z enostavnim prekrivanjem membrane glave spermija, ker je površina glave spermija premajhna.

Po 60 sekundah razvoja se fertilizacijska cona zmanjša. Znotraj in okoli fertilizacijske cone se pojavi citoplazmina izboklina v obliki vulkana.

Lega fertilizacijske cone, ki se značajno zmanjša, je po 105-ih sekundah razvoja na vrhu vulkanu podobne izbokline. Takšna izboklina se od tega trenutka razvoja imenuje pozna fertilizacijska cona.

Čez 120 sekund sledi zvišanje pozne fertilizacijske cone, toda delci repa spermija so še vedno prisotni na vrhu pozne fertilizacijske cone.

V 150-i sekundi razvoja je pozna fertilizacijska cona v obliki male citoplazemske izbokline iz katere štrli rep spermija.

Čez tri minute je nemogoče zaslediti na slabo izraženi izboklini rep spermija, ki je že v notranjosti jajčne celice.

Aktivacija jajčne celice

Spermiji niso potrebni samo za prenos dedne snovi v jajčno celico, ampak tudi za aktivacijo jajčne celice. Proces aktivacije omogoči oplojeni jajčni celici da konča mejozno delitev in da začne s sintezo proteinov potrebnih za razvoj embrija. Pri ribah ima aktivacija jajčne celice še dodatno pomembno vlogo: v nastajanju perivitelinskega prostora.

Aktivacija jajčne celice je posledica eksplozivnega sprožanja večjih količin kalcija v citoplazmi (predvsem iz endoplazmatskega retikuluma). Pred kratkim najbolj sprejeta teorija mehanizma aktivacije je bila, da aktivacija nastopi z interakcijo med proteinoma zunanjih površin spermija in jajčne celice. Nedavne raziskave na molekularni ravni so dokazale pri nekaterih sesalcih prisotnost »faktorja sperme«, ki je topen protein. Po vstopu le – tega v jajčno celico se sproži kaskadna reakcija katera pripelje do eksplozivnega sprožanja kalcija. Obstajajo močni dokazi za obstoj »faktorja sperme« pri tilapiji. Pri ostalih ribjih vrstah in to zlasti pri tistih, ki so ekonomsko pomembne in se težko drstijo pod kontroliranimi pogoji (v to skupino ne sodi krap). Na tem področju se intenzivno delajo raziskave.

Kortikalna reakcija je ena od posledic zvišanja koncentracije kalcija v jajčni celici. Sproži se ob kontaktu oplojene jajčne celice z vodo, lahko se pa izzove tudi umetno. Val kalcija v celici sproži eksocitozo kortikalnih alveol, ki so v neposredni bližini notranje strani plazmne membrane. Kortikalne alveole svojo vsebino (kortikalne granule) sprostijo v perivitelinski prostor (med plazmamembrano in zono radijato). Tu kortikalne granule izzovejo imbibicijo vode in ionov čez zono radijata iz zunanjega okolja. Zona radijata se posledično oddalji od plazma membrane. Poveča se pritisk na plazmamembrani in zmanjša njena propustnost. Predhodno mehke jajčne celice postanejo napete in pravilne okrogle oblike. Ko se ustvari ravnovesje med povečano napetostjo cone radijate in povišanim hidrostatskim pritiskom perivitelinskega prostora (ki je posledica razlike osmotaskih pritiskov med perivitelinskim prostorom in zunanjim okoljem), jajčna celica preneha otekati. Pritisk tekočine perivitelinskega prostora, ki obkroža plazmamembrano zagotavlja zaščito embriju pred zunanjimi mehničnimi dejavniki.

Debelina perivitelinskega prostora se postopoma poveča od 0 do 0.5 mm za 12 min po kontaktu z neslano vodo in za 18 min po kontaktu s solno rastopino (150 mOsmol/kg). Oplojena jajčna celica krapa ima po tridesetih sekundah izraženo kortikalno reakcijo predvsem v področju mikropile (87.7% pri temperaturi vode od 20-22 °C). Po 60 sekundah se kortikalna reakcija razširi na celo plazmino membrano in po 3 minutah vse kortikalne alveole sprostijo svojo vsebino.

A granule nimajo encima prisotnega v kortikalnih alveolah. Kortikalne alveole so pozitivne na kislifosfatazo, toda A granule so negativne. B granule imajo za razliko od A granul nespecifično kolinesterazno aktivnost v mejni membrani.

Kortikalna reakcija v jajčnih celicah krapa vključuje tudi ultracitokemične spremembe ogljikovih hidratov na zunanji strani plazmamembrane.

Spontana kortikalna reakcija pri krapovski jajčni celici nastopi ob kontaktu z raztopinami različnih koncentracij in osmotskih pritiskov, celo ob kontaktu z raztopino, ki ima le - te vrednosti identične z ovarijalno tekočino. V ovarijalni tekočini je autoaktivacija odložena za nekaj ur, zato obstaja domneva da ovarijalna tekočina vsebuje faktor, ki preprečuje reakcijo.

Preprečevanje polispermije

Prevenција polispermije pri ribjih jajčnih celicah je lahko dosežena na več načinov:

1. z ozkim kanalom mikropile, ki onemogoča sočasen vstop večjemu številu spermijev,
2. z obstojem specializiranih struktur na mestu vstopa spermija pod mikropilo (receptorji ?),
3. s formacijo zgodnje fertilizacijske cone, ki ne dopušča drugim spermijem da vstopijo in jih odtrga od kanala mikropile,
4. s sočasnim in napredujočim razvojem perivitelinskega prostora.

Pri krapu se ne ve natančno kateri mehanizem od naštetih preprečuje polispermijo, vendar se lahko izključi prvi mehanizem, ker je notranja odprtina mikropile dovolj široka da sprejeme dva spermija sočasno (notranja odprtina je široka 5 mikrometra, glava spermija pa od 1.8 - 2.4 mikrometra).

Obrambni mehanizmi jajčne celice krapa pred škodljivimi mikroorganizmi

Sled kortikalne reakcije se zamenja zunanja plast cone radijate z usedlino eksudata kortikalnih alveol. Ekstrakti zunanje plasti cone pelucide imajo močno baktericidno delovanje na *Vibrio anguillarum* in fungicidno delovanje na *Saprolegnio parasitico*.

Vsaj del zunanje plasti cone pelucide je izgubljen v postopku kontroliranega drstenja med tretiranjem jajčnih celic s taninsko kislino. Zato se pogosto pojavlja saprolegnioza oplojenih jajčnih celic med inkubacijo.

Preživetje jajčnih celic

Post ovulacijsko preživetje jajčnih celic v ovarijah je zelo kratko (50 - 80 min). Če pri postopku kontroliranega drstenja osmukana ikra ne pride v kontakt z vodo, na zmerni in stabilni temperaturi (19-21 °C), lahko ostane sposobna oploditve 5 - 8 ur.

Spolna odprtina pri samicah krapa se pri postopku kontroliranega drstenja zašije, da se onemogoči izguba ikre pred smukanjem in da se doseže sočasna ovulacija večjega števila jajčnih celic. (Domnevni razlog za sočasno ovulacijo pri samicah z zašito spolno odprtino je v delovanju encimov ovarijalne tekočine). Zato je pomembno, da se samice pravočasno osmukajo (30 minut po prvih znakih drstenja), da ne pride do propadanja ikre v jajčnikih.