

## ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИДРОКСИПРОИЗВОДНОГО ХАЛКОНА

<sup>1</sup>Осипова А.Д., <sup>1</sup>Половинкина М.А., <sup>1</sup>Осипова В.П., <sup>1</sup>Коляда М.Н., <sup>2</sup>Великородов А.В.

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук,  
г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

<sup>2</sup>Астраханский государственный университет, г. Астрахань, Российская Федерация

**Аннотация.** В работе проведено исследование протекторных свойств нового гидроксипроизводного халкона в сравнение с водорастворимым аналогом витамина Е – тролоксом. Оценена ингибирующая активность соединений на модельной системе длительно-протекающего процесса пероксидного окисления липидов спермы сибирского осетра без и с добавкой криосреды. Установлена пролонгированная антиоксидантная активность халкона, сравнимая с действием эталонного соединения. Увеличение времени подвижности спермы в присутствии исследуемых соединений при сохранении выживаемости в 100% позволяет рассматривать гидроксипроизводное халкона в качестве потенциального криопротектора.

**Ключевые слова.** Сибирский осётр, репродуктивные клетки, антиоксидант, пероксидное окисление липидов.

## PROTECTIVE EFFECT OF THE HYDROXY DERIVATIVE OF CHALCON

<sup>1</sup>Polovinkina M.A., <sup>1</sup>Osipova A.D., <sup>1</sup>Osipova V.P., <sup>1</sup>Kolyada M.N., <sup>2</sup>Velikorodov A.V.

<sup>1</sup>Federal Research Center Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,  
Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>2</sup>Astrakhan State University, Astrakhan, Russian Federation

**Abstract.** In this work, a study of the protective properties of a new hydroxy derivative of chalcone was carried out in comparison with a water-soluble analogue of vitamin E - trolox. The inhibitory activity of the compounds was evaluated on a model system of the long-term process of lipid peroxidation in Siberian sturgeon sperm without and with the addition of a cryo-medium. The prolonged antioxidant activity of chalcone, comparable with the action of the reference compound, was established. An increase in the time of sperm motility in the presence of the compounds under study, while maintaining a survival rate of 100%, allows us to consider the hydroxy derivative of chalcone as a potential cryoprotectant.

**Keywords.** Siberian sturgeon, reproductive cells, antioxidant, lipid peroxidation.

Для удовлетворения растущего спроса на коммерчески важных рыб, к которым относятся озерные, разведения их в неволе и поддержания высококачественного маточного стада, решающее значение имеет технология криоконсервации [1]. Данный метод сохранения биоразнообразия вносит огромный вклад в аквакультуру и природоохранные мероприятия. В настоящее время достижения в репродуктивной биотехнологии обеспечивают стабильные поставки и доступность гамет для сохранения ценных видов рыб, находящихся под угрозой исчезновения, а также улучшения генетических ресурсов [2]. В то же время, до сих пор применение криоконсервированной спермы рыб ограничено из-за таких факторов, как снижение подвижности и способности к оплодотворению, нарушение эмбрионального развития, низкое выживание и качество потомства [3]. Улучшения качества криоконсервированной спермы можно достичь путем изменения протоколов криоконсервации и добавления соединений, защищающих репродуктивные клетки во время замораживания и оттаивания [4].

Известно, что во время криоконсервации вырабатываются активные кислородные метаболиты, способствующие развитию пероксидного окисления липидов (ПОЛ), что, в свою очередь приводит к снижению подвижности, жизнеспособности, целостности мембраны, функциональности акросом, антиоксидантного статуса и/или фертильности дефростированной спермы [5]. Кроме того, ранее было установлено, что замороженные-дефростированные сперматозоиды имеют пониженный уровень эндогенных антиоксидантов [6]. В связи с этим, применение эффективных антиоксидантов в качестве

криопротекторных добавок является вполне обоснованным и актуальным направлением криоконсервации репродуктивных клеток гидробионтов.

Ранее нами были получены новые гидроксипроизводные халконов и показана их антиоксидантная активность в опытах *in vitro* [7]. Была установлена высокая ингибирующая активность производного халкона с пространственно-экранированным фенольным фрагментом – метил N-(4-((E)-3-[3,5-ди(*трет*-бутил)-4-гидроксифенил]-2-пропеноил)фенил)карбамата (**1**), поэтому в работе исследовано протекторное действие данного соединения в сравнении с водорастворимым аналогом витамина E – тролоксом (**2**) на показатели активности спермы осетровых.

Материалом для исследования является сперма сибирского осетра (*Acipenser baeri*), полученная методом отцеживания после гипофизарных инъекций в период нерестовой кампании 2022 г. Тестируемые соединения добавлены в сперму в концентрации 0,1 мМ. Сперма была разбавлена модифицированной криосредой Штайна (130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 20 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 мМ глюкоза, 12,5 % яичного желтка, 12,5 % ДМСО) [8] в соотношении 1:1, разлита в промаркированные пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл и помещена в холодильник на 40 мин для эквilibрации [9]. Оценка качества спермы проведена под микроскопом по 5-ти балльной шкале Г.М. Персова (1953) [10] после эквilibрации. В работе использована только сперма высокого качества (4-5 баллов).

Интенсивность длительно протекающего ПОЛ нативной спермы и с криосредой определена по накоплению вторичных карбонильных продуктов, дающих окрашенные комплексы с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) по стандартной методике [11]. Рассчитана эффективность антиоксидантного действия (ЭД) соединений по формуле:  $ЭД = [(C_0 - C_1) / C_0] \times 100\%$ , где C<sub>0</sub> - концентрация ТБК-АП в сперме без добавки соединений (контроль), C<sub>1</sub> - концентрация ТБК-АП в сперме, содержащей исследуемое соединение. Положительное значение показателя ЭД свидетельствует о проявлении веществом антиоксидантного действия.

Установлено пролонгированное антиоксидантное действие соединений **1** и **2** как при добавлении к нативной сперме (**#**), так и совместно с криосредой (**\***) (рис. 1).

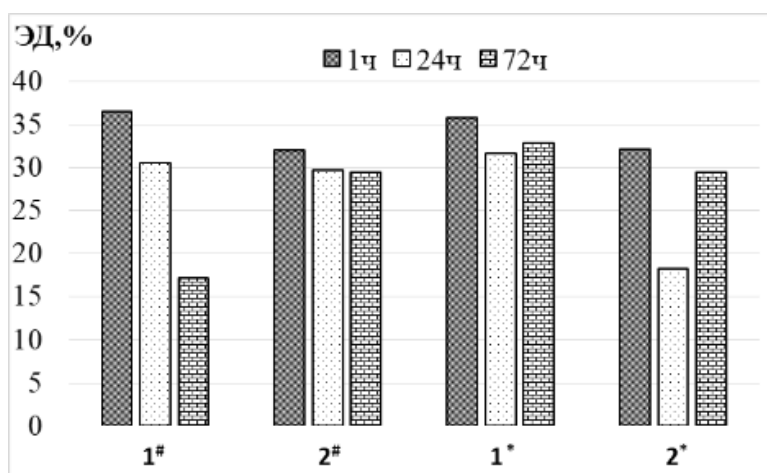


Рисунок 1 - Эффективность действия (ЭД, %) гидроксипроизводного халкона **1** и тролокса **2** при инкубировании с нативной спермой сибирского осетра – **1#** и **2#** и совместно с добавкой криосреды Штайна – **1\*** и **2\***.

На начальном этапе ПОЛ нативной спермы и с добавкой криосреды наибольшее антиоксидантное действие характерно для гидроксипроизводного халкона **1**. В присутствии криосреды ЭД халкона сохраняется в течение 72 ч, однако, при инкубировании спермы без криосреды, на отдаленном этапе ПОЛ его ЭД снижается в 2 раза. Для тролокса характерно лишь незначительное снижение ЭД в процессе ПОЛ нативной спермы, а в присутствии криосреды Штайна ЭД через 24 ч снижается почти в 2 раза, но на последующем этапе (72 ч) его эффективность восстанавливается. Таким образом, ингибирующая активность гидроксипроизводного халкона на среднем этапе процесса ПОЛ спермы сибирского осетра в присутствии криосреды Штайна значительно превышает эффективность действия реперного антиоксиданта тролокса.

Далее в работе исследовано влияние добавок соединений **1** и **2** на показатели активности половых клеток сибирского осетра (время движения и процент спермиев с поступательным движением) после этапа эквilibрации. В присутствии исследуемых соединений, как и в контрольном варианте без добавок, все спермии осуществляют поступательные движения. Важно отметить, что в присутствии криосреды время движения спермы увеличивается на 32 с, в сравнении со временем движения

нативной спермы, и составляет 385 с. Добавление потенциальных криопротекторов **1** и **2** способствует увеличению времени подвижности гамет до 423 и 425 с, соответственно.

Таким образом, исследована возможность использования в качестве протекторной добавки в базовую криосреду Штайна нового гидроксипроизводного халкона. На модельной системе длительно-протекающего процесса пероксидного окисления липидов спермы сибирского осетра без и с добавкой криосреды проведена оценка ингибирующей активности халкона в сравнении с водорастворимым аналогом витамина Е – тролоксом и показана их пролонгированная антиоксидантная активность. Изучено влияние данных соединений на показатели активности спермы сибирского осетра после этапа эквilibрации и установлено увеличение времени подвижности в присутствии тролокса и халкона. Полученные результаты позволяют рекомендовать N-(4-{{(E)-3-[3,5-ди(трет-бутил)-4-гидроксифенил]-2-пропеноил}фенил)карбамат для дальнейшего исследования в качестве протекторной добавки в базовую криосреду Штайна при низкотемпературной консервации спермиев осетровых рыб.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Dhanasekar K., Selvakumar N, Munuswamy N. Cryopreservation of sperm in cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) // *Aquaculture*, 2022. – No.557. – P. 738313.
2. Tiersch T.R. Process pathways for cryopreservation research application and commercialization. In: Green, C.C. (Ed.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 2011. –646–671 p.
3. Perez-Cerezales S., Gutierrez-Adan A., Martínez-Paramo S., Beirao J., Herraез M.P. Altered gene transcription and telomere length in trout embryo and larvae obtained with DNA cryodamaged sperm // *Theriogenology*, 2011. – No.76 (7). – P. 1234–1245. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.028>.
4. Martinez-Paramo S., Diogo P., Dinis M.T., Herra ´ez M.P., Sarasquete C., Cabrita E. Incorporation of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm // *Theriogenology*, 2012. – No.77. – P. 1129–1136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.017>.
5. Bansal A.K., Bilaspuri G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions // *Vet. Med. Inter.*, 2011. – No.7. – P. 686137. <https://doi.org/10.4061/2011/686137>.
6. Lasso J.L., Noiles E.E., Alvarez J.G., Storey B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation // *J. Androl.* 1994. – No.15. – P. 255–265. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.1994.TB00444.X>.
7. Osipova V.P., Polovinkina M.A., Telekova L.R., Velikorodov A.V., Stepkina N.N., Berberova N.T. Synthesis and antioxidant activity of new hydroxyl derivatives of chalcones // *Russian Chemical Bulletin*, 2020. – No.69 (3). – P. 504-509. <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2790-y>.
8. Ponomareva E.N., Bogatyreva M.M., Antonova N.A., Osipova V.P. Optimization of process of sturgeon sperm cryoconservation for using the different me- dium // *Proc. Samara Sci. Cent. RAS*, 2009. – No.11(2). – P. 132-134.
9. Kopeika E.F., Belous A.M., Pushkar N.C. Cryoconservation of Fish Sperm, Cryoconservation of Cells&apos; Suspension // *Naukova Dumka*, Kiev, 1981.
10. Персов Г.М. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток осетровых // *Доклады АН СССР*, 1953. – Т. 90. – № 6. – С. 1183-1185.
11. Строев Е.А., Макарова В.Г., Матвеева И.В., Практикум по биологической химии: Учебное пособие, Медицинское информационное агентство, Москва. 2012.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №22-16-00095.