

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ КОНСЕРВИРОВАНИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК ОСЕТРОВЫХ РЫБ

¹Осипова В.П., ¹Коляда М.Н.

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

Аннотация. В работе представлены результаты исследования криопротекторной активности антиоксидантов нового поколения – гибридных мультифункциональных фенольных производных при низкотемпературной консервации репродуктивных клеток осетровых рыб. Показано, что добавка в базовую модифицированную криозащитную среду Штайна фосфорсодержащего стерически затрудненного фенола, пирролидиновых и тиацетамидных фенольных производных, позволяет повысить низкую криорезистентность спермиев осетровых: снижается уровень перекисидации липидов, улучшаются показатели подвижности клеток, повышается фертильность дефростированной спермы. Эффективность криопротекторного действия новых антиоксидантов, способных воздействовать на разные этапы и звенья окислительного криостресса, превышает активность известных антиоксидантов (ионол и тролокс).

Ключевые слова. Осетровые, репродуктивные клетки, криоконсервация, антиоксидант, перексидное окисление липидов.

APPLICATION OF NEW GENERATION ANTIOXIDANTS AS CRYOPROTECTORS IN LOW-TEMPERATURE PRESERVATION OF STURGEON REPRODUCTIVE CELLS

¹Osipova V.P., ¹Kolyada M.N.

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

Abstract. The paper presents the results of a study of the cryoprotective activity of a new generation of antioxidants – hybrid multifunctional phenolic derivatives during low-temperature preservation of sturgeon reproductive cells. It has been shown that the addition of phosphorus-containing sterically hindered phenol, pyrrolidine and thioacetamide phenolic derivatives to the basic modified Stein cryoprotective medium, makes it possible to increase the low cryoresistance of sturgeon sperm: the level of lipid peroxidation decreases, cell motility improves, and the fertility of defrosted sperm increases. The effectiveness of the cryoprotective action of new antioxidants that can affect different stages and links of oxidative cryostress exceeds the activity of known antioxidants (Ionol and Trolox).

Keywords. Sturgeon, reproductive cells, cryopreservation, antioxidant, lipid peroxidation.

Актуальным направлением в аквакультуре и в стратегии сохранения генетического биоразнообразия одного из старейших существующих семейств рыб – осетровых, находящихся под угрозой исчезновения, является криоконсервирование спермиев рыб. Несмотря на очевидные преимущества применения данного метода и длительную историю экспериментальных исследований [1], существующие технологии все еще недостаточно эффективны для рутинного применения и по-прежнему остаются, главным образом, экспериментальными разработками [2]. Низкая криорезистентность осетровых [3] обуславливает значительные повреждения репродуктивных клеток при криоконсервации, снижение фертильности дефростированной спермы.

В настоящее время установлено, что в основе деструктивного действия глубокого замораживания, помимо механического разрушения мембран, лежит внутриклеточная генерация активированных кислородных метаболитов (АКМ) [4]. Развивается окислительный стресс – состояние дисбаланса между образованием и утилизацией АКМ, что приводит к окислительному повреждению важных биомолекул, в том числе к перексидному окислению липидов [5], вызывает патологию сперматозоидов. Учитывая, что сперма рыб чувствительна к повреждению АКМ из-за высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидной структуре клеточных мембран [6], перспективным подходом к оптимизации методов криоконсервирования половых клеток гидробионтов

является добавление в базовые защитные среды соединений с антиоксидантной активностью. Для повышения криоустойчивости репродуктивных клеток осетровых исследовалась возможность применения таких известных антиоксидантов как аскорбиновая кислота, глутатион, производное серосодержащей аминокислоты цистеина, N-ацетилцистеин, ионол ((2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол), тролокс (водорастворимый аналог витамина E), лизин, глутамин, таурин, антиоксидантный фермент каталаза, а также композиции с антиоксидантным действием, например, аскорбиновая кислота с глутатионом или каталазой [7-9]. Однако, на сегодняшний день, проблема повышения криорезистентности спермиев рыб далека от разрешения.

В последнее время, кроме известных антиоксидантов при криоконсервации спермы осетровых изучались криопротекторные свойства новых гибридных мультифункциональных антиоксидантов, например, производных алкилированных фенолов, которые более эффективны, чем известные антиоксиданты, благодаря способности взаимодействовать с АКМ на различных стадиях окислительного процесса. Так, ранее нами для сперматозоидов белуги (*Huso huso Linnaeus*, 1758), русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii Brandt et Ratzeburg*, 1833) и севрюги (*Acipenser stellatus Pallas*, 1771) обнаружена криопротекторная активность 3,5-ди-*трет*-бутил-4 гидроксифенилметилendifосфоновой кислоты превышающая активность ионола и тролокса [10, 11].

Было показано, что добавка к сперме осетровых фосфорсодержащего стерически-затрудненного фенола в концентрации 0.1 мМ в присутствии модифицированной среды Штайна [12] значительно снижает уровень накопления вторичных продуктов перексидного окисления липидов спермы осетровых, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, увеличивает время подвижности и процент спермиев с поступательным движением, повышает фертильность спермиев. Для спермиев белуги установлена большая эффективность криопротекторного действия данного соединения по сравнению с половыми клетками русского осетра и севрюги [11]. Данный результат может быть связан с различиями в жирно-кислотном профиле липидов спермы различных видов осетровых [13], в активности природных антиоксидантных ферментов в сперме [4] и количестве митохондрий в половых клетках [14]. Обнаружена достоверная ($p < 0.001$) положительная корреляция ($r = 0.99$) между фертильностью спермиев исследуемых видов осетровых и процентом сперматозоидов с поступательным движением, значительная ($p < 0.001$) отрицательная корреляция между уровнем ПОЛ в спермиях осетровых и процентом сперматозоидов с поступательным движением ($r = -0.86$) и фертильностью ($r = -0.80$) спермиев осетровых рыб.

Повышение криорезистентности спермиев русского осетра установлено и при использовании синтетических фенольных соединений, содержащих как пирролидиновый [15], так и *орто*-тиоацетамидный фрагменты [16], при применении которых не только повышается подвижность спермиев рыб, но и снижается уровень перексидации липидов биомембран спермиев. Важно, что для тиоацетамидного фенольного производного также обнаружена антирадикальная активность в отношении супероксид анион-радикала – первоначальной реактивной формы кислорода, что свидетельствует о превентивной способности данного соединения в отношении радикальных окислительных процессов.

Таким образом, во всех исследованиях протекторной активности новых гибридных мультифункциональных антиоксидантов при криоконсервации спермиев осетровых установлена высокая эффективность их криопротекторного действия, превышающая активность таких известных фенольных антиоксидантов, как ионол и тролокс. Исходя из этого, можно заключить, что добавка антиоксидантов нового поколения в базовые криозащитные среды позволяет повысить резистентность спермиев осетровых к окислительному стрессу при низкотемпературной консервации, добиться значительного улучшения показателей качества дефростированной спермы рыб, которую можно использовать на рыбоводных предприятиях, для создания криобанков, сохраняющих генофонд ценного реликтового семейства рыб.

Список использованных источников

1. Sarasquete E.C., Martinez-Paramo S., Robles V., Beirao J., Perez- Cerezales S., Herraes M.P. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives // J. Appl. Ichthyol., 2010. – No.26. – P. 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>.
2. Исаев Д.А., Шафеи Р.А. Криоконсервация спермы осетровых рыб: текущее состояние и перспективы // Рыбоводство и рыбное хозяйство, 2016. – Т. 51, № 11. – С. 65 – 73.
3. Земков Г.В., Акимочкина Т.И. Цитоморфологические и функциональные изменения спермиев русского осетра (*Acipenser güldenshtädti* B.) после криоконсервации // Цитология, 2009. – № 11. – С. 945–952.
4. Shaliutina A., Hulak M., Gazo I., Linhartova P., Linhart O. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser*

baerii) sturgeon sperm // Anim. Reprod. Sci., 2013. – No.14. – P. 127–135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.00.6>.

5. Cabrita E., Martínez-Páramo S., Gavaia P.J., Riesco M.F., Valcarce D.G., Sarasquete C., Herráez M.P., Robles V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis // Aquaculture, 2014. – No. 432. – P. 389–440. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>.

6. Figueroa E., Lee-Estevez M., Valdebenito I., Watanabe I., Oliveira R.P.S., Romero J., Farías J.G. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish // Aquaculture, 2019. – No.511. – P. 634190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.004>.

7. Sandoval-Vargas L., Silva Jiménez M., González J. Risopatrón, Villalobos E.F., Cabrita E., Valdebenito Isler I., Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation // Reviews in Aquaculture, 2020. – P. 1–23. <https://doi.org/10.1111/raq.12479>.

8. Kovalev K., Dokina O., Pronina N., Balashov D., Krasilnikova A. Use of 2-aminoethanesulfonic acid (taurine) for cryopreservation and storage of Siberian sturgeon sperm, in: E3S Web Conf. 273, (2021) XIV International Scientific and Practical Conference “State and Prospects for the Development of Agribusiness - INTERAGROMASH 2021”, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202127303010>.

9. Li P., Xi M.D., Du H., Qiao X.M., Liu Z.G., Wei Q.W. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoan function in three sturgeon species // Reprod. Domest. Anim., 2018. – No.53 (2). – P. 287–295. <https://doi.org/10.1111/rda.13103>.

10. Osipova V.P., Kolyada M.N., Berberova N.T., Milaeva E.R., Ponomareva E.N., Belaya M.M. Cryoprotective effect of phosphorous-containing phenolic anti-oxidant for the cryopreservation of beluga sperm // Cryobiology, 2014. – No.69. – P.467–472. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.007>.

11. Kolyada M.N., Osipova V.P., Berberova N.T., Milaeva E.R., Ponomareva E.N., Belaya M.M. Cryoprotective activity of phosphorus-containing phenol // Cryobiology, 2020. – No.96. – P.61–67 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.002>.

12. Ponomareva E.N., Bogatyreva M.M., Antonova N.A., Osipova V.P. Optimization of process of sturgeon sperm cryoconservation for using the different medium // Proc. Samara Sci. Cent. RAS, 2009. – No.11(2). – P. 132-134.

13. Kowalski R.K., Cejko B.I. Sperm quality in fish: determinants and affecting factors // Theriogenology, 2019. – No.135. – P.94–108. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009>.

14. Psenicka M., Alavi S.M.H., Rodina M., Cicova Z., Gela D., Cosson J., Nebesarova J., Linhart O. Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and starlet (*Acipenser ruthenus*) // J. Appl. Ichthyol., 2008. – No.24. – P. 371–377. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01139.x>.

15. Osipova V.P., Berberova N.T., Gazzaeva R.A., Kudryavtsev K.V. Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm // Cryobiology, 2016. – No.72. –P. 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.006>.

16. Осипова В. П., Антонова Н. А., Кудрявцев К. В., Берберова Н.Т. Исследование амидов 2-(2-гидроксифенилтио)уксусной кислоты в качестве протекторов базовых сред криоконсервации спермы осетровых рыб // Материалы Международной междисциплинарной науч.конф. «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», 2013, с.35-36.

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