

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК РЫБ ПРИ СВЕРХВЫСОКИХ СКОРОСТЯХ ОХЛАЖДЕНИЯ

А.А. Красильникова

Анотация. Объект исследования – сперматозоиды осетровых видов рыб (русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833, сибирского осетра ленской популяции *Acipenser baerii* Brandt, 1869), полученные в период нерестовой кампании на осетровом рыбноводном заводе. Цель работы – исследование возможности криоконсервации репродуктивных клеток рыб при сверхвысоких скоростях охлаждения. Результаты проведенных экспериментов показали возможность и перспективность применения сверхвысоких скоростей охлаждения, что позволило снизить концентрацию криопротекторов в криозащитных средах, будет влиять на снижение токсичности криозащитных веществ на клетки и повысит выживаемость после замораживания-отогрева.

Ключевые слова: репродуктивные клетки рыб, криоконсервация.

В современном мире очень остро стоит проблема сохранения биологического разнообразия. Критическая ситуация сложилась с осетровыми рыбами, традиционно являвшимися наиболее ценными объектами промысла в бассейнах южных морей России. В настоящее время природные популяции всех проходных осетровых рыб – белуги, севрюги и осетра – не только полностью утратили промысловое значение, а фактически поставлены на грань исчезновения. Решение настоящей проблемы возможно путем длительного сохранения генетической информации. В данном случае безальтернативным является метод криоконсервации репродуктивных клеток [Матишов и др., 2013].

Оптимизация методов подготовки клеток и тканей к низкотемпературному консервированию идет путем применения комбинированных методик, доработки существующих подходов и технологий, а также через поиск нестандартных приемов перевода клеток в состояние анабиоза [Пономарева и др., 2016; Пономарева и др., 2017а; Белая и др., 2018]. Такой подход открывает новые возможности и перспективы сохранения биологического материала как для разработки фундаментальных основ, так и для практического применения в целях воспроизводства [Пономарева и др., 2012; Пономарева и др., 2017б; Красильникова, Тихомиров, 2018; Белая, Красильникова, 2019].

При замораживании семенной жидкости рыб обычно принято применять многоступенчатые режимы с использованием программируемого замораживателя [Тихомиров и др., 2011; Красильникова, Тихомиров, 2014; Красильникова, Тихомиров, 2015]. При этом на разных этапах устанавливаются скорости в определенных интервалах температур.

В последнее время уделяется внимание замораживанию с применением метода витрификации. Витрификация – это процесс, при котором во время охлаждения жидкость приобретает большинство свойств твердого вещества без существенного изменения в расположении молекул. Характерная особенность – отсутствует кристаллизация с сопутствующим ей выделением тепла и увеличением объема, т.е. образуется монокристалл. Ее теоретические основы с использованием сложных математических расчетов были разработаны в 1930-е гг. Б. Льюетом [Luyet, Hodapp, 1938], который описал возможность сохранения в неповрежденном состоянии микроорганизмов и незакаленных клеток при сверхбыстром охлаждении в жидких газах и последующем столь же быстром отогреве. Согласно теории, при быстром снижении температуры (т.е. мгновенном размещении образца в жидком азоте) и очень высоких концентрациях криозащитных веществ в среде весь образец переходит в стекловидное состояние, исключается фаза кристаллизации. Температура стеклования растворов криопротекторов, использующихся в современной криобиологии, имеет диапазон от $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-178\text{ }^{\circ}\text{C}$ [Миксон и др., 2009]. Некоторое время этот метод не пользовался популярностью, однако сейчас он не менее актуален, чем программное замораживание [Cuevas-Uribe at al., 2017; Kása at al., 2017; Xin at al., 2017].

В последние годы увеличилось количество научных исследований по разработке технологии витрификации суспензии спермиев без использования криопротекторов. Применение метода витрификации позволяет устранить повреждение клеток при замораживании кристаллами льда. Кроме того, это может позволить исключить из процесса глубокого охлаждения использование токсичных криопротекторов либо значительно уменьшить их концентрации.

В связи с вышеизложенным является актуальным апробирование нестандартных способов подготовки спермы рыб к замораживанию. Целью настоящей работы явилось исследование возможности замораживания репродуктивных клеток самцов рыб при сверхвысоких скоростях охлаждения на сетках в виде тонких пленок и подбор параметров обезвоживания мазка спермы перед замораживанием.

В настоящей работе впервые предложено нанесение смеси репродуктивных клеток для замораживания на сетки для получения тонкопленочной структуры и проанализирована возможность замораживания обезвоженных репродуктивных клеток рыб.

Объектом исследования являлись сперматозоиды русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) и сибирского осетра ленской популяции (*Acipenser baerii* Brandt, 1869), полученные в период нерестовой кампании на осетровом рыболовном заводе.

Для образования тонкопленочной структуры были взяты сетки, изготовленные из разных материалов, – алюминия и полимерного стекловолокна с покрытием ПВХ.

Соотношение спермы и криозащитной среды составляло 1:1. Сетки погружали в смесь спермы и криозащитного раствора и помещали в жидкий азот. Отогрев образцов проводили при температуре +25 °С. За выходной показатель принималось время жизни сперматозоидов после размораживания.

В другой экспериментальной серии каплю семенной жидкости сибирского осетра ленской популяции помещали на органическое стекло и делали мазок, который затем подвергали высушиванию в сушильном шкафу при разных температурах: +20 °С, +27 °С и +35 °С, отмечая время высыхания. Далее сперматозоиды активировали водой для анализа времени подвижности. Затем пластины замораживали при сверхвысоких скоростях без использования криопротекторов.

Были исследованы репродуктивные клетки от десяти самцов в каждой экспериментальной серии. Эксперименты проводились с трехкратным повторением.

Результаты эксперимента обрабатывались с применением общепринятых методов биологической статистики [Ивантер, Коросов, 2011] с помощью компьютерной программы Excel.

В процессе криоконсервации при медленном снижении температуры, вызывающем переохладение, происходит сильное обезвоживание клеток и увеличение концентрации внутриклеточных веществ, приводящее к денатурации белков и повреждению мембран. Клетки разрушаются вследствие контакта с гиперконцентрированной средой электролитов, в которой могут происходить резкие изменения рН и ионной силы среды. Мембраны клеток также могут повреждаться по причине достижения клеткой минимального объема. Такие повреждения могут усугубляться рекристаллизационными

процессами при медленном оттаивании и при охлаждении объектов с малыми скоростями до $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Итак, проводились работы по замораживанию с применением сверхбыстрых скоростей охлаждения.

Первая часть экспериментальных работ была посвящена изучению тонкопленочной витрификации. Результаты экспериментальной серии представлены на рисунке 1.

Время подвижности отогретых сперматозоидов показало эффективность применения данного способа подготовки клеток к низкотемпературному консервированию. Время активности во всех опытных образцах составило больше 10 мин., что свидетельствует о пригодности спермы для рыбоводных целей, т.к. нормативное время оплодотворения для осетровых рыб при искусственном воспроизводстве составляет 3 мин.

При использовании сеток из полимерного стекловолокна время подвижности сперматозоидов оказалось наибольшим и составило $18,7 \pm 1,9$ мин. у русского осетра, $25,9 \pm 1,9$ мин. у сибирского осетра ленской популяции. При применении алюминиевых сеток продолжительность подвижности у сперматозоидов русского осетра снизилась в 1,5 раза ($12,9 \pm 1,9$ мин.), у сперматозоидов сибирского осетра ленской популяции – в 1,3 раза ($20,3 \pm 1,8$ мин.). Однако статистически значимых различий между использованием двух типов сеток не было выявлено ни у одного вида.

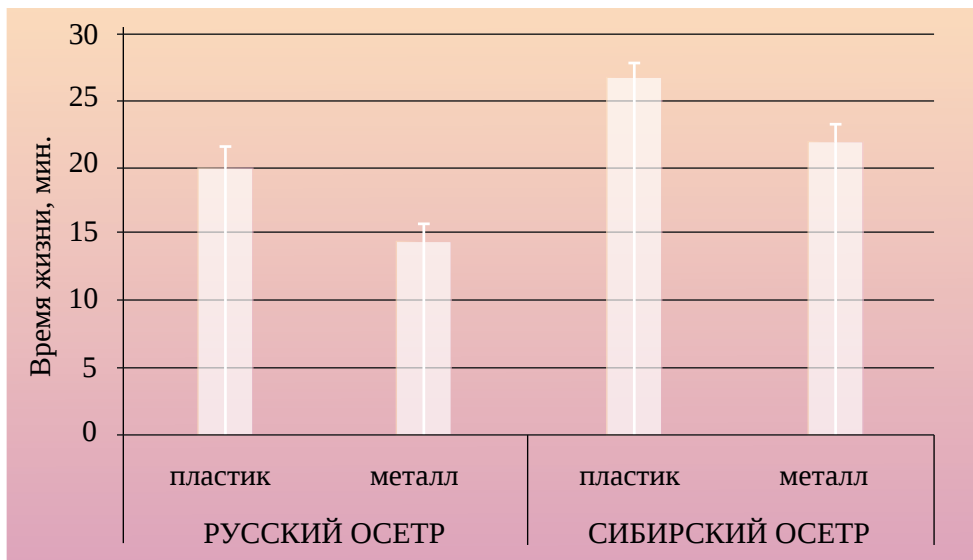


Рис. 1. Время подвижности сперматозоидов осетровых рыб при тонкослойной витрификации

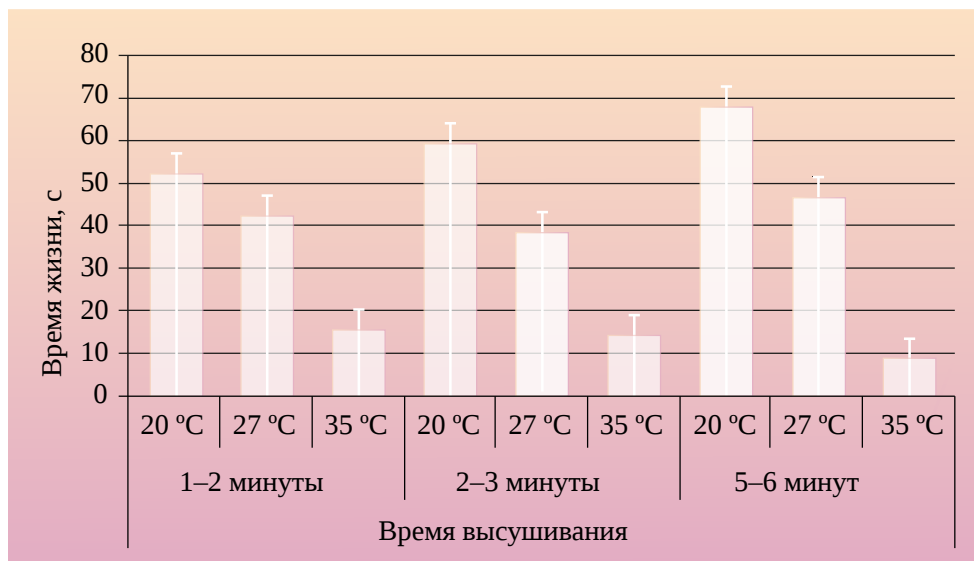


Рис. 2. Зависимость времени подвижности сперматозоидов сибирского осетра ленской популяции от температуры и времени высушивания

Использование алюминиевых образцов оказалось менее удобным, смесь спермы и криозащитной среды взбивалась в пену жесткими волокнами сетки, что значительно осложняло работу.

Во второй части экспериментов необходимо было получить стадию подготовки клеток, при которой были бы удалены излишки воды для исключения вероятности внутриклеточной кристаллизации, но в тот же момент не допустить избыточного обезвоживания, которое может привести к повреждению и гибели клеток. Результаты представлены на рисунке 2.

При анализе полученных результатов наблюдалась следующая закономерность – при снижении температуры высушивания увеличивалось количество и время подвижности живых клеток при активации. Наилучшее время движения сперматозоидов наблюдалось при высушивании в течение 5–6 мин. при температуре +20 °C.

Установив оптимальные параметры высушивания, мазки спермы на органическом стекле замораживали без криозащитных веществ при сверхвысоких скоростях – мгновенным погружением в жидкий азот. Руководствовались предположением, что при замораживании с применением техники высушивания отпадает необходимость связывания внутриклеточной жидкости и предотвращения таким образом кристаллизации. Также отказ от криозащитных компонентов обусловлен снижением токсичного воздействия на сперматозоиды.

После отогрева и активации колебательные движения совершали 20 % сперматозоидов. Видимо, основная масса клеток подверглась структурным повреждениям, вызванным предварительным обезвоживанием (дегидратацией). В связи с тем, что криоконсервирование производилось после процедуры термического воздействия и без применения криозащитных веществ, большая масса клеток не смогла выжить при действии низких температур. Безусловно, данный прием для подготовки клеток к криоконсервированию требует более глубокого изучения и доработки, однако факт получения определенного процента подвижных сперматозоидов говорит о возможности применения данного метода, дополнительно подтверждая феномен выживания наиболее криорезистентных клеток при селективном действии низких температур.

Возможность эффективно остановить процессы естественного распада и деградации клеток с последующим их длительным хранением в биостабилизированном состоянии является необходимым элементом технологии криоконсервации. В случае ступенчатого замораживания для каждого типа клеток и тканей необходимы собственные алгоритмы (программы) замораживания, которые зачастую довольно сложны и требуют дорогостоящих программных замораживателей. Явление витрификации является альтернативным подходом к замораживанию биологического материала. Согласно теоретическим положениям, при очень высоких концентрациях криопротекторов в среде и быстром снижении температуры (т.е. практически мгновенном погружении носителя в жидкий азот) весь образец переходит в стекловидное состояние, минуя фазу кристаллизации. Это позволяет открыть новые направления развития исследований в области криоконсервации репродуктивных клеток рыб и обеспечить усовершенствование известных ранее технологий.

Результаты проведенных экспериментов показали возможность и перспективность применения альтернативных методов подготовки сперматозоидов рыб к криоконсервации. Применение сверхвысоких скоростей охлаждения поможет снизить концентрацию криопротекторов в криозащитных средах, что будет влиять на снижение токсичности криозащитных веществ на клетки и повысит выживаемость после замораживания-отогрева.

Публикация подготовлена в рамках реализации государственного задания ЮНЦ РАН, № ГР проекта 01201354245, с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов ЮНЦ РАН № 73602.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белая М.М., Красильникова А.А. Влияние скорости замораживания на рыболовные качества спермы осетровых рыб // Вестник Астраханского государственного технического университета. Сер.: Рыбное хозяйство. 2019. № 1. С. 83–90.

Белая М.М., Красильникова А.А., Пономарева Е.Н. Разработки Южного научного центра РАН в области криоконсервации репродуктивных клеток рыб // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2018. Т. 20. № 5–2. С. 280–286.

Ивантер Э.В., Коросов А.В. Введение в количественную биологию: учеб. пособие. Петрозаводск: Изд-во Петр-ГУ, 2011. 302 с.

Красильникова А.А., Тихомиров А.М. Корреляция объемов эндоцеллюлярного протектора в криозащитных средах и внутриклеточной жидкости сперматозоидов осетровых рыб // Естественные науки. 2015. № 3 (52). С. 105–111.

Красильникова А.А., Тихомиров А.М. Объем замораживаемого образца как один из факторов выживаемости сперматозоидов осетровых видов рыб при криоконсервации // Естественные науки. 2014. № 2. С. 62–69.

Красильникова А.А., Тихомиров А.М. Получение жизнеспособной молоди русского осетра с применением криоконсервированной спермы и оценка поведенческих реакций криопотомства // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 4. С. 762–768.

Матишов Г.Г., Пономарев С.В., Баканева Ю.М., Болонина Н.В., Грозеску Ю.Н., Коза А.А., Распопов В.М., Пономарева Е.Н., Федоровых Ю.В., Лагуткина Л.Ю., Белая М.М., Бахарева А.А., Красильникова А.А. Справочник рыбовода. Инновационные технологии аквакультуры Юга России / под ред. С.В. Пономарева. Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. 224 с.

Миксон К.Б., Копейка Е.Ф., Линник Т.П. Условия витрификации эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis*) в криозащитных средах // Проблемы криобиологии. Т. 19. 2009. № 2. С. 154–162.

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.

Пономарева Е.Н., Красильникова А.А., Фирсова А.В., Белая М.М. Криоконсервация репродуктивных клеток рыб: история и перспективы // Рыбное хозяйство. 2017а. № 4. С. 85–88.

Пономарева Е.Н., Неваленный А.Н., Белая М.М., Красильникова А.А. Использование криоконсервированной спермы для формирования маточного стада стерляди // Вестник Астраханского государственного технического университета. Сер.: Рыбное хозяйство. 2017б. № 4. С. 118–127.

Пономарева Е.Н., Тихомиров А.М., Богатырева М.М., Красильникова А.А. Криоконсервация репродуктивного материала рыб: разработки Южного научного центра Российской академии наук // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона. Мат-лы VII Междунар. конф. Т. 2. Керчь, 2012. С. 55–58.

Тихомиров А.М., Богатырева М.М., Красильникова А.А. Разработка криозащитных сред для низкотемпературного консервирования сперматозоидов белорыбицы (*Stenodus leucichthys* Gldenstdti, 1772) в целях сохранения генофонда // Вестник Астраханского государственного технического университета. Сер.: Рыбное хозяйство. 2011. № 1. С. 58–62.

Cuevas-Uribe R., Hu E., Daniels H., Gill A., Tiersch T. Vitrification as an alternative approach for sperm cryopreservation in marine fishes // North American journal of aquaculture. 2017. Vol. 79. P. 187–196.

Kása E., Bernáth G., Kollár T., Žarski D., Lujić J., Marinović Z., Bokor Z., Hegyi A., Béla Urbányi B., Vílchez M., Morini M., Peñaranda D., Pérez L., Asturiano J., Horváth Á. Development of sperm vitrification protocols for freshwater fish (Eurasian perch, *Perca fluviatilis*) and marine fish (European eel, *Anguilla anguilla*) // General and Comparative Endocrinology. 2017. Vol. 245. P. 102–107.

Luyet B.J., Hodapp E.L. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1938. Vol. 39. P. 433–434.

Xin M., Siddique M.A.M., Dzyuba B., Cuevas-Uribe R., Shaliutina-Kolesova A., Linhart O. Progress and challenges of fish sperm vitrification: a mini review // Theriogenology. 2017. Vol. 98. P. 16–22.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Красильникова Александра Андриановна – к.б.н., с.н.с. лаб. водных биоресурсов и аквакультуры ЮНЦ РАН; aqua-group@yandex.ru