

ТОВАРНАЯ АКВАКУЛЬТУРА И ИСКУССТВЕННОЕ ВОСПРОИЗВОДСТВО ГИДРОБИОНТОВ

COMMODITY AQUACULTURE AND ARTIFICIAL REPRODUCTION OF HYDROBIONTS

Научная статья
УДК 639.3.041.2+543.94+542.978
<https://doi.org/10.24143/2073-5529-2024-4-39-46>
EDN JFOIZO

Влияние пирролидиновых производных 2,6-ди-*трет*-бутилфенола на супероксид- и пероксид водорода-утилизирующую активность спермы сибирского осетра

А. Д. Колумбет^{1✉}, М. А. Половинкина²,
М. Н. Коляда³, В. П. Осипова⁴, Е. Н. Пономарева⁵, К. В. Кудрявцев⁶

¹⁻⁴Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук,
Ростов-на-Дону, Россия, osipova_nd95@mail.ru

^{1,5}Астраханский государственный технический университет,
Астрахань, Россия

⁶Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена,
Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Исследовано влияние производных (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-пирролидин-2-карбоновой кислоты на способность спермы сибирского осетра (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) утилизировать сгенерированный в модельной системе окисления адреналина в щелочной среде супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), а также экзогенный пероксид водорода (H_2O_2) до и после замораживания при температуре жидкого азота в течение 3 суток. Изучение данной активности фенольных производных проводилось в сравнении с реперным антиоксидантом тролоксом – водорастворимым аналогом витамина Е. При внесении фенольных производных в концентрации 0,1 ммоль в базовую криосреду Штайна, содержащую 12,5 % яичного желтка, 12,5 % диметилсульфоксида, 5 ммоль KCl, 130 ммоль NaCl, 20 ммоль $NaHCO_3$ и 5,5 ммоль глюкозы, установлено разнонаправленное влияние соединений на способность спермы сибирского осетра утилизировать супероксидный анион-радикал и пероксид водорода до и после процесса замораживания-дефростации. Исследуемые соединения повышают H_2O_2 -утилизирующую активность репродуктивных клеток, при этом снижают их супероксид-утилизирующую активность. Для пирролидиновых производных фенола установлена большая эффективность стимулирования H_2O_2 -утилизирующей активности дефростированной спермы сибирского осетра по сравнению с тролоксом. Обнаружено снижение скорости утилизации $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 спермой рыб после криоконсервации в контроле и в присутствии производных (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-пирролидин-2-карбоновой кислоты. Показано протекторное действие новых фенольных производных на ферментативное звено антиоксидантной защиты спермы сибирского осетра при криоконсервации. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований протекторной активности производных (3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-пирролидин-2-карбоновой кислоты в процессе криосохранения репродуктивных клеток редких, исчезающих и хозяйственно-ценных видов рыб.

Ключевые слова: сперма сибирского осетра, супероксид, пероксид водорода, криоконсервация, фенольные антиоксиданты, тролокс

Благодарность: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-16-00095 (супероксид анион-радикал-утилизирующая активность), а также в рамках госзадания, рег. № 122020100328-1 (пероксид водорода-утилизирующая активность).

Для цитирования: Колумбет А. Д., Половинкина М. А., Коляда М. Н., Осипова В. П., Пономарева Е. Н., Кудрявцев К. В. Влияние пирролидиновых производных 2,6-ди-*tert*-бутилфенола на супероксид- и пероксид водорода-утилизирующую активность спермы сибирского осетра // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. 2024. № 4. С. 39–46. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2024-4-39-46>. EDN JFOIZO.

Original article

The effect of pyrrolidine derivatives of 2,6-di-*tert*-butylphenol on superoxide and hydrogen peroxide-utilization activity of Siberian sturgeon sperm

A. D. Kolumbet^{1✉}, M. A. Polovinkina²,
M. N. Kolyada³, V. P. Osipova⁴, E. N. Ponomareva⁵, K. V. Kudryavtsev⁶

¹⁻⁴Federal Research Center the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
Rostov-on-Don, Russia, osipova_nd95@mail.ru[✉]

^{1, 5}Astrakhan State Technical University,
Astrakhan, Russia

⁶National Medical Research Center for Traumatology and Orthopedics named after R. R. Vreden,
Saint Petersburg, Russia

Abstract. The effect of (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid derivatives on the ability of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) sperm to utilize superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) generated in a model system of adrenaline oxidation in an alkaline medium, as well as exogenous hydrogen peroxide (H_2O_2) before and after freezing at liquid nitrogen temperature for 3 days was studied. The study of this activity of phenolic derivatives was carried out in comparison with the reference antioxidant Trolox, a water-soluble analogue of vitamin E. When phenolic derivatives were added at a concentration of 0.1 mM to the basic Stein cryomedium containing 12.5% egg yolk, 12.5% DMSO, 5 mM KCl, 130 mM NaCl, 20 mM $NaHCO_3$ and 5.5 mM glucose, a multidirectional effect of the compounds on the ability of Siberian sturgeon sperm to utilize superoxide anion radical and hydrogen peroxide before and after the freezing-defrosting process was established. The studied compounds increase the H_2O_2 -utilizing activity of reproductive cells, while reducing their superoxide-utilizing activity. Pyrrolidine derivatives of phenol were found to be more effective in stimulating the H_2O_2 -utilizing activity of defrosted sperm of the Siberian sturgeon than Trolox. A decrease in the rate of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 utilization by fish sperm was found after cryopreservation in the control and in the presence of (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid derivatives. A protective effect of new phenolic derivatives on the enzymatic link of antioxidant protection of Siberian sturgeon sperm during cryopreservation was shown. The obtained results indicate the prospects for further studies of the protective activity of (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid derivatives in the process of cryopreservation of reproductive cells of rare, endangered and commercially valuable fish species.

Keywords: Siberian sturgeon sperm, superoxide, hydrogen peroxide, cryopreservation, phenolic antioxidants, trolox

Acknowledgment: the work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation, grant No. 22-16-00095 (superoxide anion-radical-recycling activity), as well as within the framework of the state task, reg. No. 122020100328-1 (hydrogen peroxide-recycling activity).

For citation: Kolumbet A. D., Polovinkina M. A., Kolyada M. N., Osipova V. P., Ponomareva E. N., Kudryavtsev K. V. The effect of pyrrolidine derivatives of 2,6-di-*tert*-butylphenol on superoxide and hydrogen peroxide-utilization activity of Siberian sturgeon sperm. *Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing industry.* 2024;4:39-46. (In Russ.). <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2024-4-39-46>. EDN JFOIZO.

Введение

На сегодняшний день не в полной мере реализован имеющийся потенциал криотехнологий для

сохранения генофонда, восстановления популяций находящихся под угрозой исчезновения осетровых рыб, которые обладают низкой криорезистентно-

стью. Для разработки методологических основ повышения толерантности спермиев данных реликтовых рыб к криоконсервации необходимо понимание молекулярных механизмов повреждения спермиев во время процесса замораживания и оттаивания [1]. Поскольку важным фактором криоповреждения спермиев является развитие окислительного стресса в репродуктивных клетках самцов рыб [2], в качестве протекторных добавок в базовые защитные среды могут использоваться антиоксиданты (АО) [3]. Известно, что при криоконсервации в спермиях рыб наблюдается гиперпродукция первоначальной активной формы кислорода (АФК) – супероксид анион-радикала, или супероксида ($O_2^{\cdot-}$) [4], который выступает ключевым триггером развития свободно-радикального процесса окисления, т. к. из него генерируются в дальнейшем другие более агрессивные АФК [5], включая и пероксид водорода (H_2O_2). В любой аэробной клетке $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 постоянно образуются в ходе метаболических процессов и при физиологических концентрациях играют важную роль в качестве сигнальных молекул [6], но в высоких концентрациях данные АФК могут снижать подвижность и фертильность спермиев рыб [7]. Утилизация $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 системой антиоксидантной защиты спермиев рыб, представленной ферментами-антиоксидантами и низкомолекулярными АО, поддерживая концентрацию данных кислородных метаболитов на оптимальном уровне, предотвращает интенсификацию процессов свободно-радикального окисления. Поэтому актуально изучение влияния вносимых в базовые криосреды АО на способность сперматозоидов рыб утилизировать данные АФК.

Целью исследований являлось определение влияния 2-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-4,7-диоксо-6-фенилоксагидро-1Н-пирроло [2,3-*d*] пирридазин-3-карбоновой кислоты (**1**) и (1S,3R,3aS,6aR)-метил-3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-5-(2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)фенил)-1-метил-4,6-диоксооксагидропирроло-[3,4-*c*]пиррол-1-карбоксилата (**2**) в сравнении с реперным АО водорастворимым аналогом витамина Е – тролоксом на $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 -утилизирующую активности спермы привлекательного объекта аквакультуры – сибирского осетра (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) до и после 3-х суток замораживания при температуре жидкого азота.

Материалы и методы

Реагенты и растворы. Пирролидиновые производные **1** и **2** были синтезированы известными методами [8]. В работе использовались тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) и другие коммерчески доступные реагенты (Sigma-Aldrich, США) без дополнительной очистки. Пирролидиновые производные и тролокс растворяли в среде Штайна, которая состояла из 12,5 % яичного

желтка, 12,5 % диметилсульфоксида (ДМСО), 130 ммоль NaCl, 20 ммоль $NaHCO_3$, 5,5 ммоль глюкозы и 5 ммоль KCl [9]. Конечная концентрация соединений в средах измерения составляла 0,1 ммоль.

Сбор спермы. Объектом исследования являлась сперма сибирского осетра ленской популяции (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869), полученная с конца апреля по середину мая 2023 г. от 5 самцов 17–25 лет. Самцам сибирского осетра вводили однократную инъекцию LH-RHa (лютеинизирующий гормон – рилизинг-гормон этиламид). Сперму собирали прижизненно с использованием катетера, охлаждали (8 ± 2 °C) и доставляли в лабораторию в термомоконтейнере. Все протоколы исследований были выполнены в соответствии с рекомендациями Комиссии по биоэтике Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук» (ЮНЦ РАН) (Протокол № 1 от 01.01.2024). Согласно заключению Комиссии по биоэтике, наши экспериментальные исследования соответствуют принципам биоэтики и правилам использования животных в научных целях.

Общая процедура замораживания и размораживания спермы. По методу Цветковой [10] была проведена криоконсервация спермы сибирского осетра. Сперму в количестве 500 мкл смешивали с 500 мкл криосреды Штайна в соотношении 1 : 1 и данную смесь распределяли по пробиркам Эппендорфа объемом 1,5 мл. Пробирки Эппендорфа со смесью помещали для эквипирации в холодильник ($T = 4$ °C) на 40 мин. Затем пробирки переносили в криозамораживатель PLANER (UK), постепенно охлаждая от 5 до -70 °C со скоростью 20–25 °C/мин (время замораживания около 3 мин). После этого этапа проводилась глубокая заморозка в жидком азоте в течение 3 сут. Температуру измеряли электронным термометром. Дефростацию проб спермы проводили с использованием водяной бани при температуре 38–40 °C в течение 30–40 с.

Оценка способности спермы сибирского осетра утилизировать $O_2^{\cdot-}$. Способность спермы сибирского осетра утилизировать $O_2^{\cdot-}$ определяли в модельной системе окисления адреналина в щелочной среде [11] по скорости образования промежуточного продукта окисления адреналина – адренोलютинина [12], определяемого при 347 нм. Для работы был использован 96-луночный микропланшетный спектрофотометр Multiskan Sky фирмы Thermo Fisher Scientifics (США). В лунки планшета добавляли 0,2 мл бикарбонатного буфера (pH 10,6) и 0,01 мл 0,1 %-го раствора адреналина (5,46 ммоль/л). Далее планшет помещали в спектрофотометр и измеряли оптическую плотность в режиме периодического встряхивания содержимого планшета. Скорость окисления адреналина до адренолютинина оценивали в течение 300 с с добавками исследуемых соединений и без них (контроль). Контроль включал все

компоненты, за исключением адреналина. Сперму смешивали с 0,2 М раствором Трис-буфера в соотношении 1 : 10 с помощью механического гомогенизатора. Далее для удаления частично разрушенных клеток и ядер смесь центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 мин с использованием центрифуги Thermo Scientific SL16R (Thermo Fisher Scientific, Германия). Полученный супернатант был использован для измерения $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующей способности спермы сибирского осетра.

Снижение скорости окисления адреналина в присутствии супернатанта, содержащего сперматозоиды, свидетельствует об $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующей способности спермы сибирского осетра. $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующую активность рассчитывали относительно контроля, %, где за 100 % принимали окисление адреналина в щелочном бикарбонатном буфере без добавления спермы. Все эксперименты проводились в трехкратной повторности. Активность I , %, рассчитывали по формуле

$$I = [(1 - A_i / A_0) \cdot 100],$$

где A_i – оптическая плотность в пробе с добавлением тестируемых соединений; A_0 – оптическая плотность в контроле (без добавок соединений).

Оценка способности спермы сибирского осетра утилизировать H_2O_2 . Предварительно готовили смесь, содержащую 1 мл спермы (нативной или с добавлением раствора тестируемых соединений в ДМСО в конечной концентрации 0,1 ммоль) и 7 мл фосфатного буфера (рН 7,4). Далее полученную смесь центрифугировали в течение 10 мин (3 500 об/мин) и собирали надосадочную жидкость. В планшет помещали 100 мкл 30 ммоль раствора H_2O_2 в фосфатном буфере и 100 мкл надосадочной жидкости в фосфатном буфере. Контрольный образец вместо супернатанта содержал 100 мкл фосфатного буфера. Концентрацию H_2O_2 определяли методом спектрофотометрии ($\lambda = 240$ нм) [13] в течение 10 мин. Для каждого соединения было проведено по 3 параллельных независимых измерения. Исходя из полученных спектрофотометрических данных, были построены кинетические кривые расщепления H_2O_2 , линеаризованные в координатах уравнения первого порядка. Константы скорости реакции разложения H_2O_2 были рассчитаны по тангенсу угла наклона прямых. Изменение скорости разложения H_2O_2 в присутствии исследуемых соединений свидетельствует об их утилизирующей активности.

Статистический анализ. С использованием программного обеспечения Statistica для Windows, версия 9.0 (StatSoft, Inc.), проведен статистический анализ полученных результатов, которые были представлены как среднее значение $\pm SD$. С помощью t -критерия Стьюдента были проанализирова-

ны параметры антиоксидантной активности изучаемых соединений, где статистическая достоверность была установлена на уровне $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Согласно полученным в работе данным, спермии сибирского осетра обладают способностью утилизировать $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующая активность репродуктивных клеток обусловлена преимущественно действием антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (СОД), ускоряющего реакцию диспропорционирования $O_2^{\cdot-}$ до молекулярного кислорода и H_2O_2 . Поскольку H_2O_2 является более агрессивной и стабильной по сравнению с $O_2^{\cdot-}$ АФК, которая, к тому же, в отличие от $O_2^{\cdot-}$, менее полярна и может легко проходить через плазматическую мембрану [14], важное значение имеет способность спермиев утилизировать H_2O_2 .

В результате протеомного анализа в сперме сибирского осетра [15] идентифицирована цитозольная Cu/Zn-СОД изоформа (СОД1), которая является самой активной изоформой СОД, однако известно, что данный фермент легко подвергается окислительной модификации и инактивации АФК [16]. Анализ протеома спермы данного вида осетровых не выявил наличие в репродуктивных клетках важнейшего фермента, утилизирующего H_2O_2 – каталазы, разлагающего H_2O_2 до O_2 и H_2O . Способность спермы сибирского осетра утилизировать H_2O_2 , по-видимому, обусловлена действием двух альтернативных ферментов: глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, которые вместе с СОД1 образуют единую метаболическую цепь, в которой продукт реакции одного компонента цепи (СОД1) является субстратом для других компонентов – ферментов, утилизирующих H_2O_2 . В связи с этим эффективная антиоксидантная активность спермы рыб при криоконсервации обеспечивается сбалансированностью процессов утилизации данных видов АФК. Так, при резком повышении $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующей активности спермы без соответствующей активации способности репродуктивных клеток утилизировать H_2O_2 может повыситься стационарная концентрация данной АФК [17], поэтому баланс между Cu, Zn-СОД и ферментами, удаляющими H_2O_2 , имеет важное значение в антиоксидантной защите.

Показано, что внесение в модифицированную среду Штайна фенольных производных и тролокса как до, так и после процесса замораживания-дефростации приводит к повышению скорости разложения H_2O_2 спермой рыб по сравнению с контрольным вариантом без добавок АО (табл.), но при этом $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующая активность данных клеток снижается.

**$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 -утилизирующие активности спермы сибирского осетра
в присутствии исследуемых соединений до (I) и после (II) криоконсервации***

**$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 -utilization activities of Siberian sturgeon sperm
in the presence of the studied compounds before (I) and after (II) cryopreservation**

Соединение	$O_2^{\cdot-}$ -утилизирующая активность, % ингибирования		H_2O_2 -утилизирующая активность, $k \cdot 10^5, c^{-1}$	
	I	II	I	II
Контроль	50,52 ± 1,04	34,64 ± 0,49	20,34	10,62
1	35,03 ± 0,30	27,91 ± 0,61	91,52	18,22
2	43,03 ± 0,45	29,19 ± 0,34	21,63	15,74
Тролокс	28,42 ± 0,76	15,94 ± 0,37	21,22	14,72

* k – константа скорости разложения H_2O_2 .

Стимулирование способности спермы сибирского осетра утилизировать H_2O_2 представляется важным, учитывая токсическое влияние данной АФК на подвижность репродуктивных клеток рыб [7]. Наибольшее повышение H_2O_2 -утилизирующей активности спермы рыб наблюдается в присутствии соединения **1** – до замораживания данная активность увеличилась в 4,5 раза, после замораживания – в 1,7 раза. Добавка остальных соединений, в том числе тролокса, в базовую криосреду оказалась более эффективной для дефростированной спермы, при этом стимулирование утилизации сперматозоидами H_2O_2 в присутствии гибридных фенольных производных превышало аналогичную активность тролокса (см. табл.).

Известно, что при окислении адреналина в щелочной среде (бикарбонатный буфер, pH 10,65) кроме $O_2^{\cdot-}$ образуется и H_2O_2 [18], в присутствии которого СОД1 обладает пероксидазной активностью, катализируя образование наиболее агрессивной АФК – гидроксильного радикала [19]. Данный активный метаболит способен окислять адреналин, промотируя генерирование $O_2^{\cdot-}$, а также инактивировать фермент Cu/Zn-СОД. Таким образом, снижение $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующей активности спермиев сибирского осетра в присутствии исследуемых соединений может быть связано с их влиянием на пероксидазную активность СОД1.

До замораживания способность спермы сибирского осетра утилизировать $O_2^{\cdot-}$ в присутствии соединений **1**, **2** и тролокса снижается в 1,4, 1,2 и 1,8 раз соответственно. После криоконсервации при добавлении новых фенольных производных данная активность спермы уменьшается в 1,2 раза, при внесении тролокса – в 2,2 раза. Следует отметить снижение скорости утилизации $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 спермой рыб после криоконсервации как в контроле, так и в присутствии исследуемых соединений, хотя в условиях гиперпродукции АФК на этапах замораживания и оттаивания для предотвращения окислительного повреждения молекул необходимо

повышение способности спермы рыб утилизировать $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . В контрольном варианте способность дефростированной спермы сибирского осетра утилизировать $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 снижается, по сравнению с нативной спермой, в 1,5 и 1,9 раза соответственно. Для H_2O_2 -утилизирующей активности наибольшее снижение наблюдается при добавлении соединения **1** (в 5 раз), для $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующей активности – при добавлении тролокса (в 1,8 раза). Ослабление способности дефростированной спермы рыб утилизировать данные виды АФК может быть связано с высвобождением антиоксидантных ферментов из сперматозоидов в результате повреждения плазматической мембраны спермиев рыб при криоконсервации [20].

Таким образом, в работе установлена способность гибридных фенольных производных снижать негативное влияние процесса замораживания на $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 -утилизирующую активность спермиев сибирского осетра. Соединение **1** демонстрирует криозащитный эффект в отношении $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующей активности репродуктивных клеток при замораживании-дефростации, при этом соединение **2** и тролокс – в отношении H_2O_2 -утилизирующей активности. Так, если в контроле способность репродуктивных клеток расходовать $O_2^{\cdot-}$ при замораживании-дефростации снижается в 1,5 раза, то в присутствии соединения **1** – в 1,3 раза, что свидетельствует о его протекторной активности.

Заключение

Показано, что пирролидинсодержащие фенольные производные, как и тролокс, способны стимулировать утилизацию репродуктивными клетками H_2O_2 , при этом новые фенольные производные демонстрируют большую эффективность антиоксидантного действия по сравнению с реперным антиоксидантом. В работе установлено снижение $O_2^{\cdot-}$ -утилизирующей активности спермы сибирского осетра при внесении в модифицированную среду Штайна производных (3,5-ди-*трет*-бутил-4-

гидроксифенил)-пирролидин-2-карбоновой кислоты, но в целом можно констатировать протекторный эффект данных соединений на ферментативное звено антиоксидантной защиты репродуктив-

ных клеток рыб как до, так и после замораживания. Полученные результаты указывают на важность проведения дополнительных исследований в данном направлении.

Список источников

1. Chandra G., Fopp-Bayat D. Trends in aquaculture and conservation of sturgeons: a review of molecular and cytogenetic tools // *Reviews in Aquaculture*. 2021. V. 13. P. 119–137. <https://doi.org/10.1111/raq.12466>.
2. Figueroa E., Lee-Estevez M., Valdebenito I., Watanabe I., Oliveira R. P. S., Romero J., Castillo R. L., Farias J. G. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish // *Aquaculture*. 2019. V. 511. P. 634190. <https://doi.org/110.1016/j.aquaculture.2019.06.004>.
3. Sandoval-Vargas L., Silva Jiménez M., Risopatrón González J., 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>.
4. Hossen S., Sukhan Z. P., Cho Y., Lee W. K., Kho K. H. Antioxidant Activity and Oxidative Stress-Oriented Apoptosis Pathway in Saccharides Supplemented Cryopreserved Sperm of Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai* // *Antioxidants (Basel)*. 2022. V. 11. P. 1303. <https://doi.org/10.3390/antiox11071303>.
5. Winterbourn C. C. Biological chemistry of superoxide radicals // *ChemTexts*. 2020. V. 6. <https://doi.org/10.1007/s40828019-0101-8>.
6. Knaus U. G. Oxidants in Physiological Processes // *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2020. V. 264. P. 27–47. https://doi.org/10.1007/164_2020_380.
7. Dietrich G. J., Szpyrka A., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K., Zakowski L., Ciereszko A. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa // *Theriogenology*. 2005. V. 64. P. 1809–1822. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.010>.
8. Пат. РФ № 2472794, 2013. Новые бициклические производные пирролидинов, обладающие антиоксидантной активностью, и способ их получения / Кудрявцев К. В., Берберова Н. Т., Осипова В. П., Антонова Н. А.; опубл. 20.01.2013.
9. Пономарева Е. Н., Богатырева М. М., Антонова Н. А., Осипова В. П. Оптимизация процесса криоконсервации спермы осетровых рыб при использовании различных сред // *Изв. Самар. науч. центра РАН*. 2009. Т. 11. С. 132–134.
10. Цветкова Л. И., Пронина Н. Д., Докина О. Б., Речубратский А. В., Парнышков В. А. Формирование низкотемпературного генного банка спермы рыб (состояние, развитие, перспективы) // *Вопр. рыболовства*. 2012.

11. Сирота Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // *Вопр. мед. химии*. 1999. Т. 45. № 3. С. 263–272.
12. Volkov V., Lobanov A., Voronkov M., Baygildiev T., Misin V., Tsvileva O. Kinetics and Mechanism of Epinephrine Autoxidation in the Presence of Plant Superoxide Inhibitors: A New Look at the Methodology of Using a Model System in Biological and Chemical Research // *Antioxidants*. 2023. V. 12. P. 1530. <https://doi.org/10.3390/antiox12081530>.
13. Aebi H. Catalase *in vitro* // *Methods in enzymology*. 1984. V. 105. С. 121–126.
14. Meo S. Di, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020. P. 9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>.
15. Li P., Guo W., Yue H., Li C., Du H., Qiao X., Liu Z., Zhou Q., Wei Q. Variability in the protein profiles in spermatozoa of two sturgeon species // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. e0186003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186003>.
16. Tiwari M. K., Hägglund P. M., Möller I. M., Davies M. J., Bjerrum M. J. Copper ion / H₂O₂ oxidation of Cu/Zn-Superoxide dismutase: Implications for enzymatic activity and antioxidant action // *Redox Biology*. 2019. V. 26. P. 101262. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101262>.
17. Peskin A. V. Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review // *Bioscience Reports*. 1997. V. 17. P. 85–89. <https://doi.org/10.1023/a:1027343519591>.
18. Сирота Т. В. Цепная реакция аутоокисления адреналина – модель хиноидного окисления катехоламинов // *Биофизика*. 2020. Т. 65. № 4. С. 646–655. <https://doi.org/10.31857/S0006302920040031>.
19. Yim M. B., Yim H. S., Boon Chock P., Stadtman E. R. Pro-oxidant activity of Cu,Zn-superoxide dismutase // *Journal of the American Aging Association*. 1998. V. 21. P. 91–93. <https://doi.org/10.1007/s11357-998-0013-9>.
20. Huang X.-R., Zhuang P., Zhang L.-Z., Liu J.-Y., Zhang T., Feng G.-P., Zhao F. Effect of cryopreservation on the enzyme activity of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt and Ratzeburg, 1833) semen // *Journal of Applied Ichthyology*. 2014. V. 30. P. 1585–1589. <https://doi.org/10.1111/jai.12608>.

References

1. Chandra G., Fopp-Bayat D. Trends in aquaculture and conservation of sturgeons: a review of molecular and cytogenetic tools. *Reviews in Aquaculture*, 2021, vol. 13, pp. 119-137. <https://doi.org/10.1111/raq.12466>.
2. Figueroa E., Lee-Estevez M., Valdebenito I., Watanabe I., Oliveira R. P. S., Romero J., Castillo R. L., Farias J. G. Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish. *Aquaculture*, 2019, vol. 511, p. 634190. <https://doi.org/110.1016/j.aquaculture.2019.06.004>.
3. Sandoval-Vargas L., Silva Jiménez M., Risopatrón González J., Villalobos E. F., Cabrita E., Valdebenito Isler I.

Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. *Reviews in Aquaculture*, 2020, pp. 1-23. <https://doi.org/10.1111/raq.12479>.

4. Hossen S., Sukhan Z. P., Cho Y., Lee W. K., Kho K. H. Antioxidant Activity and Oxidative Stress-Oriented Apoptosis Pathway in Saccharides Supplemented Cryopreserved Sperm of Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Antioxidants (Basel)*, 2022, vol. 11, p. 1303. <https://doi.org/10.3390/antiox11071303>.

5. Winterbourn C. C. Biological chemistry of superoxide radicals. *ChemTexts*, 2020, vol. 6, <https://doi.org/10.1007/s40828019-0101-8>.
6. Knaus U. G. Oxidants in Physiological Processes. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2020, vol. 264, pp. 27-47. https://doi.org/10.1007/164_2020_380.
7. Dietrich G. J., Szpyrka A., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K., Zakowski L., Ciereszko A. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 2005, vol. 64, pp. 1809-1822. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.010>.
8. Kudryavtsev K. V., Berberova N. T., Osipova V. P., Antonova N. A. *Novye biciklicheskie proizvodnye pirrolidinov, obladayushchie antioksidantnoy aktivnost'yu, i sposob ih polucheniya* [New bicyclic pyrrolidine derivatives with antioxidant activity and the method of their preparation]. Patent RF, N. 2472794, 2013; opubl. 20.01.2013.
9. Ponomareva E. N., Bogatyreva M. M., Antonova N. A., Osipova V. P. Optimizaciya processa kriokonservatsii spermy osetrovyyh ryb pri ispol'zovanii razlichnyh sred [Optimization of the process of cryopreservation of sperm of sturgeon fish using various media]. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra RAN*, 2009, vol. 11, pp. 132-134.
10. Cvetkova L. I., Pronina N. D., Dokina O. B., Rekrutbratskij A. V., Parnyshkov V. A. Formirovanie nizkotemperaturnogo gennogo banka spermy ryb (sostoyanie, razvitiye, perspektivy) [Formation of a low-temperature gene bank of fish sperm (status, development, prospects)]. *Voprosy rybolovstva*, 2012, vol. 13, no. 3, pp. 538-545.
11. Sirota T. V. Novyy podhod v issledovanii processa avtookisleniya adrenalina i ispol'zovanie ego dlya izmereniya aktivnosti superoksid-dismutazy [A new approach in the study of the process of autoxidation of adrenaline and its use to measure the activity of superoxide dismutase]. *Voprosy medicinskoj himii*, 1999, vol. 45, no. 3, pp. 263-272.
12. Volkov V., Lobanov A., Voronkov M., Baygildiev T., Misin V., Tsivileva O. Kinetics and Mechanism of Epinephrine Autoxidation in the Presence of Plant Superoxide Inhibitors: A New Look at the Methodology of Using a Model System in Biological and Chemical Research. *Antioxidants*, 2023, vol. 12, p. 1530. <https://doi.org/10.3390/antiox12081530>.
13. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology*, 1984, vol. 105, pp. 121-126.
14. Meo S. Di, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, p. 9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>.
15. Li P., Guo W., Yue H., Li C., Du H., Qiao X., Liu Z., Zhou Q., Wei Q. Variability in the protein profiles in spermatozoa of two sturgeon species. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, e0186003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186003>.
16. Tiwari M. K., Häggglund P. M., Möller I. M., Davies M. J., Bjerrum M. J. Copper ion / H₂O₂ oxidation of Cu/Zn-Superoxide dismutase: Implications for enzymatic activity and antioxidant action. *Redox Biology*, 2019, vol. 26, p. 101262. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101262>.
17. Peskin A. V. Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Bioscience Reports*, 1997, vol. 17, pp. 85-89. <https://doi.org/10.1023/a:1027343519591>.
18. Sirota T. V. Cepnaya reakciya avtookisleniya adrenalina – model' hinoidnogo okisleniya katekholaminov [Chain reaction of epinephrine autooxidation – a model of quinoid oxidation of catecholamines]. *Biofizika*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 646-655. <https://doi.org/10.31857/S0006302920040031>.
19. Yim M. B., Yim H. S., Boon Chock P., Stadtman E. R. Pro-oxidant activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. *Journal of the American Aging Association*, 1998, vol. 21, pp. 91-93. <https://doi.org/10.1007/s11357-998-0013-9>.
20. Huang X.-R., Zhuang P., Zhang L.-Z., Liu J.-Y., Zhang T., Feng G.-P., Zhao F. Effect of cryopreservation on the enzyme activity of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt and Ratzeburg, 1833) semen. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, vol. 30, pp. 1585-1589. <https://doi.org/10.1111/jai.12608>.

Статья поступила в редакцию 28.09.2024; одобрена после рецензирования 05.11.2024; принята к публикации 05.12.2024
The article was submitted 28.09.2024; approved after reviewing 05.11.2024; accepted for publication 05.12.2024

Информация об авторах / Information about the authors

Анастасия Дмитриевна Колумбет – старший лаборант отдела водных биологических ресурсов бассейнов южных морей; Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук; аспирант кафедры гидробиологии и общей экологии; Астраханский государственный технический университет; osipova_nd95@mail.ru

Мария Александровна Половинкина – кандидат химических наук; научный сотрудник отдела водных биологических ресурсов бассейнов южных морей; Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук; polovinkina.ast@gmail.com

Anastasiya D. Kolumbet – Senior Laboratory Assistant of the Department of Aquatic Biological Resources of the South Sea Basins; Federal Research Center the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; Postgraduate Student of the Department of Hydrobiology and General Ecology; Astrakhan State Technical University; osipova_nd95@mail.ru

Mariya A. Polovinkina – Candidate of Chemical Sciences; Researcher of the Department of Aquatic Biological Resources of the South Sea Basins; Federal Research Center the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; polovinkina.ast@gmail.com

Маргарита Николаевна Коляда – кандидат биологических наук, доцент; старший научный сотрудник отдела водных биологических ресурсов бассейнов южных морей; Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук; mnkolyada@mail.ru

Виктория Павловна Осипова – доктор химических наук, доцент; ведущий научный сотрудник отдела водных биологических ресурсов бассейнов южных морей; Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук; osipova_vp@mail.ru

Елена Николаевна Пономарева – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры аквакультуры и водных биоресурсов, заведующий научно-исследовательской лабораторией «Биотехнологии сохранения и воспроизводства ценных видов рыб»; Астраханский государственный технический университет; kafavb@mail.ru

Константин Викторович Кудрявцев – доктор химических наук, доцент; доцент кафедры химии; Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена; konstantin@kudryavtsev.ru

Margarita N. Kolyada – Candidate of Chemical Sciences, Assistant Professor; Senior Researcher of the Department of Aquatic Biological Resources of the South Sea Basins; Federal Research Center The Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; mnkolyada@mail.ru

Viktoria P. Osipova – Doctor of Chemical Sciences, Assistant Professor; Leading Researcher of the Department of Aquatic Biological Resources of the South Sea Basins; Federal Research Center The Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; osipova_vp@mail.ru

Elena N. Ponomareva – Doctor of Biological Sciences, Professor; Professor of the Department of Aquaculture and Aquatic Bioresources, Head of the Research Laboratory of Biotechnology for the Preservation and Reproduction of Valuable Fish Species; Astrakhan State Technical University; kafavb@mail.ru

Konstantin V. Kudryavtsev – Doctor of Chemical Sciences, Assistant Professor; Assistant Professor of the Department of Chemistry; National Medical Research Center for Traumatology and Orthopedics named after R. R. Vreden; konstantin@kudryavtsev.ru

