

УДК 577.1:591.463.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2022-0-3-66-73

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СПЕРМОПЛАЗМЫ ЖЕРЕБЦОВ С НОРМАЛЬНОЙ И НИЗКОЙ ПРОГРЕССИВНОЙ ПОДВИЖНОСТЬЮ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ**© М.М. Атрощенко, А.М. Шитикова, В.И. Звягина, М.Г. Енгальчева,
Ю.А. Марсянова, Ю.Э. Новикова, М.А. Жиркова**

Целью данной работы явилось проведение сравнительного анализа биохимических показателей спермоплазмы жеребцов с нормальной и низкой прогрессивной подвижностью после криоконсервации. Семенную плазму 34 жеребцов арабской породы собирали в период размножения (февраль–май). Активность H^+ -АТФазы определяли на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия), активность щелочной фосфатазы (ЩФ), креатинфосфокиназы (КК), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), α -амилазы (АА), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также концентрацию триацилглицерина (ТАГ), глюкозы – на биохимическом анализаторе AU 680 (Beckman Coulter, США), активность цитохромоксидазы, концентрацию лактата, цитрата и фруктозы – на полуавтоматическом анализаторе Stat Fax 1904+ (Awareness Technology Inc, США). Содержание сукцината определяли на ИФ-анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology Inc, США). Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 10 и непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Было обнаружено, что в спермоплазме жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью сперматозоидов после замораживания-оттаивания активность АЛТ ($p=0.012$), АСТ ($p=0.012$), ЛДГ ($p=0.017$) и H^+ -АТФазы ($p=0.037$) статистически значимо выше, чем в спермоплазме жеребцов с нормальной прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации. Полученные результаты могут быть связаны с повреждением цитоплазматической и митохондриальной мембраны сперматозоидов, что ведет к падению синтеза АТФ. Последнее может сопровождаться снижением прогрессивной подвижности в сперматозоидах после криоконсервации. Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-16-00101.

Ключевые слова: криоконсервация, жеребцы, спермоплазма, АЛТ, АСТ, ЛДГ, H^+ -АТФаза.

Введение. Криоконсервация спермы является важной биотехнологией во вспомогательной репродукции, позволяющей поддерживать мужские гаметы в течение неопределенного периода. Это помогает упростить транспортировку генетического материала и улучшить логистику программ разведения. В сочетании с другими зоотехническими методами, искусст-

венное осеменение криоконсервированной спермой обеспечивает интенсификацию селекционных задач в племенном коневодстве. Несмотря на большую вариабельность разбавителей и криопротекторов, криоконсервация негативно влияет на показатели качества спермы, в том числе на прогрессивную подвижность [1].

АТРОЩЕНКО Михаил Михайлович – к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства, e-mail: atromiks-77@mail.ru

ШИТИКОВА Анна Михайловна – к.б.н., Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, e-mail: anyakudlaeva@mail.ru

ЗВЯГИНА Валентина Ивановна – к.б.н., Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, e-mail: vizvyagina@yandex.ru

ЕНГАЛЬЧЕВА Мария Германовна – к.м.н., Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, e-mail: mariyanaaber@yandex.ru

МАРСЯНОВА Юлия Александровна, Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, e-mail: yuliyamarsyanova@yahoo.com

НОВИКОВА Юлия Эдуардовна, Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, e-mail: novikova.yuliya24@yandex.ru

ЖИРКОВА Марина Алексеевна, Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, e-mail: zhirkovaferum@gmail.com

Прогрессивная подвижность сперматозоидов является одним из факторов, который оказывает влияние на фертильность, а также дает возможность диагностировать репродуктивные нарушения [2]. Для поддержания прогрессивной подвижности на необходимом для оплодотворения уровне требуются большие затраты АТФ. Сперматозоиды млекопитающих поддерживают этот уровень в основном за счет гликолиза в цитоплазме и окислительного фосфорилирования в митохондриях [3]. В качестве субстратов гликолиза могут использоваться такие моносахариды как глюкоза и фруктоза [4]. В последние годы внимание ученых привлекает исследование лактата, поскольку стало известно, что данная молекула не является лишь «тупиковым» продуктом метаболизма, но также выполняет регуляторную роль [5] и в, частности, в митохондриях сперматозоидов может использоваться в качестве энергетического субстрата за счет наличия в них лактатоксилирующего комплекса [4, 6]. В некоторых исследованиях было обнаружено, что цитрат также способен использоваться сперматозоидами в качестве источника АТФ [7, 8]. Однако в исследовании Raventi et al. было показано, что лактат и сукцинат являются преимущественными энергетическими субстратами при капацитации сперматозоидов, но не цитрат [9]. Кроме того, имеются данные об использовании ТАГ в энергетическом метаболизме сперматозоидов для обеспечения их подвижности и жизнеспособности [10], и что более высокая концентрация ТАГ в семенной плазме связана с хорошим качеством спермы и мужской фертильностью [11].

Энергетический баланс сперматозоидов зависит не только от наличия субстратов, но и от активности ферментов. Так, креатинкиназа катализирует фосфорилирование креатина с образованием макроэрга – креатинфосфата, необходимого для двигательной активности сперматозоидов [12]. АЛТ и АСТ представляют собой внутриклеточные ферменты, которые расположены в основном в средней части сперматозоидов [13]. АСТ катализирует реакцию трансаминирования аспартата, пополняя запасы оксалоацетата для цикла Кребса. Активность данного фермента может отражать состояние митохондриального аппарата [14]. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – фермент, локализованный в цитозоле и митохондриях сперматозоидов, участвующий в процессе гликолиза и поддерживающий стабильные концентрации лактата и пирувата [13].

Н⁺-АТФаза является ферментом внутренней мембраны митохондрий и участвует в процессе окислительного фосфорилирования и синтезе АТФ. Предполагается, что митохондриальная Н⁺-АТФаза участвует в поддержании подвижности сперматозоидов при капацитации и акросомной реакции [15]. Цитохромоксидаза (терминальный ферментативный комплекс IV дыхательной цепи) также локализована во внутренней мембране митохондрий сперматозоидов и выполняет в них дыхательную роль, перенося электроны от цитохрома с к молекулярному кислороду [16, 17]. α -амилаза – это внеклеточный фермент, обеспечивающий наличие пригодных к дальнейшему преобразованию энергетических субстратов для сперматозоидов [14]. Щелочная фосфатаза катализирует отщепление фосфатных групп от субстратов. В сперматозоидах жеребцов наблюдается незначительная активность ЩФ, в то время как высокие уровни активности ЩФ были обнаружены в семенниках и эпидидимисе. Активность ЩФ предлагается определять в качестве независимого от спермы маркера эякуляции у жеребцов [18].

Анализ активности ферментов и концентраций метаболитов спермоплазмы косвенно позволяет оценить целостность и функцию мембран сперматозоидов, а также выявить их связь с прогрессивной подвижностью [13]. В РФ, согласно ГОСТУ 24168-2017, пригодной для оплодотворения является сперма жеребцов с прогрессивной подвижностью не менее 25% после криоконсервации. В связи с этим целью нашей работы явилось проведение сравнительного анализа биохимических показателей спермоплазмы жеребцов в группах с прогрессивной подвижностью после криоконсервации менее 25 и более 25%.

Материалы и методы. Исследование проводили на поголовье жеребцов АО «Герский племенной конный завод № 169» (Ставропольский край). Лабораторные исследования проводили в лаборатории криобиологии ФГБНУ «ВНИИ коневодства» (Рязанская область), кафедре биологической химии Рязанского государственного медицинского университета (г. Рязань) и клинико-диагностической лаборатории «ДиаЛаб» (г. Москва). В опытах использовали 34 жеребца арабской чистокровной породы в возрасте от 3 до 23 лет. Условия кормления и содержания жеребцов соответствовали установленным нормам во время проведения экспериментальных исследований. Сперму от

жеребцов получали во время случного сезона с интервалом 48 ч. После длительного периода полового покоя у жеребцов брали три эякулята с интервалом 48 ч, первые два эякулята в исследованиях не использовались, для исследования брали третий эякулят.

После получения спермы в каждом эякуляте определяли объем, концентрацию и общее количество сперматозоидов. Далее эякулят делили на две части, одну часть разбавляли ЛХЦЖ средой в соотношении 1:3, определяли прогрессивную подвижность, общее количество сперматозоидов с прогрессивной подвижностью и выживаемость сперматозоидов при температуре 2–4°C. Объем эякулята (в мл) после фильтрации определяли с помощью мерного цилиндра. Концентрацию сперматозоидов измеряли фотометром SDM1 (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany). Оценку общей и прогрессивной подвижности проводили с использованием системы Argus CASA (ArgusSoft LTD., Санкт-Петербург, Россия) и микроскопа Motiс VA 410 (Motiс, Гонконг, Китай) в камере Маклера при 37°C. Жизнеспособность и морфологию сперматозоидов оценивали с помощью фазово-контрастного микроскопа Olympus BX41 (Olympus Corporation, Япония).

Замораживание спермы проводили в парах жидкого азота по технологии ВНИИ коневодства. Хранили замороженную сперму в жидком азоте при температуре –196°C. Оттаивание криоконсервированной спермы проводили в водяной бане при температуре 40°C в течение 90 сек. После оттаивания криоконсервированной спермы определяли прогрессивную подвижность сперматозоидов и выживаемость при температуре 2–4°C, а также процент живых сперматозоидов.

Другую часть эякулята центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. После микроскопии супернатанта аликвоты семенной плазмы свободные от сперматозоидов замораживали при температуре –18°C до проведения исследований.

В аликвотах семенной плазмы определяли активность ферментов щелочной фосфатазы (ЩФ), креатинфосфокиназы (КК), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), α-амилазы (АА), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также концентрацию триацилглицерина (ТАГ), глюкозы на биохимическом анализаторе AU 680 (Beckman Coulter, США) по унифицированным фотометрическим методикам клинических лабораторных исследований. Активность

H⁺-АТФ-азы определяли на спектрофотометре СФ-2000, измеряя содержание неорганического фосфата методом Боданского после остановки реакции гидролиза АТФ [19]. Активность цитохромоксидазы определяли на полуавтоматическом анализаторе Stat Fax 1904+ (Awareness Technology Inc, США) в соответствии с [20] в нашей модификации [21]. Содержание сукцината определяли на ИФ-анализаторе StatFax 3200 (Awareness Technology Inc, США) с помощью набора Succinate Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию лактата, цитрата и фруктозы определяли на полуавтоматическом анализаторе Stat Fax 1904+ (Awareness Technology Inc, США) с помощью диагностических наборов (BioSystems, Испания).

Жеребцов делили на 2 группы в зависимости от показателя прогрессивной подвижности сперматозоидов после криоконсервации: в первую группу вошли жеребцы с данным показателем менее 25%, во вторую – с прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации более 25%.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 10 и «Microsoft Office Excel 2016» (StatSoft Inc., США). Для оценки статистической значимости в исследуемых группах использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Результаты предоставлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [Q1; Q3]. Отличия считали статистически значимыми при p<0.05.

Результаты и их обсуждение. Сравнительный анализ показателей качества спермы жеребцов показал, что в группе жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью в оттаянной сперме статистически значимо ниже число прогрессивно-подвижных сперматозоидов в эякуляте, процент сперматозоидов с нормальной морфологией, выживаемость, прогрессивная и общая подвижность, а также процент живых сперматозоидов в нативной и оттаянной сперме по сравнению с группой жеребцов с нормальной прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации (табл. 1). Оценка подвижности, морфологии и концентрации спермы, проводимые перед криоконсервацией материала не всегда позволяют спрогнозировать успех данного метода и сохранение жизнеспособности сперматозоидов после оттаивания. Важным этапом является выявление функционально значимых изменений в плазматической мембране, ми-

тохондриях, акросоме или ДНК. Ряд исследователей предполагает, что успех криоконсервации во многом определяется лабильностью мембраны нативного сперматозоида [22–24]. Снижение фертильности криоконсервированной спермы может быть связано с изменениями целостности и структуры плазматической мембраны [25]. Giraud et al. продемонстрировали, что текучесть мембраны сперматозоидов снижается во время криоконсервации, и реакцию сперматозоидов на протокол замораживания можно предсказать по состоянию мембраны свежей спермы [26].

Анализ активности внутриклеточных ферментов в спермоплазме может служить дополнительным маркером состояния мембраны сперматозоидов [2]. В ходе биохимического анализа спермоплазмы изучаемых групп жеребцов мы обнаружили, что активность АЛТ ($p=0.012$) и АСТ ($p=0.012$) статистически значимо выше в группе жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью сперматозоидов по-

сле криоконсервации (табл. 2). Из литературных данных известно, что активность АСТ и АЛТ у арабских жеребцов с низкой (<35%) подвижностью сперматозоидов после замораживания-оттаивания была достоверно выше, чем у жеребцов с высокой (>35%) подвижностью [27]. Также было обнаружено, что стресс от спортивной нагрузки у жеребцов сопровождается увеличением активности АЛТ и, в большей степени, АСТ [2]. Поскольку изучаемые трансаминазы являются внутриклеточными ферментами [13], повышение их активности в спермоплазме жеребцов может быть связано с повреждением мембран сперматозоидов [28, 29]. В исследовании Gundogan M. et al. была обнаружена положительная корреляция между процентом аномальных сперматозоидов и уровнем АСТ и соотношением АСТ/АЛТ в семенной плазме барана, что также могло произойти по причине повреждения мембраны сперматозоидов и утечки этих ферментов в спермоплазму [30].

Т а б л и ц а 1

Качественные и количественные показатели нативной и криоконсервированной спермы жеребцов в группах с низкой и нормальной прогрессивной подвижностью после криоконсервации

Показатель	Группа с прогрессивной подвижностью в оттаянной сперме <25%, n=17	Группа с прогрессивной подвижностью в оттаянной сперме >25%, n=17	Значение <i>p</i>
Возраст	13.00[7.00; 15.00]	10.00[5.00; 14.00]	0.821
Объем эякулята, мл	35.00[30.00; 45.00]	40.00[30.00; 59.00]	0.876
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	203.00[161.00; 265.00]	191.00[173.00; 223.00]	0.380
Общее количество сперматозоидов, млрд	7.56 [4.22; 9.87]	8.72[6.47; 9.91]	0.269
Общее количество сперматозоидов с прогрессивной подвижностью, млрд	2.82[1.43; 4.29]*	5.33[3.69; 6.66]	0.012
Сперматозоиды с нормальной морфологией, %	68.00[58.00; 75.00]*	76.00[69.00; 85.00]	0.012
Выживаемость в нативной сперме, ч	144.00[90.00; 156.00]*	180.00[132.00; 240.00]	0.040
Выживаемость в оттаянной сперме, ч	48.00[42.00; 84.00]**	96.00[96.00; 120.00]	0.010
Прогрессивная подвижность в нативной сперме, %	45.00[34.00; 50.00]**	57.00[55.00; 61.00]	0.000
Общая подвижность в нативной сперме, %	59.00[52.00; 63.00]**	76.00[64.00; 87.00]	0.002
Общая подвижность в оттаянной сперме, %	33.00[22.00; 35.00]**	48.00[39.00; 52.00]	0.000
Живые сперматозоиды в нативной сперме, %	57.00[48.00; 68.00]*	70.00[62.00; 77.00]	0.028
Живые сперматозоиды в оттаянной сперме, %	34.00[30.00; 38.00]*	39.00[36.00; 47.00]	0.035

Примечания: * – отмечены значения $p<0.05$; ** – отмечены значения $p<0.01$.

Биохимические показатели спермоплазмы жеребцов в группах с низкой и нормальной прогрессивной подвижностью после криоконсервации

Фермент	Группа с прогрессивной подвижностью в оттаянной сперме <25%	Группа с прогрессивной подвижностью в оттаянной сперме >25%
АЛТ, Ед/л	2.90 [1.70; 4.10]*	1.50 [1.00; 1.70]
АСТ, Ед/л	116.30 [104.55; 169.35]*	69.30 [49.50; 87.80]
КК, Ед/л	51.10 [38.83; 85.55]	36.70 [21.00; 44.20]
α -амилаза, Ед/л	2.05 [1.78; 4.90]	1.80 [1.70; 2.30]
ЛДГ, Ед/л	97.40 [47.03; 419.43]*	21.50 [10.60; 36.90]
ЩФ, мккат/л	245.88 [209.60; 548.83]	288.33 [206.00; 344.93]
Цитохромоксидаза, у.е./мг белка	2.25[0.29; 5,76]	0.51 [0.23; 2.05]
H ⁺ -АТФаза, мкмоль фосфата/мг белка*час	169.47 [121.25; 184.75]*	69.16 [36.72; 120.47]
Цитрат, ммоль/л	2.44 [0.77; 5.61]	3.37[2.09; 5.92]
Лактат, ммоль/л	4.25 [2.24; 5.25]	3.89 [1.83; 6.42]
Сукцинат, нмоль/мкл	0.07[0.05; 0.14]	0.11[0.04; 0.16]
Глюкоза, ммоль/л	0.31[0.04; 0.58]	0.17[0.04; 0.52]
Фруктоза, мг/мл	0.80[0.65; 0.80]	0.70[0.50; 0.80]
ТАГ, ммоль/л	0.77[0.47; 1.42]	1.14[0.96; 1.47]

Примечание. * – отмечены значения $p < 0.05$.

Некоторые авторы рассматривают определение активности ЛДГ в качестве одного из прогностических ферментов для оценки качества спермы жеребцов. Так, согласно Pesch S. et al. (2006) активность ЛДГ достоверно коррелировала с прогрессивной подвижностью, соотношением живые:мертвые сперматозоиды и патоморфологией [31]. Однако по данным Dogan I. et al. (2008) была найдена лишь положительная корреляция активности ЛДГ спермоплазмы с объемом эякулята [32]. В нашем исследовании в группе жеребцов с прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации менее 25% наблюдалась более высокая активность ЛДГ ($p=0.017$) в спермоплазме по сравнению с группой с нормальной прогрессивной подвижностью (табл. 2). По-видимому, наблюдаемое нами увеличение активности АЛТ, АСТ и ЛДГ в спермоплазме жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью после криоконсервации могло быть связано с повреждением цитоплазматической мембраны сперматозоидов. Анализ показателей качества спермы может подтвердить данное предположение, поскольку группа с низкой прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации характеризовалась также низкой жизнеспособностью сперматозоидов по сравнению с группой с нормальной прогрессивной подвижностью (табл. 1).

Кроме того, мы обнаружили, что в группе жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью сперматозоидов после оттаивания также наблюдалась более высокая активность H⁺-АТФазы по сравнению с группой с нормальной прогрессивной подвижностью ($p=0.037$). H⁺-АТФаза отвечает за синтез АТФ в митохондриях и, по-видимому, играет важную роль в обеспечении сперматозоидов жеребцов энергией, поскольку сперматозоиды жеребцов отличаются от сперматозоидов других хорошо изученных видов млекопитающих тем, что их энергетические потребности удовлетворяются в большей степени не гликолитическими путями, а с помощью окислительного фосфорилирования [8]. Следует отметить, что также наблюдается тенденция к увеличению активности другого митохондриального фермента в спермоплазме жеребцов с прогрессивной подвижностью менее 25% – цитохромоксидазы, однако эти данные недостоверны (табл. 2). По-видимому, обнаруженная нами высокая активность митохондриальных ферментов в спермоплазме жеребцов данной группы связана с повреждением митохондриальной мембраны сперматозоидов, поскольку в ходе замораживания-оттаивания может происходить не только повреждение плазматической мембраны, но и мембраны митохондрий, что ведет к падению синтеза АТФ. Послед-

нее сопровождается снижением прогрессивной подвижности в сперматозоидах после криоконсервации [24]. Для подтверждения данного предположения перспективным является, на наш взгляд, изучение митохондриального потенциала сперматозоидов в изучаемых группах.

Таким образом, комплексный анализ качественных характеристик спермы жеребцов, а также изучение активности АЛТ, АСТ, ЛДГ и H⁺-АТФазы в спермоплазме жеребцов может использоваться для выявления особей со спермой высокого качества, устойчивой к процессу криоконсервации.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-16-00101.

Литература

1. Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen // *Animal reproduction science*. 2000. Vol. 60–61. P. 481–492. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10844218/> (дата обращения 25.03.2022).
2. Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise / H. Härtlová, R. Rajmon, I. Krontorádová, J. Mamica, L. Zita, P. Klabanová, A. Černocký // *Acta Veterinaria Brno*. 2013. Vol. 82. № 1. P. 31–35. URL: https://www.researchgate.net/publication/273962177_Semen_quality_lipid_peroxidation_and_seminal_plasma_antioxidant_status_in_horses_with_different_intensities_of_physical_exercise (дата обращения 25.03.2022).
3. Storey B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe // *International Journal of Developmental Biology*. 2008. Vol. 52. № 5–6. P. 427–437. URL: https://www.researchgate.net/publication/51422897_Mammalian_sperm_metabolism_Oxygen_and_sugar_friend_and_foe (дата обращения 25.03.2022).
4. Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS production / D. Varner, C. Moraes, S. Teague, G. Cortopassi, S. Datta, S. Meyers // *Biology of Reproduction*. 2016. Vol. 95. № 2. P. 1–11. URL: https://www.researchgate.net/publication/304358549_Lactate_and_Pyruvate_Are_Major_Sources_of_Energy_for_Stallion_Sperm_with_Dose_Effects_on_Mitochondrial_Function_Motility_and_ROS_Production (дата обращения 25.03.2022).
5. Lactate in contemporary biology: A phoenix risen / G.A. Brooks, R. Leija, J. Arevalo, C.C. Curl, A.D. Osmond, A. Tovar // *The Journal of Physiology*. 2021. Vol. 600. № 5. P. 1229–1251. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33566386/> (дата обращения 25.03.2022).
6. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility / E.B. Menezes, T. Dinh, A.A. Moura, A.L.C. Velho, F. Santos, A. Kaya, E. Memili, E. Topper // *BMC Genomics*. 2019. Vol. 20. P. 1–16. URL: https://www.researchgate.net/publication/335902804_Uncovering_sperm_metabolome_to_discover_biomarkers_for_bull_fertility (дата обращения 25.03.2022).
7. Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa / A. Medrano, E. Goldberg, T. Rigau, J. Fernandez-Novell, M. del Alamo, J. Rodriguez-Gil, L. Ramio-Lluch, J. Alvarez, J. Guinovart // *Molecular Reproduction and Development*. 2006. Vol. 73. № 3. P. 369–378. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16362974/> (дата обращения 25.03.2022).
8. Ferramosca A., Zara V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation // *BioMed Research International*. 2014. P. 1–8. URL: https://www.researchgate.net/publication/262022180_Bioenergetics_of_Mammalian_Sperm_Capacitation (дата обращения 25.03.2022).
9. In boar sperm capacitation L-lactate and succinate, but not pyruvate and citrate, contribute to the mitochondrial membrane potential increase as monitored via safranin O fluorescence / G. Paventi, S. Passarella, C. Lessard, J. Bailey // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015. Vol. 46. № 3. P. 257–262. URL: https://www.researchgate.net/publication/276067531_In_boar_sperm_capacitation_Llactate_and_succinate_but_not_pyruvate_and_citrate_contribute_to_the_mitochondrial_membrane_potential_increase_as_monitored_via_safranin_O_fluorescence (дата обращения 25.03.2022).
10. Juyena N.S., Stelletta C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa // *Journal of andrology*. 2012. Vol. 33. P. 536–551. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22111111/> (дата обращения 25.03.2022).
11. Seasonal changes in antioxidant defense systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract / M. Kozirowska-Gilun, M. Kozirowski, J. Strzezek, L. Fraser // *Reproductive biology and endocrinology*. 2011. Vol. 11. P. 37–47. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111111/> (дата обращения 25.03.2022).
12. Froman D.P., Feltmann A.J. A new approach to sperm preservation based on bioenergetic theory // *Journal of animal science*. 2010. Vol. 88. № 4. P. 1314–1320. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20111111/> (дата обращения 25.03.2022).
13. Nasrin S.J., Calogero S. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa // *Journal of Andrology*. 2012. Vol. 33. № 4. P. 536–551. URL: https://www.researchgate.net/publication/51733050_Seminal_Plasma_An_Essential_Attribute_to_Spermatozoa (дата обращения 25.03.2022).

14. Мурский С.И. Роль биохимических показателей спермальной плазмы в лабораторной диагностике репродуктивной функции у мужчин: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 2020. 197 с. URL: <https://docplayer.com/212067384-Murskiy-sergey-ivanovich-rol-biohimicheskikh-pokazateley-spermalnoy-plazmy-v-laboratornoy-diagnostike-reproduktivnoy-funkcii-u-muzhchin.html> (дата обращения 25.03.2022).
15. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels / L. Ramió-Lluch, M. Yeste, J. Fernández-Novell, E. Estrada, L. Rocha, J. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, I. Concha, A. Ramírez, J. Rodríguez-Gil // *Reproduction fertility and development*. 2014. Vol. 26. P. 883–897. URL: Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels (дата обращения 25.03.2022).
16. Presence of a unique male-specific extension of C-terminus to the cytochrome c oxidase subunit II protein coded by the male-transmitted mitochondrial genome of *Venustaconcha ellipsiformis* / R. Chakrabarti, J. Walker, D.T. Stewart, R.J. Trdan, S. Vijayaraghavan, J.P. Curole, W.R. Hoeh // *FEBS Letters*. 2006. Vol. 580. P. 862–866. URL: Presence of a unique male-specific extension of C-terminus to the cytochrome c oxidase subunit II protein coded by the male-transmitted mitochondrial genome of *Venustaconcha ellipsiformis* (дата обращения 25.03.2022).
17. Ritcher O.M., Ludwig B. Cytochrome c oxidase – structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine // *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2003. Vol. 147. P. 47–74. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12783267/> (дата обращения 25.03.2022).
18. Turner R.M.O., McDonnell S.M. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications // *Theriogenology*. 2003. Vol. 60. № 1. P. 1–10. URL: Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications (дата обращения 25.03.2022).
19. Сереброва В.Ю., Суханова Г.А. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов // Томск: Сибирский государственный медицинский университет. 2008. С. 79–82. URL: <https://search.rsl.ru/ru/record/01004145444> (дата обращения 25.03.2022).
20. Чупахина Г.Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум // Калининград. 2000. 59 с. URL: <https://studfile.net/preview/414659/> (дата обращения 25.03.2022).
21. Марсянова Ю.А., Звягина В.И. Методика определения активности цитохромоксидазы в гомогенатах тканей. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рационализаторское предложение № 1414 от 12.12.2019.
22. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation / L.S. Castro, T.R.S. Hamilton, C.M. Mendes, M. Nichi, V.H. Barnabe, J.A. Visintin, M. E. O. A. Assumpcao // *Journal of animal science and biotechnology*. 2016. Vol. 7. P. 17. URL: Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation (дата обращения 25.03.2022).
23. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine / N. Duru, M. Morshedi, A. Schuffner, S. Oehninger // *Fertility and sterility*. 2001. Vol. 75. № 2. P. 263–268. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11172825/> (дата обращения 25.03.2022).
24. Сравнение цитометрических методов оценки жизнеспособности нативных и криоконсервированных сперматозоидов человека / А.А. Доценко, М.К. Серебрякова, И.В. Кудрявцев, А.Н. Сухачев, А.В. Полевщиков // *Медицинский академический журнал*. 2020. Т. 20. № 1. С. 83–92. URL: https://journals.eco-vector.com/MAJ/article/view/19286/23184/ru_RU (дата обращения 25.03.2022).
25. Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa / B. Sion, L. Janny, D. Boucher, G. Grizard // *International journal of andrology*. 2004. Vol. 27. № 2. P. 108–114. URL: Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa (дата обращения 25.03.2022).
26. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa / M.N. Giraud, C. Motta, D. Boucher, G. Grizard // *Human Reproduction*. 2000. Vol. 15. № 10. P. 2160–2164. URL: Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa (дата обращения 25.03.2022).
27. El-Badry D.A.M., Gabr F.I.A. Biochemical and enzymatic studies on semen of Arabian stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing // *The Journal of the Egyptian Medical Association*. 2013. Vol. 73. № 4. P. 749–768. URL: https://www.researchgate.net/publication/297566361_Biochemical_and_enzymatic_studies_on_semen_of_Arabian_stallions_that_are_classified_'good'_or_'poor'_for_freezing (дата обращения 25.03.2022).
28. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse / B. Colenbrander, A. Fazeli, A. van Buiten, J. Parlevliet, B. Gadella // *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1992. № 88. P. 49–58. URL: <https://www.etis.ee/Portal/Publications/Display/f75fac76-ace7-4091-ab3c-6a73b2051f80> (дата обращения 25.03.2022).
29. Katila T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review // *Acta veterinaria Scandinavica*. 2001. № 42. P. 199–217. URL: https://www.researchgate.net/publication/11842319_In_

Vitro_Evaluation_of_Frozen-Thawed_Stallion_Semen_A_Review (дата обращения 25.03.2022).

30. Gundogan M. Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi Rams // Turkish journal of veterinary and animal sciences. 2006. Vol. 30. P. 95–100. URL: Some reproductive parameters (дата обращения 25.03.2022).

31. Pesch S., Bergmann M., Bostedt H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality // Theriogenology. 2006.

Vol. 66. № 2. P. 307–313. URL: Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality (дата обращения 25.03.2022).

32. Dogan I., Polat U., Nur Z. Correlations between seminal plasma enzyme activities and semen parameters in seminal fluid of Arabian horses // Iranian journal of veterinary research. 2009. Vol. 10. № 2. P. 119–124. URL: Correlations between seminal plasma enzyme activities and semen parameters in seminal fluid of Arabian horses (дата обращения 25.03.2022).

COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF SPERMOPLASM OF STALLIONS WITH NORMAL AND LOW PROGRESSIVE SPERM MOTILITY AFTER CRYOPRESERVATION

© М.М. Атрощенко¹, А.М. Шитикова², В.И. Звягина², М.Г. Енгальчева²,
Yu.A. Marsyanova², Yu.E. Novikova², М.А. Zhirkova²

¹All-Russian Research Institute for Horse Breeding,
Ryazan Oblast, Rybnovskij District, 391105, Russian Federation

²Ryazan State Medical University,
9, ulitsa Vysokovol'tnaya, 390026, Ryazan, Russian Federation

The aim of this work was to perform a comparative analysis of the biochemical parameters of spermoplasm of stallions with normal and low sperm progressive motility after cryopreservation. Seminal plasma of 34 Arabian stallions was collected during the breeding season (February-May). The activity of H⁺-ATPase was determined on the SF-2000 spectrophotometer (OKB Spectrum LLC, Russia), the activity of alkaline phosphatase (ALP), creatine kinase (CK), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), α -amylase (AA), lactate dehydrogenase (LDH), as well as the concentration of triacylglycerin (TAG), glucose and fructose – on a biochemical analyzer AU 680 (Beckman Coulter, USA), cytochrome oxidase activity, lactate and citrate concentration – on a semi-automatic analyzer Stat Fax 1904+ (Awareness Technology Inc, USA). The succinate content was determined on an IF analyzer StatFax 3200 (Awareness Technology Inc, USA). Statistical analysis was carried out using the Statistica 10 program and the nonparametric Mann-Whitney U-test. It was found that in the spermoplasm of stallions with low progressive sperm motility after freezing-thawing, the activity of ALT (p=0.012), AST (p=0.012), LDH (p=0.017) and H⁺-ATPase (p=0.037) is statistically significantly higher than in the spermoplasm of stallions with normal progressive sperm motility after cryopreservation. The results obtained may be associated with damage to the cytoplasmic and mitochondrial membranes of spermatozoa, which leads to a drop in ATP synthesis. The latter may be accompanied by a decrease in progressive motility in spermatozoa after cryopreservation. The research was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 20-16-00101.

Keywords: cryopreservation, stallions, spermoplasm, ALT, AST, LDH, H⁺-ATPase.