

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ*
(обзор)М.М. АТРОЩЕНКО[✉], Д.В. МЕДВЕДЕВ

Семенная плазма представляет собой многокомпонентную жидкость, служащую средством доставки сперматозоидов к ооциту. Она не только транспортирует мужские гаметы, но и обеспечивает их защиту и питание во время дальнейшего движения в женских половых путях (T.R. Talluri с соавт., 2017). Сведения о воздействии компонентов семенной плазмы на половые клетки, а также поиск маркеров криоустойчивости и фертильности спермы представляет несомненный интерес для исследователей. Поскольку продолжительность жизни сперматозоидов жеребцов, их способность к капацитации и фертильность сильно различаются у разных особей, для коневодства важно исследовать факторы, влияющие на эти показатели. Цель нашего обзора — проанализировать актуальные публикации по исследованию биохимических маркеров, характеризующих качество спермы, рассмотреть методы определения активных форм кислорода и продуктов окислительного стресса в сперматозоидах и семенной плазме. Биохимическими маркерами качества спермы могут служить метаболиты семенной плазмы, активность ферментов в ней, показатели оксидативного стресса и системы антиоксидантной защиты (S. Pesch с соавт., 2006). Для обеспечения подвижности сперматозоидам необходимо большое количество АТФ. Хорошими энергетическими субстратами для этих клеток служат моносахариды и органические кислоты, такие как лактат, пируват, цитрат, сукцинат. Это обуславливает интерес к ним как к маркерам фертильности (C.R. Darg с соавт., 2016; E.V. Menezes с соавт., 2019; M.F. Lay с соавт., 2001). Еще один перспективный показатель для оценки качества спермы жеребцов — концентрация метаболитов оксида азота (NO), который играет важную роль в регуляции подвижности и капацитации сперматозоидов и в процессе оплодотворения (M.B. Negro с соавт., 2000; P.T. Goud с соавт., 2008; F. Francavilla с соавт., 2000). Среди ферментов семенной плазмы интерес представляют лактатдегидрогеназа, аланин- и аспартатаминострасферазы, гамма-глутамилтранспептидаза. Несмотря на то, что анализ спермы считается золотым стандартом для диагностики мужской фертильности, он не может обнаружить аномалии на молекулярном уровне, которые ответственны за необъяснимые случаи мужского бесплодия. В настоящее время одной из основных причин таких явлений считается оксидативный стресс. Он приводит к повреждению белков, липидов и ДНК сперматозоидов, что, в свою очередь, становится причиной плохой имплантации эмбриона и снижения частоты наступления беременности (A. Agarwal с соавт., 2003; S. Bisht с соавт., 2017; H. Sies, 2018). В настоящем обзоре рассмотрены основные продуценты свободных радикалов в сперме и система антиоксидантной защиты мужских гамет, а также описаны методы определения активных форм кислорода и конечных продуктов оксидативного стресса в сперматозоидах и семенной плазме. На основании данных литературы сделан вывод о том, что биохимические маркеры, такие как концентрация метаболитов семенной плазмы, активность ферментов в ней и показатели оксидативного стресса, обладают значительным потенциалом для характеристики качества спермы жеребцов.

Ключевые слова: жеребцы, фертильность, сперматозоиды, семенная плазма, окислительный стресс, ферменты, метаболиты.

Сперма состоит из сперматозоидов, взвешенных в жидкой среде, называемой семенной плазмой, которая секретируется придатками семенника и придаточными половыми железами до и во время эякуляции. Семенная плазма представляет собой сложную жидкость, которая служит транспортным средством для доставки эякулированных сперматозоидов по пути от семенников к их мишени — ооциту. Семенная плазма не только транспортирует сперматозоиды, но и обеспечивает их защиту и питание во время дальнейшего движения в женских половых путях (1). Она состоит из различных биохимических компонентов, таких как белки (в том числе антиоксидантные и внутриклеточные ферменты), метаболиты, минеральные элементы, которые важны для функционирования сперматозоидов (2). Оценка этих показателей была рекомендована в качестве маркеров качества

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-16-00101.

спермы, поскольку они указывают на выполняемую функцию и характеризуют повреждение сперматозоидов (3).

Анатомия придаточных половых желез, состав их секретов, химический состав семенной плазмы различаются не только между видами животных, но и между особями внутри породы (3). Поскольку продолжительность жизни сперматозоидов, их способность к капациации и фертильность жеребцов неодинаковы у разных особей, для всесторонней комплексной оценки репродуктивного статуса производителей необходимо исследовать факторы, влияющие на эти показатели.

Цель нашего обзора — проанализировать актуальные публикации по исследованию биохимических маркеров, характеризующих качество спермы жеребцов, и рассмотреть методы определения активных форм кислорода и продуктов окислительного стресса в сперматозоидах и семенной плазме.

Метаболиты спермоплазмы. Значительный интерес представляет изучение метаболитов семенной плазмы как маркеров фертильности жеребцов. Определение концентрации метаболитов осуществляется достаточно просто и может дать информацию о фертильности и заболеваниях животных. Семенная плазма содержит большое количество органических соединений. Так, исследование метаболома спермоплазмы быков методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием выявило 63 метаболита (4). Из низкомолекулярных органических соединений в ней было больше всего фруктозы, лимонной, молочной, фосфорной кислот и мочевины. При этом сперма жеребцов имеет ряд особенностей, одна из которых — низкая концентрация фруктозы и низкая фруктолитическая активность сперматозоидов в анаэробных условиях (5).

Подвижность сперматозоидов — одно из важнейших свойств, определяющих фертильность самцов. Движение сперматозоидов по половым путям самки осуществляется самостоятельно и против движения жидкости. Для обеспечения подвижности необходимо значительное количество энергии. В связи с этим сперматозоиды используют разные способы получения АТФ — гликолиз в цитоплазме (в том числе за счет вовлечения в него фруктозы) и окислительное фосфорилирование в митохондриях. Считается, что важным субстратом для получения энергии мужскими половыми клетками, в том числе у жеребцов, в аэробных условиях служит пируват (6). Помимо окислительного декарбоксилирования пирувата и цикла Кребса, в сперматозоидах может происходить β -окисление жирных кислот в качестве источника восстановленных коферментов для дыхательной цепи (7). Также есть данные, что в митохондриях сперматозоидов присутствует лактатооксилирующий комплекс, что позволяет им активно утилизировать лактат как источник пирувата в аэробных условиях (7, 8). Следовательно, содержание молочной кислоты в семенной плазме служит важным показателем энергетического обмена сперматозоидов.

Цитрат — еще один необходимый компонент семенной плазмы — поступает в спермоплазму в основном с секретом предстательной железы. Несмотря на наличие в сперматозоидах митохондрий, считается, что использование цитрата в цикле трикарбоновых кислот не оказывает существенного влияния на его концентрацию в спермоплазме, поскольку основным источником энергии для передвижения сперматозоидов служат углеводы. Основной функцией цитрата считается связывание катионов спермоплазмы и поддержание осмотического равновесия (8). Получены данные, что концентрация цитрата в спермоплазме отражает содержание андрогенов у млекопитающих (9).

Сукцинат также представляет интерес в качестве энергетического

субстрата для сперматозоидов. Одно из недавних исследований продемонстрировало, что янтарная кислота — хороший субстрат для окисления в митохондриях при капацитации сперматозоидов, обеспечивающий увеличение их протонного потенциала (10). Авторы предполагают, что сукцинат транспортируется внутрь митохондрий с помощью дикарбоксилатного транспортера.

Информацию о фертильности может дать исследование метаболитов оксида азота. NO участвует во многих физиологических процессах, включая регуляцию репродуктивной функции (11). Среди прочего он важен для сперматогенеза, эрекции полового члена, фолликулогенеза и овуляции (12). В сперматозоидах NO играет важную роль в регуляции подвижности и капацитации сперматозоидов (13). Однако влияние NO на сперматозоиды млекопитающих дозозависимо: низкие количества NO полезны, в то время как высокие представляются вредными (14). Сперматозоиды способны производить NO, и его синтез имеет решающее значение для подвижности, капацитации и оплодотворения (15-17). Показано, что NO стимулирует подвижность сперматозоидов человека посредством активации растворимой гуанилатциклазы, последующего синтеза цГМФ и активации цГМФ-зависимых протеинкиназ (18). Информация о роли системы NO в репродукции жеребцов достаточно ограничена (19). Однако иммуногистохимические исследования продемонстрировали наличие в репродуктивной системе жеребцов всех трех изоформ синтазы оксида азота NOS (eNOS, nNOS и iNOS), при этом их экспрессия варьировалась между различными типами клеток (20). У жеребцов наблюдается положительная корреляция между продукцией NO, с одной стороны, и подвижностью и скоростью движения сперматозоидов после оттаивания — с другой (21). У старых особей концентрация метаболитов NO в семенной плазме ниже, чем у молодых (21).

Ферменты семенной плазмы. Оценка активности ферментов в семенной плазме может быть рекомендована как биологический маркер качества семенной жидкости, поскольку их содержание характеризует функцию и отражает целостность сперматозоидов (22, 23). Изменения активности ферментов семенной плазмы необходимо трактовать, учитывая то, где локализован фермент и как он попадает в спермоплазму — активно секретруется или оказывается в ней из-за нарушения целостности и повышения проницаемости мембран. Так, щелочная фосфатаза происходит главным образом из семенников и придатков семенников, и ее можно использовать в качестве маркера для дифференциации азооспермии или олигоспермии от эякуляторной недостаточности в клинических случаях (24). Кроме того, этот фермент выделяется из плазматической мембраны сперматозоидов (25).

Аспаратаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ) — это внутриклеточные ферменты, обнаруженные в цитоплазматических каплях сперматозоидов (26). Повышение активности АСТ и АЛТ в спермоплазме жеребцов может быть связано с повреждениями мембраны сперматозоидов (23). Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) обнаружена в цитозоле, митохондриях и на плазматической мембране сперматозоидов (27). Известно, что фермент гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ) находится на внешнем участке сперматозоидов (28). ГГТ — фермент, участвующий в гамма-глутамильном цикле, осуществляющем транспорт аминокислот через мембраны. В клетках фермент присутствует не только в цитоплазматической мембране, но и в лизосомах и цитоплазме.

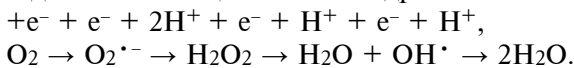
В исследовании S. Pesch с соавт. (23) активность ЛДГ значительно коррелировала с подвижностью, соотношением живых и мертвых сперматозоидов жеребцов и их патоморфологией. Авторы пришли к выводу, что

ЛДГ можно считать наиболее прогностически значимым ферментом для определения качества спермы.

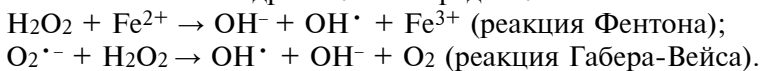
Показатели оксидативного стресса и фертильность жеребцов. Несмотря на то, что анализ спермы считается золотым стандартом для диагностики мужской фертильности, он не может обнаружить аномалии на молекулярном уровне, которые ответственны за необъяснимые случаи бесплодия (29, 30). В настоящее время оксидативный стресс (ОС) считается одной из основных причин необъяснимых случаев мужского бесплодия (31). ОС приводит к повреждению белков, липидов и ДНК сперматозоидов, что, в свою очередь, становится причиной плохой имплантации эмбриона и снижения частоты наступления беременности. Помимо этого, он также влияет на здоровье потомства и может вызывать мутации в зародышевой линии, приводя к тяжелым патологиям, полигенным расстройствам и даже раковым заболеваниям (32).

Оксидативный стресс — это дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, приводящий к нарушению окислительно-восстановительной сигнализации и/или молекулярному повреждению (33). Повреждение клеток при ОС происходит в основном вследствие действия активных форм кислорода (АФК), которые представлены свободными радикалами — соединениями, имеющими неспаренные электроны, такими как гидроксильный радикал (OH^\bullet), супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), пероксидные радикалы ($\text{RO}_2^{\bullet-}$), а также нерадикальными молекулами, обладающими свойствами окислителей, — синглетным кислородом, перекисью водорода (H_2O_2), хлорноватистой кислотой (HOCl), пероксидами липидов (LOOH), озоном (O_3) (34). Помимо АФК, важную роль в повреждении молекул при ОС отводят активным формам азота — оксиду азота (NO) и пероксинитриту (ONOO^-), хотя в некоторых случаях для этого процесса используют название нитрозативный стресс.

Из АФК наиболее важны для сперматозоидов супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (OH^\bullet) (35). Эти соединения последовательно образуются при восстановлении кислорода в дыхательной цепи митохондрий:



Супероксид и гидроксильный радикал — нестабильные соединения, период их полураспада составляет соответственно милли- и наносекунды, вследствие чего эти радикалы реагируют в месте своего образования (36). Перекись водорода может быть источником образования наиболее реакционно активной АФК — гидроксильного радикала:



В физиологических концентрациях АФК участвуют в капацитации, стимулируя синтез аденилатциклазы (37), в акросомной реакции, регулируя активность протеинкиназ (27), и в слиянии сперматозоида с ооцитом, ингибируя протеинтирозинфосфатазу и поддерживая таким образом активность фосфолипазы A_2 (38).

Два наиболее важных источника АФК для спермы — лейкоциты и незрелые сперматозоиды (39). Лейкоциты, особенно нейтрофилы и макрофаги, тесно связаны с чрезмерным производством АФК, приводящим к дисфункции мужских гамет (32). В них образуется примерно в 1000 раз больше АФК, чем в сперматозоидах. Они играют значительную роль в инфекциях половых путей, воспалении и механизмах клеточной защиты (40, 41). Одно из недавних исследований выявило положительную корреляцию

между количеством лейкоцитов, АФК и числом сперматозоидов с фрагментированной ДНК и отрицательную корреляцию между количеством лейкоцитов, концентрацией сперматозоидов и их подвижностью (42).

Сперматозоиды жеребцов называют «профессиональными» производителями АФК (в основном супероксида и H_2O_2) из-за высокой митохондриальной активности. Для них характерна сложная система контроля окислительно-восстановительного гомеостаза (43). Поскольку АФК повреждают клеточные структуры, рядом с которыми образуются, изучение продукции АФК в сперматозоидах представляет существенный интерес. Наиболее важны для производства АФК в сперматозоидах митохондрии и цитоплазматическая мембрана. Появление незрелых сперматозоидов, особенно с избытком остаточной цитоплазмы, а также различные аномалии сперматозоидов (остаточная цитоплазма или цитоплазматические капли) связаны с чрезмерным образованием АФК (44, 45). Обычно такие сперматозоиды удаляются клетками Сертоли в процессе сперматогенеза. Избыточное образование АФК в цитоплазматических каплях связывают с наличием в них фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, продуцирующего НАДФ·Н, который затем окисляется двумя оксидоредуктазами, расположенными соответственно в цитоплазматической и митохондриальной мембранах (46).

Антиоксидантная защита сперматозоидов. Специфическая клеточная структура сперматозоидов и их плазматической мембраны, большое число митохондрий, малый объем цитоплазмы и низкое количество находящихся в ней антиоксидантов делают мужские гаметы достаточно уязвимыми для повреждения свободными радикалами (47). В сперматозоидах присутствуют ферментные и неферментные антиоксиданты. Ферментные антиоксиданты — это белки, нейтрализующие избыток АФК и предотвращающие повреждение клеточной структуры. К ним относят супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу (48). В настоящее время эти ферменты рассматриваются как возможные маркеры криотолерантности сперматозоидов жеребцов (49, 50).

СОД (ЕС 1.15.1.1) катализирует реакцию $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Основная задача супероксиддисмутаза — удаление супероксидного анион-радикала. Супероксид постоянно образуется в процессе жизнедеятельности клетки как первый промежуточный продукт в реакциях восстановления O_2 . Его основной продуцент — дыхательная цепь митохондрий (51). СОД — важнейший фермент, обеспечивающий биодоступность NO, поскольку предотвращает его взаимодействие с супероксидом и превращение в пероксинитрит (52). В семенной плазме хряка обнаруживается экстрацеллюлярная СОД, содержащая в качестве кофакторов Cu и Zn (53). Результаты исследования М. Kowalowka с соавт. (53) показывают, что у кабана экстрацеллюлярная СОД служит антиоксидантным ферментом семенной плазмы, который играет важную физиологическую роль в противодействии оксидативному стрессу в сперматозоидах. Продемонстрировано, что у жеребцов, чьи эякуляты обладают хорошей способностью к замораживанию, активность СОД выше, чем в группе с низкой криорезистентностью, что связывают с сохранением целостности акросомальной мембраны (49, 50).

Каталаза (ЕС 1.11.1.6) — фермент, катализирующий реакцию диспропорционирования перекиси водорода $2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$. Этот гемпротеин также способен окислять низкомолекулярные спирты и нитриты в присутствии перекиси водорода. Наличие каталазы в сперме было продемонстрировано на примере барана и крупного рогатого скота. Она потенциально играет роль в процессе старения и контроле ОС в клетках (54). Наряду с СОД и глутатионпероксидазой каталаза служит основным эндо-

генным антиоксидантным ферментом семенной плазмы жеребцов (55).

Глутатионпероксидазы (ЕС 1.11.1.9 и ЕС 1.11.1.12) катализируют восстановление H_2O_2 или органических гидропероксидов до воды или соответствующих спиртов с использованием восстановленного глутатиона: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$. Некоторые изоферменты глутатионпероксидазы содержат в качестве кофактора селен, который в их активном центре связан с цистеином (56). Поддержание уровня восстановленного глутатиона внутри клеток осуществляется благодаря глутатионредуктазе, восстанавливающей глутатион, и ГГТ, транспортирующей глутатион внутрь клетки.

К неферментным антиоксидантам относят витамин С, витамин Е, цинк, селен, таурин, гипотаурин и глутатион (34). Многие из них проявляют свои свойства, будучи кофакторами (селен для глутатионпероксидазы, цинк для СОД) или коферментами (глутатион для глутатионпероксидазы) антиоксидантных ферментов. Витамин Е способен напрямую реагировать с пероксидными радикалами, последовательно окисляясь в достаточно стабильный токоферил-радикал, а затем в токоферилхинон, прерывая цепные реакции свободнорадикального окисления. Большое число исследований в настоящее время посвящено изучению влияния добавляемых извне антиоксидантов на качество и сохранность спермы (34, 54, 55).

Методы определения АФК и конечных продуктов ОС в сперматозоидах и семенной плазме. Для изучения ОС представляет интерес определение генерации как АФК, так и конечных продуктов свободнорадикального окисления.

Один из достаточно стабильных продуктов перекисного окисления липидов — малоновый диальдегид, который обычно определяют по реакции с тиобарбитуровой кислотой (57). Кроме малонового диальдегида в реакцию вступают и некоторые другие соединения, вместе их называют субстанции, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS). Имеются данные, что содержание TBARS повышается в замороженной, но не в охлажденной сперме быков (58). В то же время не было выявлено различий в концентрации малонового диальдегида в свежей и замороженной сперме у здоровых мужчин (59).

Окисление белков под действием свободных радикалов приводит к образованию карбонильных групп, фрагментации и агрегации белковых молекул. Эти модификации способны повлиять на функции белков. Карбонильные производные аминокислотных остатков в белках — стабильные конечные продукты окисления протеинов, что делает их определение информативным методом изучения окислительной модификации белков (60). Оценить их количественно можно по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Образующиеся при этом 2,4-динитрофенилгидразоны обладают специфическим спектром поглощения в видимой и ультрафиолетовой части спектра (61).

Для прямого измерения генерации АФК сперматозоидами можно использовать хемилюминесцентный анализ: специальные реагенты взаимодействуют с конечными продуктами окисления, в результате чего возникает электрический сигнал, который можно измерить как количество фотонов в минуту с помощью люминометра (62). Этот анализ эффективен для измерения как внутриклеточных, так и внеклеточных АФК.

Другой тест для измерения внутриклеточных АФК сперматозоидов — проточная цитометрия с использованием флуоресцентных и хемилюминесцентных зондов (63). Самая распространенная методика — с диацетатом 2'-7'-дихлордигидрофлуоресцеина, который позволяет напрямую оценивать окислительно-восстановительный статус клетки (64). Еще один простой и

экономичный тест для измерения количества АФК с использованием светового микроскопа — реакция с нитросиним тетразолием. Принцип метода основан на превращении нитросинего тетразолия в синий пигмент диформазан при взаимодействии с супероксидом, вырабатываемым сперматозоидами или лейкоцитами (62).

Таким образом, в настоящее время изучение воздействия компонентов семенной плазмы на половые клетки, а также поиск маркеров криоустойчивости и фертильности спермы жеребцов вызывают несомненный интерес. Семенная плазма содержит большое количество компонентов (метаболитов, ферментов, антиоксидантов), влияющих на структурную целостность, прогрессивную подвижность и оплодотворяющую способность сперматозоидов. Среди метаболитов внимание сосредоточено на энергетических субстратах — пирувате, лактате, цитрате, сукцинате. Сперматозоиды жеребцов весьма уязвимы к действию повреждающих факторов при криоконсервации, в частности к оксидативному стрессу из-за значительного содержания полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах плазматической мембраны. В связи с этим для оценки эякулятов перспективны методы изучения окислительно-восстановительного статуса: определение субстанций, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, продуктов окислительной модификации белков, метаболитов NO, хемилюминисцентный анализ, проточная цитометрия. Предпринимаются активные попытки обнаружить маркеры устойчивости спермы жеребцов к замораживанию и последующему оттаиванию среди антиоксидантных ферментов — СОД, каталазы, глутатионпероксидазы. Биохимические маркеры, такие как концентрация метаболитов семенной плазмы, активность ферментов в ней и показатели окислительного стресса, обладают значительным потенциалом для характеристики качества и криоустойчивости спермы жеребцов.

ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства,
391105 Россия, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Дивово,
e-mail: atromiks-77@mail.ru ✉, meddmit@mail.ru

Поступила в редакцию
7 сентября 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2023, V. 58, № 2, pp. 249-259

BIOCHEMICAL MARKERS OF STALLION SPERM QUALITY (review)

M.M. Atroshchenko ✉, *D.V. Medvedev*

All-Russian Research Institute for Horse Breeding, Divovo, Rybnoe District, Ryazan Province, 391105 Russia, e-mail atromiks-77@mail.ru (✉ corresponding author), meddmit@mail.ru

ORCID:

Atroshchenko M.M. orcid.org/0000-0001-6023-0332 Medvedev D.V. orcid.org/0000-0002-0627-7348

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially from the Russian Science Foundation (grant No. 20-16-00101)

Final revision received September 7, 2022,

doi: 10.15389/agrobiology.2023.2.249eng

Accepted October 6, 2022

Abstract

Seminal plasma is a multicomponent fluid that serves as a vehicle for delivering spermatozoa to the oocyte. This fluid transports male gametes and provides their protection and nutrition during further movement in the female genital tract (T.R. Talluri et al., 2017). Thereby, understanding the effect of the components of seminal plasma on reproductive cells, as well as the search for markers of cryo-resistance and sperm fertility is undoubtedly interesting for researchers. Because stallion sperm lifespan, capacitation capacity, and fertility vary widely between individuals, it is important for horse breeding to investigate the factors that influence these parameters. The purpose of our review is to analyze current publications on the study of biochemical markers that characterize sperm quality and to consider methods for determining reactive oxygen species and oxidative stress products in

spermatozoa and seminal plasma. Metabolites of seminal plasma, enzymes activity in it, indicators of oxidative stress and antioxidant defense system can serve as biochemical markers of sperm quality (S. Pesch et al., 2006). To ensure motility, spermatozoa need a large amount of ATP. Monosaccharides and organic acids such as lactate, pyruvate, citrate, succinate are good energy substrates for these cells. This gives rise to interest in them as markers of fertility (C.R. Darr et al., 2016; E.B. Menezes et al., 2019; M.F. Lay et al., 2001). The concentration of nitric oxide (II) metabolites is another promising indicator for assessing the quality of stallions sperm, since it plays an important role in the regulation of sperm motility and capacitation and the fertilization process (M.B. Herrero et al., 2000; P.T. Goud et al., 2008; F. Francavilla et al., 2000). Among enzymes of seminal plasma, lactate dehydrogenase, alanine and aspartate aminosferases, γ -glutamyl transpeptidase are of interest. While semen analysis is considered the gold standard for diagnosing male fertility, it cannot detect the molecular abnormalities that are responsible for unexplained cases of male infertility. Currently, oxidative stress is considered one of the main causes of such phenomena. It damages sperm proteins, lipids and DNA, which in turn leads to poor embryo implantation and a decrease in pregnancy rates. In this review, the main producers of free radicals in sperm and the antioxidant defense system of male gametes as well as methods for the determination of reactive oxygen species and end products of oxidative stress in spermatozoa and seminal plasma are considered (A. Agarwal et al., 2003; S. Bisht et al., 2017; H. Sies, 2018). Based on the literature data, it was concluded that biochemical markers, such as seminal plasma metabolites, enzyme activity in it, and indicators of oxidative stress, have significant potential for characterizing stallion sperm quality.

Keywords: stallions, fertility, spermatozoa, seminal plasma, oxidative stress, enzymes, metabolites.

REFERENCES

1. Talluri T.R., Mal G., Ravi S.K. Biochemical components of seminal plasma and their correlation to the fresh seminal characteristics in Marwari stallions and Poitou jacks. *Veterinary World*, 2017, 10(2): 214-220 (doi: 10.14202/vetworld.2017.214-220).
2. Juyena N.S., Stelletta C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*, 2012, 33(4): 536-551 (doi: 10.2164/jandrol.110.012583).
3. Tvrdá E., Sikeli P., Lukacova J., Massanyi P., Lukac N. Mineral nutrients and male fertility. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2013, 3(1): 1-14.
4. Velho A.L.C., Menezes E., Dinh T., Kaya A., Topper E., Moura A.A., Memili E. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *PLoS ONE*, 2018, 13(4): e0195279 (doi: 10.1371/journal.pone.0195279).
5. Mann T. Biochemistry of stallion semen. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 1975, 23: 47-52.
6. Darr C.R., Varner D.D., Teague S., Cortopassi G.A., Datta S., Meyers S.A. Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS production. *Biology of Reproduction*, 2016, 95(2): 1-11 (doi: 10.1095/biolreprod.116.140707).
7. Menezes E.B., Velho A.L.C., Santos F., Dinh T., Kaya A., Topper E., Moura A.A., Memili E. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 714 (doi: 10.1186/s12864-019-6074-6).
8. Lay M.F., Richardson M.E., Boone W.R., Bodine A.B., Thurston R.J. Seminal plasma and IVF potential. Biochemical constituents of seminal plasma of males from in vitro fertilization couples. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2001, 18(3): 144-150 (doi: 10.1023/a:1009420306173).
9. Mann T. The Biochemistry of semen and of the male reproductive tract. *Medical Journal of Australia*, 1965, 1(18): 652-653 (doi: 10.5694/j.1326-5377.1965.tb72030.x).
10. Paventi G., Lessard C., Bailey J.L., Passarella S. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 462(3): 257-262 (doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.128).
11. Herrero M.B., Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of Andrology*, 2001, 22: 349-356.
12. Roselli M., Keller P.J., Dubey R.K. Role of nitric oxide in the biology physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*, 1998, 4(1): 3-24 (doi: 10.1093/humupd/4.1.3).
13. Balercia G., Moretti S., Vignini A., Magagnini M., Mantero F., Boscaro M., Riccardo-Lamonica G., Mazzanti L. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *Journal of Andrology*, 2004, 25(2): 245-249 (doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02784.x).
14. Vignini A., Nanetti L., Buldreghini E., Moroni C., Ricciardo Lamonina G., Mantero F., Boscaro M., Mazzanti L., Balercia G. The production of peroxynitrite by human spermatozoa may affect sperm motility through the formation of protein nitrotyrosine. *Fertility and Sterility*, 2006, 85(4): 947-953 (doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.09.027).

15. Herrero M.B., Chatterjee S., Lefièvre L., de Lamirande E., Gagnon C. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 29(6): 522-536 (doi: 10.1016/s0891-5849(00)00339-7).
16. Goud P.T., Goud A.P., Diamond M.P., Gonik M.P., Abu-Soud H. Nitric oxide extends the oocyte temporal window for optimal fertilization. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008, 45(4): 453-459 doi: (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.035).
17. Francavilla F., Santucci R., Macerola B., Ruvolo G., Romano R. Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding. *Biology of Reproduction*, 2000, 63(2): 425-429 (doi: 10.1095/biolreprod63.2.425).
18. Miraglia E., De Angelis F., Gazzano E., Hassanpour H., Bertagna A., Aldieri E., Revelli A., Ghigo D. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reproduction*, 2011, 141(1): 47-54 (doi: 10.1530/REP-10-0151).
19. Khan F.A., Sholtz E.L., Chenier T.S. The nitric oxide system in equine reproduction: current status and future directions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2015, 35(6): 481-487 (doi: 10.1016/j.jevs.2015.02.009).
20. Ha T.Y., Kim H.S., Shin T. Expression of constitutive endothelial, neuronal and inducible nitric oxide synthase in the testis and epididymis of horse. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2004, 66(4): 351-356 (doi: 10.1292/jvms.66.351).
21. Ortega Ferrusola C., González Fernández L., Macías García B., Salazar-Sandoval C., Morillo Rodríguez A., Rodríguez Martínez H., Tapia J.A., Peña F.J. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 2009, 81: 1106-1111 (doi: 10.1095/biolreprod.109.078220).
22. Eghbali M., Alavi-Shoushtari S.M., Asri-Rezaei S., Ansari M.H.K. Effects of the seminal plasma iron and lead content on semen quality of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Veterinary Research Forum*, 2010, 1(3): 142-148.
23. 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, 66(2): 307-313 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.11.015).
24. El-Bishbishy H.A., Aly H.A.A., El-Shafey M. Lipoic acid mitigates bisphenol A-induced testicular mitochondrial toxicity in rats. *Environmental Health*, 2013, 29(10): 875-887 (doi: 10.1177/0748233712446728).
25. Bucci D., Isani G., Giaretta E., Spinaci M., Tamanini C., Ferlizza E., Galeati G. Alkaline phosphatase in boar sperm function. *Andrology*, 2014, 2(1): 100-106 (doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00159.x).
26. Katila T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2001, 42(2): 199-217 (doi: 10.1186/1751-0147-42-199).
27. O'Flaherty C., Breininger E., Beorlegui N., Beconi M.T. Acrosome reaction of bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochimica et Biophysica Acta — General Subjects*, 2005, 1726(1): 96-101 (doi: 10.1016/j.bbagen.2005.07.012).
28. Agarwal Y.P., Vanha-Perttula T. Glutathione, L-glutamic acid and γ -glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. *International Journal of Andrology*, 1988, 11(2): 123-131 (doi: 10.1111/j.1365-2605.1988.tb00988.x).
29. Pizzol D., Ferlin A., Garolla A., Lenzi A., Bertoldo A., Foresta C. Genetic and molecular diagnostics of male infertility in the clinical practice. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2014, 19: 291-303 (doi: 10.2741/4208).
30. Ramya T., Misro M.M., Sinha D., Nandan D. Sperm function and seminal oxidative stress as tools to identify sperm pathologies in infertile men. *Fertility and Sterility*, 2010, 93(1): 297-300 (doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.074).
31. Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 2003, 79(4): 829-843 (doi: 10.1016/s0015-0282(02)04948-8).
32. Bisht S., Faiq M., Tolahunase M., Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 2017, 14(8): 470-485 (doi: 10.1038/nrurol.2017.69).
33. Sies H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 2018, 7(2): 122-126 (doi: 10.1016/j.cotox.2018.01.002).
34. Bansal A.K., Bilaspuri G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2010, 2011: 686137 (doi: 10.4061/2011/686137).
35. Kumar N., Singh A.K. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 2018, 47: 565-572 (doi: 10.1016/j.jogoh.2018.06.008).
36. Miranda-Vilela A.L., Alves P.C., Akimoto A.K., Pereira L.C., Nazare Klautau-Guimaraes M.D., Grisolia C.K. The effect of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on leukocytes depends on age and physical training in healthy human subjects carrying the same genotypes of antioxidant enzymes' gene polymorphisms. *American Journal of Human Biology*, 2010, 22(6): 807-812 (doi: 10.1002/ajhb.21086).
37. Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, 187(2): 139-144 (doi: 10.1016/s0303-7207(01)00704-3).

38. Khosrowbeygi A., Zarghami N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 2007, 77(2): 117-121 (doi: 10.1016/j.plefa.2007.08.003).
39. Garrido N., Meseguer M., Simon C., Pellicer A., Remohi J. Pro-oxidative and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 2004, 6(1): 59-65.
40. Henkel R.R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 2011, 13(1): 43-52 (doi: 10.1038/aja.2010.76).
41. Saleh R.A., Agarwal A., Kandirali E., Sharma R.K., Thomas A.J., Nada E.A, Evenson D.P., Alvarez J.G. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 2002, 78(6): 1215-1224 (doi: 10.1016/s0015-0282(02)04237-1).
42. Lobascio A.M., De Felici M., Anibaldi M., Greco P., Minasi M.G., Greco E. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology*, 2015, 3(2): 265-270 (doi: 10.1111/andr.302).
43. Peña F.J., O'Flaherty C., Ortiz Rodríguez J.M., Martín Cano F.E., Gaitskell-Phillips G.L., Gil M.C., Ortega Ferrusola C. Redox regulation and oxidative stress: the particular case of the stallion spermatozoa. *Antioxidants*, 2019, 8(11): 567 (doi: 10.3390/antiox8110567).
44. Keating J., Grundy C.E., Fivley P.S., Elliott M., Robinson J. Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1997, 110(1): 71-77 (doi: 10.1530/jrf.0.1100071).
45. Zini A., Defreitas G., Freeman M., Hechter S., Jarvi K. Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 2000, 74(3): 461-464 (doi: 10.1016/s0015-0282(00)00703-2).
46. Sabeti P., Pourmasumi S., Rahiminia T., Akyash F., Talebi A.R. Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 2016, 14(4): 231-240.
47. Bollwein H., Fuchs I., Koess C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(2): 189-195 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00876.x).
48. Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005, 3: 28 (doi: 10.1186/1477-7827-3-28).
49. Catalán J., Yáñez-Ortiz I., Tvarijonaviciute A., González-Aróstegui L.G., Rubio C.P., Baranco I., Yeste M., Miró J. Seminal plasma antioxidants are related to sperm cryotolerance in the horse. *Antioxidants*, 2022, 11(7): 1279 (doi: 10.3390/antiox11071279).
50. Papas M., Catalán, J., Fernandez-Fuertes B., Arroyo L., Bassols A., Miró J., Yeste M. Specific activity of superoxide dismutase in stallion seminal plasma is related to sperm cryotolerance. *Antioxidants*, 2019, 8(11): 539 (doi: 10.3390/antiox8110539).
51. Miriyala S., Holley A.K., St Clair D.K. Mitochondrial superoxide dismutase — signals of distinction. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(2): 181-190 (doi: 10.2174/187152011795255920).
52. Obal D., Dai S., Keith R., Dimova N., Kingery J., Zheng Y-T., Zweier J., Velayutham M., Prabhu S.D., Li Q., Conklin D., Yang D., Bhatnagar A., Bolli R., Rokosh G. Cardiomyocyte-restricted overexpression of extracellular superoxide dismutase increases nitric oxide bioavailability and reduces infarct size after ischemia/reperfusion. *Basic Research in Cardiology*, 2012, 107(6): 305 (doi: 10.1007/s00395-012-0305-1).
53. Kowalowska M., Wysocki P., Fraser L., Strzezek J. Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(4): 490-496 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00943.x).
54. Bucak M.N., Ateşşahin A., Varişli O., Yüce A., Tekin N., Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 2007, 67(5): 1060-1067 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.12.004).
55. Del Prete C., Stout T., Montagnaro S., Pagnini U., Uccello M., Florio P., Ciani F., Tafuri S., Palumbo V., Pasolini M.P., Cocchia N., Henning H. Combined addition of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase improves quality of cooled stored stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 2019, 210: 106195 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106195).
56. Margis R., Dunand C., Teixeira F.K., Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family — an evolutionary overview. *The FEBS Journal*, 2008, 275(15): 3959-3970 (doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x).
57. Sanocka D., Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004, 2: 12-26 (doi: 10.1186/1477-7827-2-12).
58. Chatterjee S., Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, 59(4): 451-458 (doi: 10.1002/mrd.1052).
59. Wang Y., Sharma R.K., Agarwal A. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. *Urology*, 1997, 50(3): 409-413 (doi: 10.1016/S0090-4295(97)00219-7).

60. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 2003, 329(1-2): 23-38 (doi: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2).
61. Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Khodov D.A., Porotov I.G. *Voprosy meditsinskoy khimii*, 1995, 41(1): 24-26 (in Russ.).
62. Agarwal A., Majzoub A. Laboratory tests for oxidative stress. *Indian Journal of Urology*, 2017, 33(3): 199-206 (doi: 10.4103/iju.IJU_9_17).
63. Allamaneni S.S., Agarwal A., Nallella K.P., Sharma R.K., Thomas Jr. A.J., Sikka S.C. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 2005, 83(3): 800-803 (doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.05.106).
64. Eruslanov E., Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 594: 57-72 (doi: 10.1007/978-1-60761-411-1_4).