

ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ СПЕРМОПЛАЗМЫ ЖЕРЕБЦОВ (*Equus ferus caballus* L.) РАЗНОГО ВОЗРАСТА*

М.М. АТРОЩЕНКО¹ , М.Г. ЕНГАЛЫЧЕВА^{1, 2}, А.М. ШИТИКОВА^{1, 2}

Криоконсервация семени жеребцов — современный широко распространенный в коневодстве способ сохранения генетического материала животных. Однако замораживание и последующее оттаивание снижает репродуктивные характеристики сперматозоидов. Одним из факторов, обуславливающих повреждение половых клеток, становится окислительный стресс, в результате которого повреждаются макромолекулы, в том числе протеины. С возрастом степень окислительного стресса нарастает, количество поврежденных белков увеличивается. В настоящей работе впервые установлено статистически значимое повышение содержания продуктов карбонилирования белков у возрастных животных по сравнению с более молодыми (в основном за счет альдегидных производных нейтрального характера). Впервые изучен резервно-адаптационный потенциал (РАП) спермоплазмы жеребцов. Обнаружено, что способность противостоять окислительному стрессу у молодых жеребцов достоверно выше, чем у возрастных. Нашей целью стала оценка спонтанной и индуцированной окислительной модификации белков, а также изучение резервно-адаптационного потенциала спермоплазмы у жеребцов разного возраста. Исследование проводили в 2020 году на 40 жеребцах (*Equus ferus caballus* L.) чистокровной арабской и советской тяжеловозной пород (АО «Терский племенной конный завод № 169», Ставропольский край; Перевозский и Починковский конные заводы, Нижегородская обл.). От каждого жеребца получили по 3 эякулята с интервалом 48 ч. В I группу включили 20 жеребцов в возрасте от 14 лет до 21 года (средний возраст $15,8 \pm 1,9$ года), во II группу — 20 жеребцов в возрасте от 3 до 5 лет ($4,3 \pm 0,6$ года). В каждом эякуляте определяли объем и концентрацию сперматозоидов в 1 мл спермы. Затем эякулят делили на две части, одну разбавляли лактозо-хелато-цитратно-желточной (ЛХЦЖ) средой в соотношении 1:3 и определяли прогрессивную подвижность (ПП) и выживаемость сперматозоидов при 4 °С. Для оценки выживаемости сперматозоидов при гипотермическом хранении спермы определяли их ПП с интервалом 24 ч вплоть до снижения ПП до 5 %. Сперму замораживали в парах жидкого азота в алюминиевых тубах объемом 18 мл по стандартной технологии ВНИИ коневодства и хранили в жидком азоте при -196 °С. Криоконсервированную сперму оттаивали на водяной бане при 40 °С в течении 90 с, после чего определяли ПП и выживаемость сперматозоидов при 4 °С. Другую часть эякулята центрифугировали при 3500 об/мин в течение 20 мин. После микроскопии супернатанта аликвоты семенной плазмы, свободные от сперматозоидов, замораживали в пробирках типа Эппендорф (2,0 мл) при -18 °С. Для количественной оценки окислительной модификации белков (ОМБ) использовали спектрофотометрический анализ 2,4-динитрофенилгидразонов, образовавшихся при взаимодействии карбонильных производных белков (альдегидов и кетонов) с 2,4-динитрофенилгидразином. Суммарное количество карбонильных производных регистрировали в нативной пробе биологического материала (спонтанная ОМБ) и после *in vitro* индукции окисления белков биологического материала реакционной смесью, содержащей растворы сульфата железа(II) и перекиси водорода (металл-катализируемая индуцированная ОМБ). Сравнение металл-катализируемой и спонтанной ОМБ позволяло оценить РАП — способность противостоять окислительному стрессу. Спектрофотометрические измерения проводили на 14 длинах волн: для регистрации альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера — в диапазоне 260-280 нм, основного характера — 258-264 и 428-520 нм, кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера — 363-370 нм, основного характера — 430-434 и 524-535 нм. Статистически значимые различия по показателям качества спермы между животными двух возрастных групп установили только по выживаемости сперматозоидов при гипотермическом хранении разбавленной ($p < 0,05$) и криоконсервированной ($p < 0,01$) спермы. Суммарное количество продуктов спонтанной ОМБ спермоплазмы возрастных жеребцов оказалось статистически значимо выше, чем у молодых (в единицах оптической плотности E_{on} соответственно 531,7 и 384,3 $E_{on}/г$ белка, $p < 0,05$). Кроме того, в I группе отмечено смещение спектра поглощения в сторону альдегидных производных нейтрального характера, содержание которых у животных II группы было достоверно ниже (367,6 и 255,8 $E_{on}/г$ белка, $p < 0,05$). Оценка металл-катализируемой (индуцированной) ОМБ также выявила более высокое суммарное количество карбонильных производных у возрастных жеребцов, но нарастание количества производных при воздействии окислительной смеси оказалось намного выше по отношению к изначальной спонтанной ОМБ в группе молодых жеребцов.

* При проведении исследований использовано оборудование ЦКП «Коллекция генетических ресурсов» ФГБНУ ВНИИ коневодства. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-16-00101-П.

РАП спермоплазмы молодых жеребцов существенно превышал таковой у возрастных животных ($p < 0,05$), что может положительно сказываться на репродуктивных характеристиках нативной и криоконсервированной спермы.

Ключевые слова: *Equus ferus caballus*, жеребцы, сперма, спермоплазма, криоконсервация, окислительный стресс, окислительная модификация белков.

Окислительный стресс (ОС) приводит к повреждению сперматозоидов (1, 2) и снижению качества нативной и криоконсервированной спермы (3-5). Причиной развития ОС становится чрезмерная продукция активных форм кислорода (АФК), истощение антиоксидантных возможностей организма или совокупность этих факторов. В результате преобладания прооксидантных процессов над антиоксидантными возможностями клеток АФК взаимодействуют с основными макромолекулами, при этом возникают необратимые повреждения нуклеиновых кислот, происходит перекисное окисление липидов (ПОЛ), окисление белков, в том числе важнейших ферментов и структурных протеинов (6).

В качестве одного из маркеров выраженности ОС используют количественную оценку окислительной модификации белков (ОМБ), поскольку этот показатель отражает степень повреждения аминокислотных остатков протеинов свободными радикалами кислорода и азота, а также продуктами ПОЛ (7). Продукты ОМБ появляются в клетках раньше, чем другие дериваты окислительного повреждения макромолекул, они устойчивы и доступны для лабораторной диагностики (8).

Белки сперматозоидов и спермоплазмы, как и другие белки в организме жеребцов, становятся главными мишенями для АФК и азота из-за высокой чувствительности к свободным радикалам (9, 10). Многочисленные и разнообразные по структуре свободные радикалы образуются в организме в результате ферментативных и неферментативных окислительно-восстановительных реакций, фотохимических и ионизирующих воздействий. В процессе окислительной модификации аминокислотных остатков белков образуются карбонильные производные — альдегиды и кетоны, при этом альдегиды принято считать ранними маркерами окислительной деструкции протеинов, а кетонные производные — более поздними (6, 8, 9). Важно помнить, что ОМБ происходит не только вследствие нарастания концентрации свободных радикалов, но и в результате смещения баланса между антиоксидантными и прооксидантными системами в пользу вторых.

С возрастом в организме повышается продукция АФК и накапливается значительное количество продуктов ОС. Это связано с митохондриальной дисфункцией, высокой продукцией АФК на фоне истощения антиоксидантных возможностей организма, нарушением работы протеасомной системы, дегградации поврежденных белков (11).

В настоящей работе впервые определено содержание продуктов окислительной модификации белков в спермоплазме жеребцов разного возраста. Установлено статистически значимое повышение содержания продуктов карбонилирования белков у возрастных животных по сравнению с более молодыми, в основном за счет альдегидных производных нейтрального характера. Впервые изучен резервно-адаптационный потенциал (РАП) спермоплазмы жеребцов. Обнаружено, что способность противостоять окислительному стрессу у молодых жеребцов достоверно выше, чем у возрастных.

Целью настоящего исследования стала оценка спонтанной и индуцированной окислительной модификации белков, а также изучение резервно-адаптационного потенциала спермоплазмы у жеребцов разного возраста.

Методика. Исследование проводили в 2020 году на 40 жеребцах

(*Equus ferus caballus* L.) чистокровной арабской и советской тяжеловозной пород (АО «Терский племенной конный завод № 169», Ставропольский край; Перевозский и Починковский конные заводы, Нижегородская обл.). Сперму получали во время случного сезона (март-апрель) на кобылу в охоте с помощью искусственной вагины. От каждого жеребца было получено по 3 эякулята с интервалом 48 ч. Во время проведения экспериментальных исследований условия кормления и содержания жеребцов соответствовали установленным нормам.

Для оценки зависимости ОМБ и РАП спермоплазмы от возраста жеребцов были сформированы две опытные группы: в I группу включили 20 животных в возрасте от 14 лет до 21 года (средний возраст $15,8 \pm 1,9$ года), во II группу — 20 животных в возрасте от 3 до 5 лет ($4,3 \pm 0,6$ года).

После получения спермы эякулят фильтровали через стерильную марлевою салфетку. По завершении фильтрации и удаления секрета пузырьковидных желез в каждом эякуляте определяли объем и концентрацию сперматозоидов в 1 мл спермы. Затем эякулят делили на две части, одну разбавляли лактозо-хелато-цитратно-желточной (ЛХЦЖ) средой в соотношении 1:3 и определяли прогрессивную подвижность (ПП) и выживаемость сперматозоидов при 4 °С. Объем эякулята (в мл) после фильтрации оценивали с помощью мерного цилиндра. Концентрацию сперматозоидов измеряли фотометром SDM1 («Minitube GmbH», Германия). Прогрессивную подвижность оценивали с использованием системы Argus CASA («ArgusSoft Ltd.», Россия) и микроскопа Motic BA 410 («Motic», Китай) в камере Маклера при 37 °С.

Для оценки выживаемости сперматозоидов при гипотермическом хранении спермы определяли их прогрессивную подвижность с интервалом 24 ч вплоть до снижения ПП до 5 %. Сперму замораживали в парах жидкого азота в алюминиевых тубах объемом 18 мл по стандартной технологии ВНИИ коневодства и хранили в жидком азоте при -196 °С (12). Оттаивание криоконсервированной спермы проводили на водяной бане при 40 °С в течение 90 с, после чего определяли прогрессивную подвижность и выживаемость сперматозоидов при 4 °С.

Другую часть эякулята сразу же после получения спермы центрифугировали при 3500 об/мин в течение 20 мин (центрифуга ELM1 CM-6M, «ELMI», Латвия). После микроскопии супернатанта аликвоты семенной плазмы, свободной от сперматозоидов, замораживали в пробирках типа Эппендорф (2,0 мл) при -18 °С до проведения исследований.

Для количественной оценки ОМБ использовали спектрофотометрический анализ 2,4-динитрофенилгидразонов, образовавшихся при взаимодействии карбонильных производных белков (альдегидов и кетонов) с 2,4-динитрофенилгидразином в соответствии с запатентованной методикой (13). Суммарное количество карбонильных производных регистрировали в нативной пробе биологического материала (спонтанная ОМБ) для определения фактического содержания *in vivo* образовавшихся карбонильных производных и после *in vitro* индукции окисления белков биологического материала реакционной смесью, содержащей растворы сульфата железа(II) и перекиси водорода (металл-катализируемая, индуцированная ОМБ). Добавление окислительной смеси способствовало дополнительному образованию карбонильных производных. Если в нативной пробе существовал резерв антиоксидантных систем и присутствовало мало аминокислотных остатков, способных быстро окислиться, то индуцированная ОМБ имела минимальное отличие от спонтанной. То есть сравнение металл-катализируемой и спонтанной ОМБ позволяло оценить резервно-адаптационный потенциал

(РАП) — способность противостоять ОС.

Спектрофотометрические измерения проводили на 14 длинах волн: для регистрации альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (АДНФГн) — в диапазоне 260-280 нм, основного характера (АДНФГо) — 258-264 и 428-520 нм, кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (КДНФГн) — 363-370 нм, основного характера (КДНФГо) — 430-434 и 524-535 нм (спектрофотометр СФ-2000, «ОКБ Спектр», Россия). Анализ подвергалась площадь под кривой спектра поглощения ДНФГ-derivатов карбонильных производных белков (S). Полученные значения экстинкций соотносились с содержанием белка спермоплазмы, определенным по методу Лоури (единицы оптической плотности $E_{оп}/г$ белка).

Статистический анализ проводили с использованием программ Statistica 13.3 («StatSoft, Inc.», США) и Microsoft Office Excel 2016. Нормальность распределения определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для оценки статистической значимости различий независимых выборок использовали *U*-критерий Манна-Уитни. Статистически значимым считали результат при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы (*Me*) и квартилей (Q1; Q3).

Результаты. При сравнительном анализе показателей спермограмм (табл. 1) выявили, что выживаемость сперматозоидов при гипотермическом хранении спермы от жеребцов старшего возраста была значительно ниже, чем при хранении спермы от молодых животных. Схожие результаты получили как в разбавленной и охлажденной (66,0 ч у взрослых жеребцов, 107,0 ч в группе молодых жеребцов, $p < 0,05$), так и в оттаянной после криоконсервации сперме (соответственно 17,3 ч и 49,0 ч, $p < 0,01$). Аналогичная зависимость выживаемости сперматозоидов от возраста обнаружена не только у жеребцов (14, 15), но и у мужчин (16, 17), а также у быков (18). Вероятной причиной этого становится накопление с возрастом необратимых повреждений нуклеиновых кислот, что отрицательно сказывается на репродуктивных свойствах (14, 19).

1. Сравнительная характеристика качества спермы у жеребцов (*Equus ferus caballus* L.) чистокровной арабской и советской тяжеловозной пород разного возраста (Me [Q1; Q3]; АО «Терский племенной конный завод № 169», Ставропольский край; Перевозский и Починковский конные заводы, Нижегородская обл., 2020 год)

Показатель	I группа	II группа
Число жеребцов, <i>n</i>	20	20
Возраст, лет	15,8 [14,0; 21,0]	4,3 [3,0; 5,0]
	Нативная и разбавленная сперма (<i>n</i> = 60)	
Объем эякулята, мл	47,4 [15,0; 80,0]	61,9 [39,0; 105,0]
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	153,9 [83,0; 245,0]	159,1 [105,0; 214,0]
Прогрессивная подвижность, %	48,0 [35,0; 60,0]	50,3 [40,0; 65,0]
Выживаемость сперматозоидов, ч	66,0 [36,0; 120,0]	107,0* [84,0; 120,0]
	Заморожено - оттаянная сперма (<i>n</i> = 60)	
Прогрессивная подвижность %	17,1 [10,0; 30,0]	21,8 [13,0; 33,0]
Выживаемость сперматозоидов, ч	17,3 [6,0; 72,0]	49,0** [12,0; 84,0]

* и ** Различия между выживаемостью сперматозоидов при гипотермическом хранении разбавленной спермы у жеребцов I и II групп статистически значимы соответственно при $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

Выживаемость сперматозоидов при гипотермическом хранении спермы (4 °С) была одним из основных показателей, характеризующих ее качество. Под выживаемостью сперматозоидов понимают их способность сохранять прогрессивную подвижность при гипотермическом хранении разбавленной охлажденной или криоконсервированной спермы. Выживаемость сперматозоидов статистически значимо коррелирует с их прогрессивной подвижностью и частотой жеребости у кобыл (20).

Суммарная спонтанная ОМБ спермоплазмы жеребцов I группы

оказалась статистически достоверно выше, чем у жеребцов II группы (соответственно 531,7 и 384,3 Е_{оп}/г белка, $p < 0,05$) (см. табл. 1). Этот результат свидетельствует о более выраженном окислительном стрессе в пробах I группы и более существенном повреждении аминокислотных остатков белков спермоплазмы у жеребцов старшего возраста по сравнению с молодыми животными. Кроме того, в I группе отмечалось смещение спектра поглощения в сторону альдегидных производных нейтрального характера, содержание которых во II группе было ниже (367,6 и 255,8 Е_{оп}/г белка, $p < 0,05$).

Небольшое количество АФК в сперматозоидах необходимо для передачи внутриклеточных сигналов, гиперактивации и акросомальной реакции, что обеспечивает оплодотворяющую способность. Однако избыточная продукция АФК неминуемо приводит к развитию ОС и повреждению макромолекул (21).

ОМБ спермоплазмы вызывает изменения их вторичной и третичной структуры, что негативно сказывается на функциональном состоянии протеинов, а значит, ухудшаются морфологические и репродуктивные характеристики спермы (22). Поврежденные белки могут подвергаться процессам агрегации и фрагментации за счет белок-белковых взаимодействий.

Накопление продуктов ОМБ, белковых агрегатов и дериватов, устойчивых к протеолизу, нарушает метаболизм клетки, приводя к апоптозу или некрозу (22, 23). Следует отметить, что в организме функционируют антиоксидантные и протеолитические системы, препятствующие развитию окислительного стресса и ОМБ, поэтому некоторые повреждения белковых молекул обратимы. К ферментативным антиоксидантным системам относят супероксиддисмутазу, глутатионредуктазу, каталазу, пероксидазу. Неферментативные антиоксиданты — это витамины Е и С, глутатион, каротиноиды, убихинон и другие метаболиты (21, 22). Однако с возрастом прооксидантные системы все более преобладают над защитными, а степень ОМБ растет. Кроме того, сами антиоксидантные ферменты, как и другие протеины, подвергаются окислению, что приводит к нарушению их функционирования (24).

2. Спектр поглощения (Е_{оп}/г белка) продуктов спонтанной и металл-катализируемой окислительной модификации белков (ОМБ) спермоплазмы жеребцов (*Equus ferus caballus* L.) чистокровной арабской и советской тяжеловозной породы разного возраста (Ме [Q1; Q3]; АО «Терский племенной конный завод № 169», Ставропольский край; Перевозский и Починковский конные заводы, Нижегородская обл.; 2020 год)

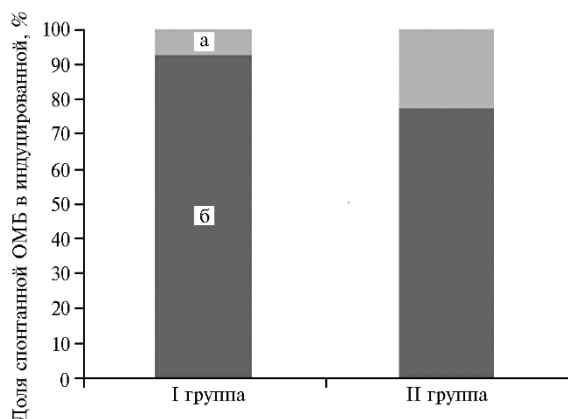
Вид карбонильных производных	I группа (от 14 лет до 21 года; $n = 20$)		II группа (от 3 до 5 лет; $n = 20$)	
	спонтанная ОМБ	индуцированная ОМБ	спонтанная ОМБ	индуцированная ОМБ
СаднФгн	367,6 [162,8; 500,5]	374,7 [236,5; 785,9]	255,8 [122,8; 328,1]	315,3 [193,8; 349,5]
СкднФгн	83,9 [47,4; 131,5]	105,3 [74,9; 386,4]	69,9 [30,4; 84,3]	76,4 [66,0; 122,5]
СаднФго	64,6 [40,7; 141,1]	84,0 [66,1; 323,4]	49,6 [29,5; 71,1]	71,4* [62,4; 98,6]
СкднФго	11,3 [6,9; 25,2]	13,8 [10,8; 43,0]	9,6 [5,1; 12,3]	11,8 [11,4; 19,4]
Собщ.	531,7 [264,6; 787,6]	562,8 [364,2; 1519,7]	384,3 [172,6; 490,4]	484,7* [334,9; 598,4]

Примечание. СаднФгн, СкднФгн, СаднФго, СкднФго — соответственно площади под кривыми графиков поглощения альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера, кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера, альдегид-динитрофенилгидразонов основного характера, кетон-динитрофенилгидразонов основного характера, Собщ. — суммарная площадь фигуры, образовавшейся при построении кривой графика поглощения ДНФГ-дериватов карбонильных производных белков на разных длинах волн

* Различия между металл-катализируемой и спонтанной ОМБ спермоплазмы жеребцов статистически значимы при $p < 0,05$.

Преобладание у жеребцов старшего возраста альдегидных производных нейтрального характера (табл. 2) указывало на окислительное

повреждение аминокислотных остатков цистеина, глутамина, аспарагина, триптофана, тирозина, метионина, лейцина, пролина. В результате окисления тиольной группы цистеина формируются дисульфидные сшивки (21, 25). При этом меняется структурно-функциональное состояние белков, содержащих остатки цистеина. В сперме жеребцов присутствует ряд белков CRISPs (cysteine-rich secretory proteins) — протеинов, богатых цистеином (26). CRISP, обнаруженные в семенниках и придатках семенников млекопитающих, вовлечены в процесс оплодотворения. При сперматогенезе белок CRISP2 включается в акросому, где, как предполагается, участвует в адгезии половых клеток с клетками Сертоли. Также CRISP2 служит частью хвоста сперматозоидов и участвует в регуляции биения жгутиков. Белок CRISP3 обнаружен в семенной жидкости, выделяется из простаты, его функция неизвестна (26-28). Окислительные модификации остатков цистеина могут негативно сказаться на функционировании этих белков.



Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы жеребцов (*Equus ferus caballus* L.) чистокровной арабской и советской тяжеловозной пород разного возраста: а — индуцированная окислительная модификация белков, б — спонтанная окислительная модификация белков; I группа — взрослые жеребцы (от 14 лет до 21 года), II группа — молодые жеребцы (от 3 до 5 лет) (АО «Терский племенной конный завод № 169», Ставропольский край; Перевозский и Починковский конные заводы, Нижегородская обл.; 2020 год).

белковых молекул (29). Это подтверждает и тот факт, что при индуцированном окислении в пробах значительно возросла доля альдегидных производных нейтрального и основного характера — ранних маркеров окислительной деструкции. Полученные результаты указывают на высокий РАП у молодых жеребцов.

В I группе добавление реакционной окислительной смеси повысило содержание карбонильных производных (см. рис.), но не столь существенно относительно изначальных показателей, что указывает на значительное накопление *in vivo* поврежденных аминокислотных радикалов белков спермоплазмы и истощении РАП у возрастных жеребцов.

Таким образом, суммарная окислительная модификация белков спермоплазмы жеребцов чистокровной арабской и советской тяжеловозной пород старшего возраста выше, чем у более молодых животных ($p < 0,05$). Резервно-адаптационный потенциал спермоплазмы молодых жеребцов существенно превышает таковой у возрастных животных ($p < 0,05$), что может положительно сказываться на репродуктивных характеристиках нативной

Оценка индуцированной ОМБ также выявила более высокое суммарное количество карбонильных производных в I группе, но степень нарастания количества карбонильных производных при воздействии окислительной смеси оказалась намного выше по отношению к изначальному уровню спонтанной ОМБ в группе молодых жеребцов (табл. 2, рис.). Полученные данные указывают на то, что в спермоплазме молодых жеребцов есть аминокислотные группы белков, которые потенциально могут подвергнуться окислительному стрессу, однако *in vivo* этого не происходило, вероятно, благодаря активной работе антиоксидантных систем, препятствующих повреждению

и криоконсервированной спермы. Более высокое содержание продуктов карбонилирования белков спермоплазмы у жеребцов старшего возраста указывает на наличие окислительного стресса, что может быть одной из причин снижения выживаемости сперматозоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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).
2. Wyck S., Herrera C., Requena C.E., Bittner L., Hajkova P., Bollwein H., Santoro R. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. *Epigenetics & Chromatin*, 2018, 11(1): 60 (doi: 10.1186/s13072-018-0224-y).
3. Lone F.A., Naikoo M., Khatun A., Shah R.A., Pampori Z.A., Khan H.M., Ahanger A.A. Idebenone improves quality of ram sperm by mitigating oxidative stress during cryopreservation. *Cryobiology*, 2019, 90: 15-20 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.09.004).
4. Rodrigues R.B., Uczay M., Brito V.B., Godoy A.C., Moura D.J., Vogel C., Vasconcelos A.C.N., Streit D.P. Jr. Oxidative stress and DNA damage of Zebrafish sperm at different stages of the cryopreservation process. *Zebrafish*, 2021, 18(2): 97-109 (doi: 10.1089/zeb.2020.1942).
5. Moubasher A.E., Taha E.A., Younis A., Fakhry M.E., Morsy H. Testicular tissue oxidative stress in azoospermic patients: Effect of cryopreservation. *Andrologia*, 2020, 52(11): e13817 (doi: 10.1111/and.13817).
6. Barati E., Nikzad H., Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(1): 93-113 (doi: 10.1007/s00018-019-03253-8).
7. Теплов С.А., Абаленихина Ю.В., Фомина М.А., Матвеева И.В. Изменение спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков печени крыс в условиях дефицита синтеза оксида азота различной выраженности. *Наука молодых — Eruditio Juvenium*, 2016, 1: 50-54.
8. Hawkins C.L., Davies M.J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(51): 19683-19708 (doi: 10.1074/jbc.REV119.006217).
9. Čolak E. New markers of oxidative damage to macromolecules. *Journal of Medicak Biochemiastry*, 2008, 27(1): 1-16 (doi: 10.2478/v10011-007-0049-x).
10. Звягина В.И., Шумаев К.Б., Бельских Э.С., Урясьев О.М., Ахмедова С.Р., Марсянова Ю.А., Шитикова А.М., Сучкова О.Н. Протективные эффекты L-аргинина на митохондрии эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*, 2022, 30(4): 457-470 (doi: 10.17816/PAVLOVJ109410).
11. Zhang H., Davies K.J.A., Forman H.J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology Medicine*, 2015, 88(Pt B): 314-336 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036).
12. Науменков А.И., Романькова Н.К. Лактозо-хелато-цитратно-желточный разбавитель спермы жеребца. В сб.: *Теория и практика совершенствования пород лошадей. Научные труды ВНИИК*. Дивово, 1971, XXV: 128-132.
13. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., Терентьев А.А. *Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях. Патент 2524667 РФ. МПК G01N 33/52. Заявл. 21.01.13. Оpubл. 27.07.14.*
14. Castro R., Morales P., Parraguez V.H. Post-thawing sperm quality in Chilean purebred stallions: effect of age and seasonality. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2020, 92: 03170 (doi: 10.1016/j.jevs.2020.103170).
15. Greiser T., Sieme H., Martinsson G., Distl O. Breed and stallion effects on frozen-thawed semen in warmblood, light and quarter horses. *Theriogenology*, 2020, 142: 8-14 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.033).
16. Moskovtsev S., Willis J., White J., Mullen B. Sperm survival: relationship to age-related sperm DNA integrity in infertile men. *Archives of Andrology*, 2009, 53(1): 9-32 (doi: 10.1080/01485010600908330).
17. Kang W., Harada Y., Yamatoya K., Kawano N., Kanai S., Miyamoto Y., Nakamura A., Miyado M., Hayashi Y., Kuroki Y., Saito H., Iwao Y., Umezawa A., Miyado K. Extra-mitochondrial citrate synthase initiates calcium oscillation and suppresses age-dependent sperm dysfunction. *Laboratory Investigation*, 2020, 100(4): 583-595 (doi: 10.1038/s41374-019-0353-3).
18. Анбаза Ю.В. Факторы, влияющие на качественные и количественные показатели нативной спермопродукции быков ОАО «Красноярскгагроплем». *Вестник КрасГЛУ*, 2018, 2: 286-292.
19. Luo Q.X., Liao Y.B., Huang C.P., Guo J.H., Liang X.D. Correlation of sperm DNA fragmentation

- index with age and semen parameters and its influence on the outcomes of IVF-ET. *Zhonghua Nan Ke Xue (National Journal of Andrology)*, 2020, 26(8): 708-712.
20. Atroshchenko M.M., Arkhangel'skaya E., Isaev D.A., Stavitsky S.B., Zaitsev A.M., Kalaschnikov V.V., Leonov S., Osipov A.N. Reproductive characteristics of thawed stallion sperm. *Animals*, 2019, 9(12): 1099 (doi: 10.3390/ani9121099).
 21. Piomboni P., Stendardi A., Gambera L., Tatone C., Coppola L., De Leo V., Focarelli R. Protein modification as oxidative stress marker in normal and pathological human seminal plasma. *Redox Report*, 2012, 17(5): 227-232 (doi: 10.1179/1351000212Y.0000000014).
 22. Agarwal A., Durairajanayagam D., Halabi J., Peng J., Vazquez-Levin M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproduction Biomed Online*, 2014, 29(1): 32-58 (doi: 10.1016/j.rbmo.2014.02.013).
 23. Caruso Bavisotto C., Alberti G., Vitale A.M., Paladino L., Campanella C., Rappa F., Gorska M., Conway de Macario E., Cappello F., Macario A.J.L., Marino Gammazza A. Hsp60 post-translational modifications: functional and pathological consequences. *Frontiers in Molecular Bioscience*, 2020, 7: 95 (doi: 10.3389/fmolb.2020.00095).
 24. Angrimani D., Nagai K.K., Rui B.R., Bicudo L.C., Losano J., Brito M.M., Francischini M., Nichi M. Spermatic and oxidative profile of domestic cat (*Felis catus*) epididymal sperm subjected to different cooling times (24, 48 and 72 hours). *Reproduction in Domestic Animals*, 2018, 53(1): 163-170 (doi: 10.1111/rda.13086).
 25. Cai Z., Yan L.J. Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 2013, 1(1): 15-26.
 26. Gaikwad A.S., Hu J., Chapple D.G., O'Bryan M.K. The functions of CAP superfamily proteins in mammalian fertility and disease. *Human Reproduction Update*, 2020, 26(5): 689-723 (doi: 10.1093/humupd/dmaa016).
 27. Hu J., Merriner D.J., O'Connor A.E., Houston B.J., Furic L., Hedger M.P., O'Bryan M.K. Epididymal cysteine-rich secretory proteins are required for epididymal sperm maturation and optimal sperm function. *Molecular Human Reproduction*, 2018, 24(3): 111-122 (doi: 10.1093/molehr/gay001).
 28. Cohen D.J., Busso D., Da Ros V., Ellerman D.A., Maldera J.A., Goldweic N., Cuasnicu P.S. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int. J. Dev. Biol.*, 2008, 52(5-6): 737-742 (doi: 10.1387/ijdb.072538dc).
 29. Залеская Т.И., Авер И.И., Мандрик К.А. Перекисное окисление белков плазмы крови у больных глаукомой. *Журнал ГрГМУ*, 2007, 3: 66-68.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства,
391105 Россия, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Дивово,
e-mail: atomiks-77@mail.ru ☒;

Поступила в редакцию
8 сентября 2022 года

²ФГБОУ ВО Рязанский государственный
медицинский университет им. академика И.П. Павлова
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
390026 Россия, Рязань, ул. Высоковольтная, 9,
e-mail: mariyanaaber@yandex.ru, anyakudlaeva@mail.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2023, V. 58, № 4, pp. 660-668

THE LEVEL OF SPERM PLASMA PROTEIN OXIDATIVE MODIFICATION ASSESSED IN STALLIONS (*Equus ferus caballus* L.) OF DIFFERENT AGES

M.M. Atroshchenko¹ ☒, M.G. Engalycheva^{1, 2}, A.M. Shitikova^{1, 2}

¹All-Russian Research Institute for Horse Breeding, Divovo, Rybnoe District, Ryazan Province, 391105 Russia, e-mail atomiks-77@mail.ru (☒ corresponding author);

²Pavlov Ryazan State Medical University, 9, ul. Vysokovol'tnaya, Ryazan, 390026 Russia, e-mail: mariyanaaber@yandex.ru, anyakudlaeva@mail.ru

ORCID:

Atroshchenko M.M. orcid.org/0000-0001-6023-0332 Shitikova A.M. orcid.org/0000-0002-4004-9058

Engalycheva M.G. orcid.org/0000-0002-9719-036X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The equipment of the Center for Collective Use the Collection of Genetic Resources of the All-Russian Research Institute of Horse Breeding was used

Supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 20-16-00101-П

Final revision received September 8, 2022

doi: 10.15389/agrobiology.2023.4.660eng

Accepted November 1, 2022

Abstract

Cryopreservation of stallion semen is a modern widespread method in horse breeding for preserving the genetic material of animals. Freezing and thawing reduces the reproductive characteristics of spermatozoa. Oxidative stress that causes damage to macromolecules is a factor contributing

to damage to germ cells. With age, the oxidative stress and the amount of damaged proteins increase. In this work, for the first time, we quantified products of oxidative modification of proteins (OMP) in semen plasma in stallions of different ages. There is a significant increase in the content of protein carbonylation products in older animals compared to younger ones, mainly due to neutral aldehyde derivatives. This study is the first to assess the reserve-adaptive potential (RAP) of the seminal plasma of stallions. It was found that the ability to withstand oxidative stress in young stallions is significantly higher than in older stallions. The aim of this study was to assess the level of spontaneous OMP, induced OMP and the RAP values for stallion spermatozoa as influenced by the animal age. The study was carried out in 2020 on 40 purebred Arabian and Soviet draft stallions (*Equus ferus caballus* L.) (AO Tersk breeding stud No. 169, Stavropol Territory; Perevozsky and Pochinkovsky stud farms, Nizhny Novgorod Province). Three ejaculates of each stallion were collected with a 48-hour interval. The stallions of group I ($n = 20$) were from 14 to 21 years of age (mean age 15.8 ± 1.9 years), of group II ($n = 20$) from 3 to 5 years of age (4.3 ± 0.6 years). In each ejaculate, the volume and concentration of spermatozoa in 1 ml of semen was determined. Then the ejaculate was divided into two parts, one was diluted with lactose-chelate-citrate-yolk (LCCY) medium in a ratio of 1:3 and the progressive motility (PM) and survival of spermatozoa were determined at 4 °C. To assess the survival of spermatozoa during hypothermic storage of sperm, its PM was determined with a 24-hour interval up to a decrease in PM to 5 %. Sperm was frozen in liquid nitrogen vapor in 18 ml aluminum tubes according to the standard of the All-Russian Research Institute for Horse Breeding and stored in liquid nitrogen at -196 °C. The cryopreserved sperm was thawed in a water bath at 40 °C for 90 s, followed by the determination of the spermatozoa PM and survival at 4 °C. Another part of the ejaculate was centrifuged at 3500 rpm for 20 min. After microscopy of the supernatant, aliquots of seminal plasma free of spermatozoa were frozen in 2.0 ml Eppendorf tubes at -18 °C. To quantify the OMP, we used the spectrophotometric analysis of 2,4-dinitrophenylhydrazones formed by the interaction of protein carbonyl derivatives (aldehydes and ketones) with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The total amount of carbonyl derivatives was recorded in a native sample of biological material (spontaneous OMP) and after in vitro induction of protein oxidation of biological material with a reaction mixture containing solutions of iron(II) sulfate and hydrogen peroxide (metal-catalyzed induced OMP). From metal-catalyzed and spontaneous OMP, RAP was evaluated to characterize the OS resistance. Spectrophotometric measurements were carried out at 14 wavelengths, at 260-280 nm for neutral aldehyde-dinitrophenylhydrazones, at 258-264 and 428-520 nm for basic aldehyde-dinitrophenylhydrazones, at 363-370 nm for neutral ketone-dinitrophenylhydrazones, and at 430-434 and 524-535 nm for basic ketone-dinitrophenylhydrazones. Statistically significant differences in sperm quality between animals of two age groups were found only in the survival rate of spermatozoa during hypothermic storage of diluted ($p < 0.05$) and cryopreserved ($p < 0.01$) sperm. The total amount of spontaneous OMP products in the seminal plasma of older stallions was statistically significantly higher than in young stallions (531.7 and 384.3 ODU/g protein, respectively, $p < 0.05$). In addition, in group I, there was a shift in the absorption spectrum towards neutral aldehyde derivatives the content of which in animals of group II was significantly lower (367.6 and 255.8 ODU/g protein, $p < 0.05$). The evaluation of metal-catalyzed (induced) OMP also revealed a higher total amount of carbonyl derivatives in older stallions, but its increase under the influence of an oxidizing mixture was much higher vs. the initial spontaneous OMP in young stallions. The RAP value for the seminal plasma of young stallions significantly exceeds that of mature stallions ($p < 0.05$), which can positively affect the reproductive characteristics of native and cryopreserved sperm.

Keywords: *Equus ferus caballus*, stallions, sperm, seminal plasma, cryopreservation, oxidative stress, protein oxidative modification.