

Научная статья

УДК 57.013:612.1

DOI: [10.55170/1997-3225-2025-10-1-66-70](https://doi.org/10.55170/1997-3225-2025-10-1-66-70)**АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СПЕРМАТОЗОИДАХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ КРИОПОВРЕЖДЕНИИ****Марина Николаевна Иващенко^{1✉}, Анна Вячеславовна Дерюгина², Андрей Александрович Белов³, Михаил Иванович Латушко⁴, Анатолий Петрович Еремин⁵**^{1, 3, 5} Нижегородский государственный агротехнологический университет им. Л.Я. Флорентьева, Нижний Новгород, Россия^{2, 4} Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия¹ kafedra2577@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6642-8518>² derugina69@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8812-8559>³ andrey.raven@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4869-5054>⁴ ancord.m@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-2997-0228>⁵ erapnn@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0002-0550-4876>

Резюме. Цель исследований – оценка активности ферментативных антиоксидантов сперматозоидов быков после оттаивания, для понимания молекулярных механизмов снижения оплодотворяющей способности спермы в процессе криоконсервации и оттаивания. Объектом исследования являлась спермопродукция чёрно-пёстрых голштинизированных быков в возрасте 3 лет. Сперму разбавляли стерильной средой «BioXcell». Один и тот же эякулят подвергался двум обработкам: свежий – оценивался сразу после добавления разбавителя при температуре 37°C и размороженный – оценивался через 60 и 120 минут после размораживания. В сперматозоидах определяли интенсивность протекания свободнорадикальных процессов путем определения в клетках концентрации малонового диальдегида. Эффективность ферментативного звена антиоксидантной системы определяли по изменению активности супероксиддисмутазы и каталазы. На основании проведенных исследований установлено, что после криоконсервации содержание малонового диальдегида было выше в среднем на 25%. Антиоксидантный потенциал супероксиддисмутазы после криоконсервации не зависел от инкубационного периода и увеличился в среднем на 23%, активность каталазы после замораживания/оттаивания спермы не изменилась. Оценка уровня окислительного стресса и активности антиоксидантной системы важно для понимания молекулярных механизмов, связанных со снижением продуктивности крупного рогатого скота.

Ключевые слова: сперматозоиды, крупный рогатый скот, антиоксиданты, супероксиддисмутаза, каталаза, малоновый диальдегид, криоконсервация

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00205

Для цитирования: Иващенко М. Н., Дерюгина А. В., Белов А. А., Латушко М. И., Еремин А. П. Активность антиоксидантных ферментов в сперматозоидах крупного рогатого скота при криоповреждении // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. 2025. Т. 10, № 1. С. 66-70. DOI: [10.55170/1997-3225-2025-10-1-66-70](https://doi.org/10.55170/1997-3225-2025-10-1-66-70)

Original article

ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN CATTLE SPERMATOZOA DURING CRYOPRESERVATION**Marina N. Ivashchenko^{1✉}, Anna V. Deryugina², Andrey A. Belov³, Mikhail I. Latushko⁴, Anatoly P. Eremin⁵**^{1, 3, 5} Nizhny Novgorod State Agrotechnological University named after L.Ya. Florentyev, Nizhny Novgorod, Russia^{2, 4} Nizhegorodsky State University named after N.I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod, Russia¹ kafedra2577@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6642-8518>² derugina69@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8812-8559>³ andrey.raven@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4869-5054>⁴ ancord.m@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-2997-0228>⁵ erapnn@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0002-0550-4876>

Abstract. The aim of the research is to evaluate the activity of enzymatic antioxidants in bull sperm after thawing, in order to understand the molecular mechanisms of reducing the fertilizing ability of sperm during cryopreservation/thawing. The object of the study was the sperm production of black-and-white Holstein bulls at the age of 3 years. The sperm was diluted with a sterile BioXcell medium. The same ejaculate was subjected to two treatments: fresh – evaluated immediately after adding diluent at 37°C and defrosted – evaluated 60 and 120 minutes after defrosting. The intensity of free radical processes in spermatozoa was determined by determining the concentration of malondialdehyde in cells. The effectiveness of the enzymatic link of the antioxidant system was determined by changes in the activity of superoxide dismutase and catalase. Based on the conducted studies, it was found that after cryopreservation, the

content of malondialdehyde was higher by an average of 25%. The antioxidant potential of superoxide dismutase after cryopreservation did not depend on the incubation period and increased by an average of 23%, the activity of catalase after freezing / thawing of sperm did not change. Assessing the level of oxidative stress and the activity of the antioxidant system is important for understanding the molecular mechanisms associated with a decrease in cattle productivity.

Keywords: spermatozoa, cattle, antioxidants, superoxide dismutase, catalase, malonic dialdehyde, cryopreservation

Acknowledgements: *The research was carried out at the expense of the Russian Science Foundation grant No. 23-26-00205*

For citation: Ivashchenko, M. N., Deryugina, A. V., Belov, A. A., Latushko, M. I. & Eremin, A. P. (2025). Activity of antioxidant enzymes in cattle spermatozoa during cryopreservation. *Izvestiia Samarskoi gosudarstvennoi selskokhoziaistvennoi akademii (Bulletin Samara State Agricultural Academy)*, 10, 1, 66-70 (in Russ). DOI: [10.55170/1997-3225-2025-10-1-66-70](https://doi.org/10.55170/1997-3225-2025-10-1-66-70)

Криоконсервация спермы крупного рогатого скота является важным методом сохранения и эффективного использования генетического материала от высокоценных производителей. Несмотря на большое разнообразие криопротекторов, эффективность криоконсервации спермы быков ограничена. Снижение оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы может быть связано с изменением структуры плазматической мембраны, нарушением липидного профиля в мембране сперматозоидов. Высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в мембране спермиев объясняет восприимчивость половых клеток к оксидативному стрессу [1, 2].

В биотехнике воспроизводства для оценки репродуктивной функции используется анализ спермы, включающий определение подвижности, морфологии, концентрации сперматозоидов, что являются лишь косвенным показателем качества спермы.

Оценка активности антиоксидантных ферментов позволит провести анализ метаболических характеристик сперматозоидов при криоконсервации. В частности, криоконсервация усиливает выработку активных форм кислорода, обладающих выраженной реакционной способностью. Низкие уровни активных форм кислорода, продуцируемые сперматозоидами, участвуют в обеспечении оплодотворяющей способности. Избыточное образование активных форм кислорода может приводить к повреждению сперматозоидов. Образующиеся активные формы кислорода атакуют жизненноважные биомолекулы, изменяя работу ферментативных систем, белков, ДНК и различных мембранных структур клетки [3-5].

Сперматозоиды в норме содержат антиоксиданты, которые защищают половые клетки от повреждающего действия активных форм кислорода. Ферменты – супероксиддисмутаза и каталаза образуют антиоксидантную пару, которая борется со свободными радикалами кислорода, не давая им возможности запустить процессы свободнорадикального окисления [6, 7]. Супероксиддисмутаза – фермент, катализирующий дисмутацию супероксидного радикала до перекиси водорода и молекулярного кислорода тем самым предотвращая повреждение полиненасыщенных жирных кислот мембраны сперматозоидов, стабилизируя текучесть мембраны и восстанавливая подвижность половых клеток. Каталаза катализирует разложение перекиси водорода до воды и молекулярного кислорода [6, 8].

Цель исследований – оценка активности ферментативных антиоксидантов сперматозоидов быков после оттаивания, для понимания молекулярных механизмов снижения оплодотворяющей способности спермы в процессе криоконсервации и оттаивания.

Задачи исследований – определить содержание малонового диальдегида как показателя, отражающего интенсивность протекания свободнорадикальных процессов и активность ферментов антиоксидантов – супероксиддисмутазы и каталазы в сперматозоидах крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований служила спермопродукция чёрно-пёстрых голштинизированных быков в возрасте 3 лет. Было использовано около 100 эякулятов быков. Сбор спермы проводили в соответствии с Национальной технологией замораживания и использования спермы племенных быков-производителей [9]. Использовали свежеполученное семя с подвижностью сперматозоидов более 7 баллов, минимальным количеством аномальных форм клеток.

Сперму разбавляли стерильной средой «BioXcell» (Франция). Один и тот же эякулят подвергался двум обработкам: свежий – оценивался сразу после добавления разбавителя при температуре 37°C и размороженный – оценивался после размораживания через 60 и 120 минут. В группе с размороженным эякулятом перед началом исследований соломины со спермой (0,25 мл) размораживали на водяной бане в течение 1 мин. Освобождение сперматозоидов от семенной плазмы осуществляли путём отмывания физраствором.

Криоконсервацию спермы проводили путём смешивания с разбавителем в отношении 1:1 при 27°C, далее образцы охлаждали до 18-22°C, затем производили окончательное разбавление, фасовку и эквilibрацию (выдержка при 4°C в течение 3-4 часов). Потом проводили охлаждение спермы в течение 7,5 минут до температуры -145°C, для длительного хранения контейнер с образцами помещали в жидкий азот, при температуре -196°C.

В сперматозоидах определяли интенсивность протекания свободнорадикальных процессов путем определения в клетках концентрации малонового диальдегида (МДА) (Владимиров, Арчаков, 1972) [1].

Для исследования активности в сперматозоидах антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы были использованы стандартные методики (Сирота, 2016) [11], (Рецкий, 2010) [12].

Математическая и статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета программ Statistic 10,0 и Microsoft Excel 2000. В случае распределения близкого к нормальному количественные показатели представлялись в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка средней величины. Уровень значимости (P) был принят равным или меньшим 0,05. Поиск межгрупповых различий проводили методом сравнения средних значений по критерию Стьюдента для выборочных средних значений.

Результаты исследований. Одним из информативных маркеров окислительного стресса в биологических субстратах считается малоновый диальдегид, который является одним из конечных продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот в клетке [13, 14].

Таблица

Влияние криоконсервации на перекисное окисление липидов
и активность антиоксидантных ферментов в сперматозоидах быков

Показатели свободнорадикального окисления	Исходно	После размораживания через 60 мин	После размораживания через 120 мин
МДА (нМоль/мл)	0,61 $\pm$ 0,32	0,85 $\pm$ 0,14 *	0,74 $\pm$ 0,28 *
СОД, ед. акт./мг белка	0,61 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,09 *	0,72 $\pm$ 0,12 *
Каталаза, мкат/мг	9,03 $\pm$ 0,76	8,48 $\pm$ 0,82	8,59 $\pm$ 0,91

Примечание: «*» – статистически значимые различия по отношению к сперматозоидам до криоконсервации, $p \leq 0,05$

Данные, полученные в нашем эксперименте, свидетельствуют о том, что после криоконсервации на протяжении всего эксперимента отмечалось повышение уровня малонового диальдегида относительно интактных сперматозоидов, что указывает на активизацию свободнорадикальных процессов в клетках (табл.). Через час уровень МДА был повышен на 30%, через два часа на 21%.

Считается, что основным негативным эффектом окислительного стресса в сперматозоидах является перекисное окисление липидов (ПОЛ). ПОЛ вызывает угнетение синтеза макроэргов, что, в свою очередь, приводит к снижению подвижности сперматозоидов [15-17]. В результате совокупности повреждений, вызванных окислительным стрессом, часть клеток сперматозоидов подвергается апоптозу, и они теряют подвижность. Более того, даже после оплодотворения эмбрионы, полученные от самцов с высоким уровнем окислительного стресса в семенной жидкости, имеют более высокую вероятность выкидыша из-за повреждения ДНК и окислительной модификации белков [18, 19].

Результаты по оценке активности ферментов антиоксидантной защиты в сперматозоидах быков, полученные в наших экспериментах представлены в таблице. Анализ полученных данных показал, повышение активности супероксиддисмутазы в сперматозоидах после криоконсервации на 28% и 18% через 60 и 120 минут соответственно. Вероятно, отмеченный эффект является компенсаторной реакцией на усиление процессов перекисного окисления липидов в клетках, поскольку этот фермент первым вступает в процесс антиоксидантной защиты (табл.). Активность каталазы после криоконсервации спермы не отличалась от показателей интактных клеток.

Таким образом, можно констатировать, что криоконсервация спермы негативно отражается на окислительно-антиоксидантном статусе, что может являться одним из патогенетических факторов нарушения репродуктивной функции быков.

Заключение. Процесс криоконсервации спермы быков голштинской породы, сопровождается изменением в цитоплазматической мембране сперматозоидов липид-белковых взаимодействий и метаболических характеристик спермиев, вызванных окислительным стрессом. Антиоксидантный потенциал супероксиддисмутазы после криоконсервации не зависел от инкубационного периода, активность каталазы после замораживания и оттаивания спермы не изменялась.

Список источников

1. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Лодяной М.С. Оценка резистентности мембран сперматозоидов быков в процессе долгосрочного хранения // Естественные и технические науки. 2022. Т. 1 (164). С. 107-109. EDN: QLDSAQ
2. Cocuzza M., Sikka S.C., Athayde K.S., Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. Int Braz J Urol. 2007. №33. P. 603-621. DOI: 10.1590/S1677-55382007000500002
3. Пискарев И.М., Иванова И.П., Самоделькин А.Г., Иващенко М.Н. Иницирование и исследование свободно-радикальных процессов в биологических экспериментах. Нижний Новгород, 2016. 106 с. ISBN: 978-5-903180-99-8 EDN: VYVZMV
4. Lenzi A., Gandini L., Picardo M., Tramer F., Sandri G., Panfili E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. FrontBiosci. 2000. №5. E1-E15.

5. Tarozzi N., Bizzaro D., Flamigni C., Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2007. №14 (6). P. 746-757. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)60678-5
6. Agarwal A., Virk G., Ong C., du Plessis S.S. Effect of oxidative stress on male reproduction // *The World Journal of Men's Health*. 2014. №32. P. 1-17.
7. Safarinejad M.R. Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study // *International urology and nephrology*. 2011. V. 43(2). P. 315-328. DOI: 10.1007/s11255-010-9826-4 EDN: IGZDLA
8. Mora-Esteves C., Shin D. Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold. *Semin Reprod Med*. 2013. №31. P. 293-300. DOI: 10.1055/s-0033-1345277 EDN: RRSDSV
9. Национальная технология замораживания и использования спермы племенных быков-производителей / под ред. А.И. Абилова, Н.М. Решетниковой, 2008. 160 с.
10. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с. EDN: PJBHRZ
11. Сирота Т.В. Стандартизация и регуляция скорости супероксидгенирирующей реакции автоокисления адреналина, используемой для определения про/антиоксидантных свойств различных материалов // *Биомедицинская химия*. 2016. Т. 62. №6. С. 650-655. DOI: 10.18097/PBMC20166206650 EDN: XHTVQD
12. Рецкий М.И. Методические положения по изучению процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты организма. Воронеж, 2010. 69 с. EDN: SYTFAD
13. Miroshnikov S., Zavyalov O., Frolov A., Poberukhin M., Sleptsov I.I., Sirazetdinov F. The content of toxic elements in hair of dairy cows as an indicator of productivity and elemental status of animals // *Environmental Science and Pollution Research*. 2019. T. 26. №18. C. 18554-18564. DOI: 10.1007/s11356-019-05163-5 EDN: ITDENP
14. Ohta S. Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic application // *Current Pharmaceutical Design*. 2017. V. 17 (22). P. 2241-2252. DOI: 10.2174/138161211797052664
15. McQueen D.B., Zhang J., Robins J.C. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril*. 2019. №112. P. 54-60. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.003
16. Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine // *Pharmacology & Therapeutics*. 2014. №144 (1). P. 1-11. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.04.006
17. Rivlin J., Mendel J., Rubinstein S., Etkovitz N., Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction // *Biol. Reprod*. 2004. №70. P. 518-522. DOI: 10.1095/biolreprod.103.020487
18. Koskimaa H.M. Human Papillomavirus Genotypes Present in the Oral Mucosa of Newborns and Their Concordance with Maternal Cervical Human Papillomavirus Genotypes // *J. Pediatr*. 2012. V.160. №5. P. 837-843. DOI: 10.1016/j.jpeds.2011.10.027 EDN: PLFFIF
19. Ohta S. Molecular hydrogen as a novel antioxidant: Overview of the advantages of hydrogen for medical applications // *Methods in Enzymology*. 2015. №555. P. 289-317. DOI: 10.1016/bs.mie.2014.11.038

References

1. Deryugina, A. V., Ivashchenko, M. N. & Lodyanov, M. S. (2022). Ocenka rezistentnosti membran spermatozoidov bykov v processe dolgosrochnogo hraneniya. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki (Natural and technical sciences)*, (164), 107-109. (in Russ).
2. Cocuzza, M., Sikka, S. C., Athayde, K. S. & Agarwal, A. (2007). Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol*, (33), 603-621.
3. Piskarev, I. M., Ivanova, I. P., Samodelkin, A. G. & Ivashchenko, M. N. (2016). Initsirovanie i issledovanie svobodno-radikal'nykh processov v biologicheskikh eksperimentah. *Nizhnij Novgorod*. 106 s. (in Russ).
4. Lenzi, A., Gandini, L., Picardo, M., Tramer, F., Sandri, G. & Panfili E. (2000). Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. *FrontBiosci*, (5), 1-15.
5. Tarozzi, N., Bizzaro, D., Flamigni, C. & Borini, A. (2007). Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, (14), 746-757.
6. Agarwal, A., Virk, G., Ong, C. & du Plessis, S.S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, (32), 1-17.
7. Safarinejad, M. R. (2011). Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. *International urology and nephrology*, (43), 315-328.
8. Mora-Esteves C., Shin D. (2013). Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold. *Semin Reprod Med*, (31), 293-300.
9. Nacional'naya tekhnologiya zamorazhivaniya i ispol'zovaniya spermy plemennykh bykov-proizvoditelej / pod red. A.I. Abilova, N.M. Reshetnikovoj. M. : 2008. 160 s. (in Russ).
10. Vladimirov, Yu. A. & Archakov, A. I. (1972). *Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranah*. M.: Nauka. 252 s. (in Russ).
11. Sirota, T. V. (2016). Standartizaciya i regulyaciya skorosti superoksidgeneriruyushchej reakcii avtookisleniya adrenalina, ispol'zuemoj dlya opredeleniya pro/antioksidantnykh svoystv razlichnykh materialov. *Biomedicinskaya himiya (Biomedical Chemistry)*, (6), 650-655. (in Russ).

12. Reckij, M. I. (2010). Metodicheskie polozheniya po izucheniyu processov svobodnoradikal'nogo okisleniya i sistemy antioksidantnoj zashchity organizma. Voronezh. 69 s. (in Russ).
13. Miroshnikov, S., Zavyalov, O., Frolov, A., Poberukhin, M., Sleptsov, I. I. & Sirazetdinov, F. (2019). The content of toxic elements in hair of dairy cows as an indicator of productivity and elemental status of animals. *Environmental Science and Pollution Research*, (18), 18554-18564.
14. Ohta, S. (2017). Recent progress toward hydrogen medicin: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic application. *Current Pharmaceutical Design*, (17), 2241-2252.
15. McQueen, D. B., Zhang, J., Robins, J. C. (2019). Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril*, (112), 54-60.
16. Ohta, S. (2014). Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, (144), 1-11.
17. Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N. & Breitbart, H. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* (70), 518-522.
18. Koskimaa, H. M. (2012). Human Papillomavirus Genotypes Present in the Oral Mucosa of Newborns and Their Concordance with Maternal Cervical Human Papillomavirus Genotypes. *J Pediatr*, (5), 837-843.
19. Ohta, S. (2015). Molecular hydrogen as a novel antioxidant: Overview of the advantages of hydrogen for medical applications. *Methods in Enzymology*, (555), 289-317.

Информация об авторах:

М. Н. Иващенко – кандидат биологических наук, доцент;
А. В. Дерюгина – доктор биологических наук, доцент;
А. А. Белов – кандидат биологических наук, доцент;
М. И. Латушко – кандидат технических наук;
А. П. Еремин – кандидат ветеринарных наук, доцент.

Information about the authors:

M. N. Ivashchenko – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor;
A. V. Deryugina – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor;
A. A. Belov – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor;
M. I. Latushko – Candidate of Technical Sciences;
A. P. Eremin – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article. The authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 17.01.2025; одобрена после рецензирования 21.02.2025; принята к публикации 5.03.2025.
The article was submitted 17.01.2025; approved after reviewing 21.02.2025; accepted for publication 5.03.2025.