

УДК: 636.082

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.370

ВЛИЯНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО- НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА МИТО-ТЕМРО НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ ПЕТУХОВ В ЦИКЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Курочкин А.А.* – мл. науч. сотр. лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц (ORCID 0000-0003-4430-4770); Станишевская О.И. – д-р биол. наук, гл. науч. сотр. лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц (ORCID 0000-0001-9504-3916); Силукова Ю.Л. – мл. науч. сотр. лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц (ORCID 0000-0003-1905-6373); Плешанов Н.В. – науч. сотр. лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц (ORCID 0000-0002-4634-7515).

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»

*kurochkin.anton.66@gmail.com

Ключевые слова: петухи, криоконсервация спермы, лиофилизация спермы, трегалоза, Mito-Темро, оксидативный стресс, антиоксиданты, митохондрии, активные формы кислорода.

Key words: roosters, sperm cryopreservation, sperm lyophilization, trehalose, Mito-Tempo, oxidative stress, antioxidants, mitochondria, reactive oxygen species.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-16-00009П.

Поступила: 05.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ

В репродуктивных технологиях, используемых в животноводстве, применение лиофилизированного семени возможно только с помощью технологии ИКСИ, ввиду полной потери подвижности сперматозоидов. Однако, особенности анатомического строения и развития яйцеклетки птиц не позволяют применять данную технологию. Стратегии, направленные на сохранение кинетического аппарата лиофилизированных сперматозоидов, являются наиболее актуальными для птиц. Повышение митохондриальной активности клеток ввиду ее связи с энергетическим обменом и подвижностью сперматозоидов может являться одним из путей решения данной проблемы. Однако, подобных исследований по лиофилизированному семени птиц до сих пор не было проведено. В представленном исследовании оценивалось влияние митохондриально-направленного антиоксиданта Mito-ТЕМРО на жизнеспособность, мембранный потенциал митохондрий и генерацию внутриклеточного пероксида водорода сперматозоидами петухов в цикле криоконсервации и лиофилизации. Доля клеток с интактной плазматической мембраной в лиофилизированной сперме была выше при ис-

пользовании разбавителей, содержащих антиоксидант. Добавление Mito-ТЕМРО в концентрации 40 μM к разбавителям Т-20 и Т-30 для целей криоконсервации семени с последующей лиофильной сушкой, позволило увеличить долю клеток с интактной плазматической мембраной в лиофилизированном семени в сравнении с контрольными разбавителями ($6,12 \pm 0,11\%$ против $10,19 \pm 0,46\%$ и $13,19 \pm 1,30\%$ против $15,23 \pm 1,13\%$ соответственно, $p < 0,05$). Эффективная концентрация Mito-ТЕМРО в разбавителях, предназначенных только для криоконсервации семени, была значительно ниже – 5 μM . Доля клеток с интактной плазматической мембраной составила $47,97 \pm 0,64\%$ против $55,85 \pm 1,69\%$ и $47,25 \pm 2,97\%$ против $63,21 \pm 1,78\%$, соответственно, $p < 0,05$. Доказан дозозависимый эффект трегалозы в составе криозащитных разбавителей.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Лиофилизация спермы, как и криоконсервация, является методом сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных животных. Успешные опыты по использованию лиофилизированного семени в репродуктивных технологиях животных показали возможность альтернативного хранения генетического материала. Однако использование лиофилизированного семени подразумевает применение технологии ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида), поскольку достичь приемлемого уровня общей подвижности спермы для искусственного осеменения пока не удалось. При этом большинство исследователей сходятся на том, что криоконсервация и лиофилизация не оказывает значимого влияния на степень фрагментации ДНК [1, 2], что также является одной из причин использования ИКСИ.

Функциональный статус лиофилизированных сперматозоидов после регидрации в огромной степени зависит от этапа замораживания, предшествующего лиофильной сушке. Подходы, применяемые для улучшения характеристик заморожено/оттаянной спермы справедливы и для повышения доли функциональных сперматозоидов после лиофилизации. Процесс криоконсервации способен индуцировать образование избыточного количества активных форм кислорода (АФК), превышающих антиоксидантную емкость клеток. Свободные радикалы и перекиси повреждают структуру белков, провоцируют перекисное окисление липидов плазматических мембран и изменяют функциональный статус митохондрий.

Деструктивное влияние АФК на репродуктивные клетки разных видов сельскохозяйственных животных не одинаково. Данные различия объясняются морфологическими особенностями сперматозоидов, липидным составом плазматических мембран, в частности соотношением холестерин/фосфолипиды [3]. Высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в плазматических мембранах сперматозоидов делает их уязвимыми к окислительному стрессу за счет процесса липопероксидации, когда в присутствии АФК ПНЖК легко подвергаются перекисному окислению. Данная особенность характерна для спермы птиц и является одной из причин низкой общей активности заморожено/оттаянного семени петухов [4]. Поэтому использование экзогенных антиоксидантов в разбавителях для спермы птиц является перспективным направлением для улучшения характеристик как охлажденной, так и оттаянной спермы.

В последние годы использование митохондриально-направленных антиоксидантов показало свою эффективность, однако исследований на сперме животных пока что не так много. Mito-ТЕМРО – специфичный для митохондрий антиоксидант, миметик супероксиддисмутазы, связывающийся с супероксидом и алкильными радикалами, проникаемый для клеточных мембран и селективно действующий в митохондриях клеток. В исследовании X. Lu et al. (2018) он показал способность снижать повреждения сперматозоидов, вызванные окислительным стрессом, и повышать качественные показатели семени после оттаивания [5]. В

исследовании Masoudi R. et al. (2020) добавление Mito-TEMPO в среду для хранения спермы петухов в охлажденном виде позволило сохранить приемлемые показатели качества за счет сохранения митохондриальной активности [6]. Эти же исследователи в другой работе показали, что добавление в среду для криоконсервации Mito-TEMPO приводило также к сохранению показателей качества и оплодотворяющей способности заморожено/оттаянного семени петухов [7]. Сходные исследования опубликованы и по другим видам сельскохозяйственных животных [8], и все исследователи сходятся на том, что данный антиоксидант оказывает положительное влияние на характеристики как нативной, так и оттаянной спермы. Однако нет исследований, в которых использовался бы данный подход для нивелирования деструктивного влияния процесса лиофилизации спермы.

Целью нашего исследования было определить возможность повышения митохондриальной активности и целостности плазматических мембран сперматозо-

идов петухов после цикла криоконсервации и лиофилизации путем добавления в криозащитный разбавитель Mito-TEMPO в различных концентрациях, а также оценить дозозависимый эффект трегалозы в составе разбавителя на эти показатели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Сперму, полученную от петухов породы царскосельская (n = 20) в возрасте 42–44 недель, «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», ВНИИ-ГРЖ, оценивали в лабораторных условиях с помощью фотометрических и микроскопических методов. Критериями отбора нативной спермы являлись следующие параметры: общая подвижность не менее 80%, объем не менее 0,1 мл, концентрация сперматозоидов не ниже 1,5 млрд/мл.

Оцененные эякуляты смешивали в один кластер и делили на аликвоты в соответствии с экспериментальными группами. В качестве контроля использовались среды для криоконсервации «Т-20» и «Т-30» без добавления антиоксиданта [9,10], (Таблица 1).

Таблица 1 – Состав контрольных сред для криоконсервации спермы петухов

Состав среды	Т-20	Т-30
Глутамат натрия, г	1,92 (114 мМ)	1,92 (114 мМ)
Фруктоза, г	0,64 (36 мМ)	0,56 (31 мМ)
Ацетат калия, г	0,5 (5 мМ)	0,5 (5 мМ)
Поливинилпирролидон, г	0,3 (8,3 мМ)	0,3 (8,3 мМ)
Протамин сульфат, г	0,032 (3,27 мМ)	0,032 (3,27 мМ)
Трегалоза, г	0,326 (9,5 мМ)	0,459 (13,4 мМ)
Дистиллированная вода, мл	100	100

Экспериментальные разбавители представляли собой контроль с добавлением Mito-TEMPO в концентрациях 5 μ М и 40 μ М. Разбавители добавляли к аликвотам спермы в соотношении 1:1 и помещали в холодильную камеру (t = 5 °С) для эквilibрации на 40 мин. После этого образцы семени объемом 0,5 мл центрифугировали на скоростной центрифуге LX-165T2R (Haier Biomedical, 2022г.), при 5 °С 1500 об/мин (214g), 10 мин и удаляли

надосадочную жидкость (170 мкл). Полученные образцы равномерно распределяли по стенкам пенициллиновых флаконов, и размещали в специальный штатив. Вращение в парах жидкого азота (t = -80 °С) проводили в течение одной минуты. По истечении данного времени флаконы опускали в жидкий азот. Оттаивание криоконсервированных образцов спермы осуществлялось в водяной бане (60 °С). Для лиофилизации образцов криоконсер-

вированной спермы использовали сублимационную сушилку (TFD-8501, ilShinbiobase Co., Ltd, Корея). Флаконы с семенем размещали в термоизоляционный футляр, стартовая температура образцов составила -150 °С, скорость повышения температуры образцов – 0,9 °С/мин. Рабочее давление вакуума в 5 мТорр достигалось за 12 мин. Образцы спермы лиофилизировали в течение 3 часов.

Регидратация семени

После лиофилизации проводили регидратацию лиофилизированного семени при комнатной температуре небольшими каплями средой LCM-GA5 (40 мг гиалуроновой кислоты на 100 мл LCM) и в течение 5 мин доводили до исходного объема спермы 0,5 мл [11].

Оценка состояния плазматических мембран сперматозоидов

Анализ состояния плазматических мембран сперматозоидов определяли с помощью флуорохрома – пропидия йодид (PI), Sigma – Aldrich, США. Метод оценки основывается на свойстве PI прочно связываться с молекулой ДНК и при этом не проникать в клетки с интактной плазматической мембраной. Суспензию клеток дважды отмывали, доводили до концентрации 3 x 10⁶/мл сперматозоидов, и добавляли PI до конечной концентрации 1 мМ. Оценка образцов проводилась на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter, Inc.).

Оценка мембранного потенциала митохондрий

Для окрашивания митохондрий в клетках использовали тетраметилродамин (TMRE), Sigma – Aldrich, США. Плазматическая мембрана клеток проницаема для данного красителя, что позволяет ему проникая в клетку, селективно накапливаться в митохондриях и удерживаться только в интактных митохондриях благодаря трансмембранному потенциалу. Влияние внешних факторов, уменьшающих трансмембранный потенциал, характеризуется снижением накопления красителя и, как следствие, снижением интенсивности флуоресценции. Суспензию клеток дважды отмывали, доводили до

концентрации 3 x 10⁶/мл сперматозоидов и добавляли TMRE до конечной концентрации 1 мМ. Образцы размещали в темном месте на 20 мин, при комнатной температуре, после чего производилась двойная отмывка образцов (1200 об. / мин. в течение 7 мин.) и оценка на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter, Inc.).

Оценка уровня АФК (внутриклеточного пероксида водорода)

Для детектирования внутриклеточного пероксида водорода использовали флуорохром – 2,7 - дихлорфлуоресцеина диацетат (DCFH-DA), Sigma – Aldrich, США. Этот краситель проникает для плазматических мембран клеток и при связывании с H₂O₂, позволяет детектировать это соединение, путем оценки флуоресценции клеток. Суспензию клеток дважды отмывали, доводили до концентрации 3 x 10⁶/мл сперматозоидов и добавляли DCFH-DA до конечной концентрации 4 мМ. Образцы размещали в темном месте на 20 мин, при комнатной температуре, после чего производилась двойная отмывка образцов (1200 об. / мин. в течение 7 мин) и оценка на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter, Inc.).

Статистика

Для статистической обработки данных использовали приложения Microsoft Excel 2021 и Statistica 7.0. Данные в работе представлены в виде средних значений (М) и стандартных ошибок средних (SEM). Различия оценивали по t – критерию Стьюдента и считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Первым этапом нашего исследования после получения и оценки нативных эякулятов была криоконсервация образцов спермы с контрольными и экспериментальными разбавителями (Таблица 1). Доля клеток с интактной плазматической мембраной, в зависимости от состава разбавителя, находилась в пределах от 47,25% до 63,21%, коэффициент вариации при этом составил 13,15%. Разбавители Т-20 и Т-30, не содержащие в своем составе антиоксиданты, показали мень-

шие результаты – 47,97% и 47,25% соответственно. В экспериментальных разбавителях средняя доля клеток с интактной плазматической мембраной была значительно выше и составила 53,25 %. Доля клеток, содержащих активные митохондрии, находилась в пределах от 58,7% до 74,31, коэффициент вариации составил 8,56%. Наилучшие показатели также бы-

ли получены при использовании экспериментальных разбавителей (Таблица 2). Полученные данные подтверждаются работами других исследователей и свидетельствуют как о положительном влиянии Mito-TEMPO на долю активных митохондрий, так и о взаимосвязи митохондриальной активности и жизнеспособности клеток в цикле криоконсервации [5,6,7,8].

Таблица 2 – Митохондриальная активность, целостность плазматических мембран и уровень генерации внутриклеточного пероксида водорода сперматозоидов петухов в цикле криоконсервации и лиофилизации

Метод сохранения спермы и группы с разным составом разбавителя		Клетки с интактной плазматической мембраной, %	Внутриклеточный H_2O_2 , %	Высокий мембранный потенциал митохондрий, %
Криоконсервация	T20	47,97 ^a ±0,64	15,51 ^m ±1,64	66,99 ^s ±3,19
	T20MQ5	55,85 ^b ±1,69	26,75 ⁿ ±3,09	74,31 ^t ±2,51
	T20MQ40	47,86 ^c ±6,38	18,02 ^o ±2,68	61,77 ^u ±0,84
	T30	47,25 ^d ±2,97	4,62 ^p ±1,45	67,99 ^v ±4,33
	T30MQ5	63,21 ^e ±1,78	13,64 ^q ±6,55	70,58 ^w ±7,01
	T30MQ40	46,15 ^f ±11,60	12,16 ^r ±3,67	58,70 ^x ±2,34
Ллиофилизация	T20	6,12 ^A ±0,11	3,63 ^M ±1,01	1,54 ^S ±0,07
	T20MQ5	8,60 ^B ±0,36	2,90 ^N ±0,89	1,97 ^T ±0,13
	T20MQ40	10,19 ^C ±0,46	2,39 ^O ±0,07	3,70 ^U ±1,54
	T30	13,19 ^D ±1,30	1,87 ^P ±0,25	1,53 ^V ±0,02
	T30MQ5	15,83 ^E ±3,01	3,77 ^Q ±2,20	2,75 ^W ±0,01
	T30MQ40	15,23 ^F ±1,13	5,92 ^R ±4,09	4,67 ^X ±0,89

Данные представлены в виде M±SEM. ab, ae, ec, dc, pm, pn, po, pr, AB, AC, AD, AE, AF, BF, BD, ST, SW, SX, XV, XT, XS, WT, WV – p < 0,05

Полученные данные по качественным показателям лиофилизированных сперматозоидов с учетом состава используемых разбавителей свидетельствуют, в целом, о значительном снижении этих показателей (Табл. 2). При этом различия от использования контрольных и экспериментальных разбавителей были уже более явными. Доля клеток с интактной плазматической мембраной находилась в пределах от 6,12% до 15,83%, коэффициент вариации данного показателя составил 33,51%. Стоит отметить, что в отличие от полученных нами данных, большинство исследований по лиофилизации спермы животных констатируют долю сперматозоидов с поврежденной плазматической

мембраной на уровне 99-100% [2,12,13,14], что доказывает преимущества разработанного нами протокола лиофильной сушки сперматозоидов петухов и эффективность использования митохондриально-направленных антиоксидантов в составе разбавителей. О возможности сохранения функциональной способности лиофилизированных сперматозоидов птиц свидетельствует и наличие клеток с высоким митохондриальным потенциалом, их доля находилась в пределах от 1,53% до 4,67%, коэффициент вариации – 47,39%. Высокий показатель вариационности по этому показателю при использовании разных концентраций Mito-TEMPO в составе разбавителя говорит о большом

влиянии митохондриального антиоксиданта на активность митохондрий в цикле лиофилизации спермы. Поскольку возможности сперматозоидов многих видов животных и птицы синтезировать антиоксиданты ограничена, большая их часть содержится в семенной плазме и в основном состоит из ферментов [15,16]. Цикл криоконсервации и лиофилизации индуцирует образование избыточного количества АФК подавляя работу этих клеточных защитных механизмов [17].

При оценке всего массива полученных данных по показателям митохондриальной активности клеток и доли клеток с интактной плазматической мембраной был рассчитан коэффициент корреляции – 0,96 ($p < 0,001$). Возможное объяснение данной взаимосвязи лежит в деструктивном влиянии процесса криоконсервации и лиофилизации на митохондрии клеток, которое, в свою очередь, приводит к нарушению или даже полному прерыванию митохондриальной дыхательной цепи. Это прерывание провоцирует восстановление кислорода с образованием вместо молекул воды промежуточных молекул, таких как анион супероксида, гидроксильный радикал и пероксид водорода. А особенности биохимического состава плазматических мембран сперматозоидов петухов, которые содержат большое количество ПНЖК, делают их восприимчивыми к процессу окисления [4, 15].

В настоящий момент невосстанавливающие дисахариды широко используются в качестве лиопротекторов при лиофилизации белков и липосомальных систем, а также при криоконсервации репродуктивных клеток в роли криопротекторов. Трегалоза, дисахарид, который является частично проникающим для клеточных мембран, оказывает защитное действие, связанное с осмотическим эффектом, специфическим взаимодействием с мембранными фосфолипидами и уменьшением количества повреждений клеток в результате кристаллизации льда [9,10,18]

По результатам проточной цитометрии была выявлена достоверная разница между долей клеток с интактной плазма-

тической мембраной и высоким митохондриальным потенциалом в лиофилизированной и сперме при использовании разбавителей, в которых часть моносахаридов была заменена дисахаридом трегалозой в концентрации 13,4 мМ, в отличие от разбавителей с добавлением 9,5 мМ трегалозы. Достоверная разница между показателями наблюдалась как в контрольных, так и в экспериментальных образцах криоконсервированного и лиофилизированного семени (Таблица 2).

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

По результатам проведенных исследований, повышение митохондриальной активности сперматозоидов за счет добавления экзогенного антиоксиданта Mito-TEMPO в разбавитель для семени петухов, действие которого направлено на повышение этого показателя, показало свою эффективность в его улучшении. Доля клеток с интактной плазматической мембраной в лиофилизированном семени также была выше при использовании разбавителей, содержащих антиоксидант. Добавление Mito-TEMPO в концентрации 40 мМ к разбавителю позволило улучшить показатели лиофилизированной спермы в сравнении с контрольными группами, однако стоит сказать, что для криоконсервированной спермы концентрация в 5 мМ была более эффективной.

Достоверная корреляция между долей сперматозоидов с интактными плазматическими мембранами и высоким мембранным потенциалом митохондрий в клетках может говорить о комплексном воздействии антиоксиданта, и указывает на перспективность стратегии повышения показателей лиофилизированной спермы для дальнейшего использования в искусственном осеменении, путем сохранения высокого мембранного потенциала митохондрий. Использование разбавителей для криоконсервации и лиофилизации с добавлением невосстанавливающего дисахарид трегалозы, доказало ее эффективность в повышении мембранного потенциала митохондрий и сохранении целостности плазматических мембран оттаянной и лиофилизированной спермы пе-

тухов. Сравнение показателей лиофилизированного семени, выявило, что использование разбавителей, в которых часть моносахаридов была заменена дисахаридом трегалозой в концентрации 13,4 мМ, показывали большую долю клеток с интактной плазматической мембраной и долю клеток с высоким митохондриальным потенциалом. Модернизация состава сред и использование трегалозы в качестве лиопротектора можно является эффективным направлением для сохранения жизнеспособных сперматозоидов петухов в состоянии ангидробиоза.

THE EFFECT OF THE MITOCHONDRIAL-DIRECTED ANTIOXIDANT MITO-TEMPO ON THE QUALITY INDICATORS OF ROOSTER SPERM IN THE CRYOPRESERVATION AND LYOPHILIZATION CYCLE

Kurochkin A.A.* – Jr. sci. sotr. laboratories of genetics, breeding and conservation of genetic resources of farm birds; **Stanishevskaya O. I.** – Doctor of Biological Sciences, ch. sci. sotr. laboratories of genetics, breeding and conservation of genetic resources of farm birds; **Silyukova Y. L.** – Jr. scientific. sotr. laboratories of genetics, breeding and conservation of genetic resources of farm birds; **Pleshanov N.V.** – scientific. sotr. laboratories of genetics, breeding and conservation of genetic resources of farm birds.

VIZ named after Academician L. K. Ernst"

*kurochkin.anton.66@gmail.com

Financing. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation, project No. 19-16-00009P.

ABSTRACT

In reproductive technologies applied in animal husbandry, using lyophilized semen is only possible with ICSI technology, due to complete loss sperm motility. However, the anatomical structure's peculiarities and development of avian oocyte not allows use this technology. Strategies aimed at preserving kinetic apparatus of lyophilized sperm are the most relevant for birds. Increasing

mitochondrial activity of cells due to its connection with energy metabolism and sperm motility may be one of the ways to solve this problem. However, similar studies on freeze-dried bird semen haven't been conducted on this moment. The present study assessed effect of mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on viability, mitochondria's membrane potential and generation of intracellular hydrogen peroxide by rooster spermatozoa in a cryopreservation and lyophilization cycle. Proportion of cells with intact plasma membrane in lyophilized semen was higher using extenders containing an antioxidant. Addition of Mito-TEMPO at concentration of 40 μ M to diluents T-20 and T-30 for the purpose of cryopreservation of semen with subsequent freeze-drying allowed to increase proportion of cells with intact plasma membrane in lyophilized semen in comparison to control diluents (6.12 ± 0.11 % versus 10.19 ± 0.46 % and 13.19 ± 1.30 % versus 15.23 ± 1.13 %, respectively, $p < 0.05$). Effective concentration of Mito-TEMPO in diluents intended only for semen cryopreservation was significantly lower - 5 μ M. Proportion of cells with intact plasma membrane was 47.97 ± 0.64 % versus 55.85 ± 1.69 % and 47.25 ± 2.97 % versus 63.21 ± 1.78 %, respectively, $p < 0.05$. Dose-dependent effect of trehalose in cryoprotective diluents has been proven.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Hara H. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa / Hara H., Tagiri M., Hwang I. S., Takahashi M., Hirabayashi M. // Cryobiology. 2014. Vol. 68. № 3. P. 354.
2. Martins C. F. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm / Martins C. F., Bão S. N., Dode M. N., Correa G. A., Rumpf R. // Theriogenology. 2007. Vol. 67. № 8. P. 1307.
3. Плешанов Н. В. Кривоустойчивость спермы петухов в зависимости от содержания в ней липидов / Плешанов Н. В., Станишевская О. И., Силукова Ю.Л. // Генетика и разведение животных. – 2017. – № 3. – С. 34.

4. Surai P. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen / Surai P., Fujihara N., Speake B., Brillard J., Wishart G., Sparks N. // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2001. Vol. 17. № 7. P. 1024.
5. Lu X. Mitochondria-targeted antioxidant Mito-Tempo improves the post-thaw sperm quality / Lu X., Zhang Y., Bai H., Liu J., Li J., Wu B. // *Cryobiology*. 2018. Vol. 80. P. 26.
6. Masoudi R. The mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO conserves rooster's cooled semen quality and fertility potential / Masoudi R., Asadzadeh N., Sharafi M. // *Theriogenology*. 2020. Vol. 156. P. 236.
7. Masoudi R. Effects of freezing extender supplementation with mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on frozen-thawed rooster semen quality and reproductive performance / Masoudi R., Asadzadeh N., Sharafi M. // *Animal Reproduction Science*. 2021. Vol. 225. № 106671.
8. Asadzadeh N. Fertility and flow cytometry evaluations of ram frozen semen in plant-based extender supplemented with Mito-TEMPO / Asadzadeh N., Abdollahi Z., Esmailkhanian S., Masoudi R. // *Animal Reproduction Science*. 2021. Vol. 233. № 106836.
9. Stanishvskaya O. Trehalose as a stabilizer of the lipid composition of membranes and the composition of the cytosol of frozen/thawed rooster spermatozoa / Stanishvskaya O., Silyukova Y., Tereshina V., Yanutsevich E., Pleshanov N., Kurochkin A., Fedorova E. // *Agriculture*. 2023. Vol. 13. № 7.
10. Stanishvskaya O. Effects of trehalose supplementation on lipid composition of rooster spermatozoa membranes in a freeze/thaw protocol / Stanishvskaya O., Silyukova Y., Fedorova E., Pleshanov N., Kurochkin A., Tereshina V., Ianutsevich E. // *Animals*. 2023. Vol. 13. № 6. P. 1023.
11. Stanishvskaya O. A successful protocol for achieving anhydrobiosis of Gallus Gallus Domesticus spermatozoa while maintaining their fertility IN VIVO / Stanishvskaya O., Silyukova Y., Pleshanov N., Kurochkin A., Fedorova E., Radaev A. // *Cryobiology*. 2022. Vol. 104. P. 102.
12. Oldenhof H. Freezing-induced uptake of disaccharides for preservation of chromatin in freeze-dried stallion sperm during accelerated aging / Oldenhof H., Zhang, M., Narten K., Bigalk J., Sydykov B., Wolkers W. F., Sieme H. // *Biology of reproduction*. 2017. Vol. 97. № 6. P. 892.
13. Anzalone D. A. Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species / Anzalone D. A., Palazzese L., Iuso D., Martino G., Loi P. // *Animal reproduction science*. 2018. Vol. 190. P. 85.
14. Palazzese L. DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development / Palazzese L., Gosálvez J., Anzalone D. A., Loi P., Saragusty J. // *Journal of reproduction and development*. 2018. Vol. 64. № 5. P. 393.
15. Partyka A., Lukaszewicz E., Nizanski W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. // *Theriogenology*. – 2012. – № 77. – P. 1497-504.
16. Khan R., Laudadio V., Tufarelli V. Semen Traits and Seminal Plasma Biochemical Parameters in White Leghorn Layer Breeders. // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2011. – № 47(2). – P. 190–195
17. Baumber J. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation / Baumber J., Ball B., Gravance C., Medina V., Davies-Morel M. // *Journal of andrology*. 2000. Vol. 21. № 6. P. 895.
18. Molinia F. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa / Molinia F., Evans G., Quintana Casares P., Maxwell W. // *Animal Reproduction Science*. 1994. Vol. 36. № 1-2. P. 113.

REFERENCES

1. Hara H. Adverse effect of the destruction of the cake on the functional integrity of lyophilized sperm bulls / Hara H., Tagiri M.,

- Hwang I. S., Takahashi M., Hirabayashi M. // *Cryobiology*. 2014. Volume 68. No. 3. p. 354.
2. Martins K. F. Influence of freeze drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation and fertilizing ability of cattle spermatozoa / Martins K. F., Bao S. N., Daudet M. N., Correa G. A., Rumpf R. // *Theriogenology*. 2007. Volume 67. No. 8. p. 1307.
3. Pleshanov N. V. Cryostability of rooster sperm depending on the content of lipids in it / Pleshanov N. V., Stanishevskaya O. I., Silyukova Yu.L. // *Genetics and breeding of animals*. - 2017. - No. 3. - p. 34.
4. Surai P. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in bird semen / Surai P., Fujihara N., Speke B., Brillard J., Wishart G., Sparks N. // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2001. Volume 17. No. 7. p. 1024.
5. Lu H. The antioxidant Mito-Tempo aimed at mitochondria improves the quality of sperm after thawing / Lu H., Zhang Y., Bai H., Liu J., Li J., Wu B. // *Cryobiology*. 2018. Volume 80. Page 26.
6. Masudi R. Antioxidant Mito-TEMPO, aimed at mitochondria, preserves the quality of cooled cock sperm and fertility potential / Masudi R., Asadzade N., Sharafi M. // *Theriogenology*. 2020. Volume 156. Page 236.
7. Masudi R. The effect of the additive for freezing the extender with the mitochondrial antioxidant Mito-TEMPO on the quality of frozen and thawed sperm of roosters and reproductive indicators / Masudi R., Asadzade N., Sharafi M. // *Science of animal reproduction*. 2021. Volume 225. No. 106671.
8. Asadzade N. Evaluation of fertility and flow cytometry of frozen sheep sperm in a vegetable filler with the addition of Mito-TEMPO / Asadzade N., Abdollahi Z., Esmaikhanyan S., Masudi R. // *Science of animal reproduction*. 2021. Volume 233. No. 106836.
9. Stanishevskaya O. Trehalose as a stabilizer of lipid composition of membranes and cytosol composition of frozen/thawed rooster spermatozoa / Stanishevskaya O., Silyukova Yu., Tereshina V., Yanutsevich E., Pleshanov N., Kurochkin A., Fedorova E. // *Agriculture*. 2023. Volume 13. No. 7.
10. Stanishevskaya O. The effect of trehalose additives on the lipid composition of rooster sperm membranes in the freezing/thawing protocol / Stanishevskaya O., Silyukova Yu., Fedorova E., Pleshanov N., Kurochkin A., Tereshina V., Yanutsevich E. // *Animals*. 2023. Volume 13. No. 6. p. 1023.
11. Stanishevskaya O. A successful protocol for achieving anhydrobiosis of Gallus Gallus Domesticus spermatozoa while maintaining their fertility IN VIVO / Stanishevskaya O., Silyukova Yu., Pleshanov N., Kurochkin A., Fedorova E., Radaev A. // *Cryobiology*. 2022. Vol. 104. p. 102.
12. Oldenhof H. Freezing-induced absorption of disaccharides for chromatin preservation in lyophilized sperm of stallions with accelerated aging / Oldenhof H., Zhang M., Narten K., Bigalk J., Sydykov B., Volkers V. F., Sime H. // *Biology of reproduction*. 2017. Volume 97. No. 6. p. 892.
13. Ansalone D. A. Lyophilized spermatozoa: an alternative biobanking option for endangered species / Ansalone D. A., Palazzese L., Yuso D., Martino G., Loi P. // *Science of animal reproduction*. 2018. Volume 190. p. 85.
14. Palazzese L. DNA fragmentation in epididymal sublimated sheep spermatozoa worsens embryo development / Palazzese L., Gosalves J., Ansalone D. A., Loi P., Saragusti J. // *Journal of Reproduction and Development*. 2018. Volume 64. No. 5. p. 393.
15. Partika A., Lukashevich E., Nizansky V. The effect of cryopreservation on sperm counts, lipid peroxidation and the activity of antioxidant enzymes in poultry sperm. // *Theriogenology*. - 2012. - No. 77. - pp. 1497-504.
16. Khan R., Laudadio V., Tufarelli V. Signs of sperm and biochemical parameters of seminal plasma in producers of the White Leghorn breed. // *Reproduction in domestic animals*. - 2011. - № 47(2). - Pp. 190-195
17. Baumber J. The influence of reactive oxygen species on mobility, viability, integrity of acrosomes, mitochondrial membrane potential and lipid peroxidation of membranes / Baumber J., Ball B., Gravans S., Medina V., Davis-Morel M. // *Journal of Andrology*. 2000. Volume 21. No. 6. p. 895.
18. Molinia F. Influence of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on mobility, acrosome integrity and fertility of sheep sperm frozen in granules / Molinia F., Evans G., Quintana Casares P., Maxwell V. // *Science of Animal Reproduction*. 1994. Vol. 36. No. 1-2. p. 113.