

УДК: 636.01/5:636.5:636.082:636.018

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.379

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЕТУХОВ (*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*) И ЕГО ДИНАМИКА В ПРОЦЕССЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Станишевская О.И. – д-р биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лабораторией 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).

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».

*olgastan@list.ru

Ключевые слова: криоконсервация, сперматозоиды, петухи, разбавитель для семени, липиды плазматической мембраны, цитозоль, трегалоза.

Key words: cryopreservation, spermatozoa, roosters, semen extender, plasma membrane lipids, cytosol, trehalose

Финансирование. Данное исследование было проведено при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-16-00009Р.

Поступила: 05.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ

Особенности строения плазматических мембран сперматозоидов птиц делает их более чувствительными, по сравнению с таковыми млекопитающих, к низкотемпературному стрессу. Качественный и количественный состав липидов мембран может стать определяющим фактором при разработке новых эффективных составов криозащитных сред. Целью исследования было определить липидный состав плазматических мембран нативных сперматозоидов петухов, содержание углеводов и полиолов в составе их цитозоля, а также динамические изменения липидов мембран и состава цитозоля в процессе криоконсервации в зависимости от состава криозащитной среды. Исследования проведены на петухах породы род-айланд (n=10), определяли общую и прогрессивную подвижность сперматозоидов, поврежденность мембран. Замораживание и оттаивание семени осуществлялось по fast-протоколам. Для определения липидного состава плазматических мембран сперматозоидов и состава их цитозоля использовали метод хроматографического анализа. В составе мембран нативных сперматозоидов идентифицировали: фосфолипиды, гликолилипиды и нейтральные липиды, представленные фосфатидилэтаноламином, фосфатидилсерином, фосфатидилхолином, сфингомиелином и стеролом. Показано изменение соотношения между мембранными липидами внутреннего и наружного слоев плазматической мембраны сперматозоидов петухов в процессе крио-

консервации. У нативных сперматозоидов это соотношение составило 41,2% и 39,4% соответственно, у оттаянных сперматозоидов при использовании среды ЛКС-контроль – 38,3% и 47,2% соответственно, при использовании среды ЛКС-T20 – 40,7% и 44,5% соответственно. Отмечено значительное снижение, более чем в 3 раза, общей суммы углеводов (фруктоза, глюкоза, трегалоза) и полиолов (глицерин, маннит, инозитол) в цитозоле заморожено/оттаянных сперматозоидов при использовании криопротекторной среды ЛКС-контроль по сравнению со значениями нативного семени - 0,1145 мг/мл и 0,0360 мг/мл соответственно. При использовании среды ЛКС-T20 изменение было незначительным, и дельта составила 5,2%. Доказана эффективность использования криозащитной среды ЛКС-T20, содержащей трегалозу, для поддержания в процессе замораживания/оттаивания липидной мембранной архитектуры сперматозоидов петухов, углеводно-полиольного состава их цитозоля и, как следствие, морфофункциональной полноценности гамет.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Для совершенствования существующих технологий замораживания семени сельскохозяйственных птиц необходимо понимание тонких морфологических и физико-химических деструктивных изменений, происходящих в клетке под влиянием замораживания/оттаивания. Знание наиболее «уязвимых мест» позволит более эффективно подбирать композиционный состав криозащитных сред. Показатель целостности плазматических мембран сперматозоида является основным индикатором в определении жизнеспособности семени в протоколе замораживания/оттаивания. Сперматозоиды – это высокоспециализированные клетки с предельно низким внутриклеточным объемом цитозоля и специфическим строением плазматических мембран, липидный состав которых отличается высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), стерина, фосфатидилхолинов (ФХ) и сфингомиелинов (СМ), играющих важную роль при взаимодействии между сперматозоидами и яйцеклеткой [1]. На основе изучения криорезистентности генеративных клеток в протоколе замораживания/оттаивания, в основном на млекопитающих, определены такие критически значимые для сохранения морфофункциональной полноценности факторы, как изменение состава цитозоля сперматозоидов и липидного состава плазматических мембран. В соответствии с принципом жидкостно-мозаичной модели, который лежит в основе современной гипотезы строения плазматических мем-

бран, архитектура мембран клеток представляет собой сложную композицию, включающую в себя обширные классы липидов (фосфолипиды, холестерин и гликолипиды) [2]. Качественный и количественный состав липидов мембран может стать определяющим фактором при разработке составов криозащитных сред на основе изучения взаимодействия компонентов сред с молекулами липидов плазматической мембраны сперматозоидов. Так, например, при изучении липидного состава заморожено/оттаянных сперматозоидов у *Bos taurus taurus* было отмечено повышение концентрации свободного холестерина, свободных жирных кислот, триацилглицерина и эфиров холестерина относительно показателей нативных спермиев, и отмечена их связь со снижением подвижности и фертильности сперматозоидов в результате повреждения их мембран [3]. Сложное строение плазматической мембраны сперматозоидов петухов, липиды которой отличаются повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот, делающим клетку особенно восприимчивой к окислительному стрессу (в отличие от таковой млекопитающих), мало представлено в литературных источниках.

Выбор криопротектора при разработке состава криозащитной среды во многом определяется степенью его токсичности и проявляющимися стабилизирующими свойствами. Наиболее подходящими, с этой точки зрения, являются вещества, синтезируемые живыми организмами, в норме подвергающимися стрессовому

воздействию температурных факторов или обезвоживанию. Трегалоза, по данным многочисленных исследований, является в этом плане уникальным веществом. В наших предыдущих исследованиях представлены результаты по успешному использованию криопротекторных сред с содержанием трегалозы для повышения оплодотворяющей способности заморожено/оттаянного семени петухов [4]. По данным Корольковой и др. (2020) дисахарид трегалоза в протоколе замораживания/оттаивания выполняет роль стабилизатора белков и фосфолипидов липидного бислоя клеток посредством образования водородных связей, что является важным механизмом обеспечения устойчивости липидных бислоев [5]. Опубликованы исследования по моделированию взаимодействия трегалозы с бислоями, где было подтверждено образование множественных водородных связей молекул трегалозы с липидами модельных мембран [6,7].

Целью исследования было определить липидный профиль плазматических мембран и углеводно-полиольный состав цитозоля сперматозоидов петухов и их динамику под влиянием состава криозащитной среды в процессе криоконсервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Объект исследования. Для экспериментов использовали сперму петухов породы красный род-айланд из Центра коллективного пользования «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», ВНИИГРЖ. Экспериментальное поголовье содержалось в индивидуальных клетках в соответствии с утвержденной технологией. Использовали эякуляты, полученные от петухов (n=10) в возрасте 52-56 нед. жизни, половая нагрузка составляла 2-3 дня в неделю. Все эякуляты оценивали индивидуально по следующим критериям: объем (мл); концентрация (млрд/мл, фотометр Accuread, Великобритания); общая подвижность сперматозоидов (%), CASA АргусСофт. Россия; Motiс BA410E, Китай). Полученные эякуляты

объединяли и делили на 2 части: добавляли криозащитную среду 1 часть – ЛКС-контроль [8], 2 часть – ЛКС-T20 [9] в соотношении 1:1. Замораживали в гранулах по протоколу, описанному Станишевской и др. (2023) [9]. Хранили замороженное семя в сосудах Дьюара в течение 30 дней. Оттаивали с использованием целевого оттаивателя при температуре 60°C (разработка, ВНИИГРЖ 1989).

Оценка семени. Объединенные и заморожено/оттаянные эякуляты оценивали по жизнеспособности (%), окрашивание эозин/нигрозин [10], 3 повторности), поврежденность акросом (%), окрашивание Кумасси синий R250 [11], 3 повторности), общую и прогрессивную подвижность сперматозоидов (%), CASA ПО АргусСофт, СПб, Россия, 2020, Motiс BA410E, Китай, 2019).

Образцы семени для хроматографии. Эякуляты объединяли, объединенный объем семени составлял не менее 10-12 мл, делили на 3 части и разбавляли: 1 – нативное неразбавленное, 2 – ЛКС-контроль, 3 – ЛКС-T20 в соотношении 1:1. Охлаждали до температуры 5°C; центрифугировали 10 мин ^x 3000 об/мин. Удаляли надосадочную жидкость, промывали 0,9% HCl, процедуру повторяли трижды. Конечный центрифугат семени собирали на капроновый фильтр и осаждали еще 30 минут. Образцы центрифугатов и надосадочной жидкости замораживали и хранили при -25°C.

Анализ растворимых углеводов цитозоля и мембранных липидов сперматозоидов. Липиды и углеводы анализировали, как описано ранее [9,12].

Статистические методы. Для статистической обработки использовали пакет средств анализа данных MS Excel 2013 (США), данные представлены в виде $MEAN \pm SE$. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Процесс замораживания/оттаивания оказывает значительное негативное влияние на морфофункциональные показатели сперматозоидов, что выражается в снижении показателей подвижности почти в 2

раза. При этом количество сперматозоидов с поврежденной мембраной после оттаивания увеличилось с 9,6% до 62,0%, а поврежденность акросом – с 0,7% до 61,9 % (таблица 1).

Состав криозащитной среды не оказал значимого влияния на показатели общей и прогрессивной подвижности оттаянных сперматозоидов петухов. Однако, трегалоза в концентрации 9,5mM в составе разбавителя ЛКС-Т20 позволила достоверно ($p < 0,05$) снизить уровень поврежденности плазматических мембран за-

морожено/оттаянных сперматозоидов и снизить показатель поврежденности акросом сперматозоидов на 3,1% (таблица 1).

Для определения состава липидов плазматических мембран нативных и заморожено/оттаянных сперматозоидов и его динамики был проведен хроматографический анализ. В качестве основных липидов плазматических мембран сперматозоидов идентифицировали фосфолипиды, гликолилипиды и нейтральные липиды; липидный профиль представлен фосфатидилэталомин, фосфатидилсе-

Таблица 1 – Показатели качества семени петухов до и после замораживания ($n_{\text{♂}}=10$)

Показатели оценки объединенных эякулятов	Нативное семя	Заморожено/оттаянное	
		ЛКС-контроль	ЛКС-Т20
Общая подвижность, %	86,3±0,04	42,7±0,7	43,2±1,1
Прогрессивная подвижность, %	65,7±0,14	24,3±2,6	27,6±2,1
Поврежденность мембран, %	9,6±0,01	62,0 ^a ±7,7	57,8 ^b ±1,7
Поврежденность акросом, %	0,7±0,01	61,9±6,1	58,8±3,2

^{a,b} $p < 0,05$

Таблица 2 – Состав липидов плазматических мембран нативных и заморожено/оттаянных сперматозоидов петухов

Липидный состав мембран сперматозоидов	Нативная сперма	Оттаянная сперма	
		ЛКС-контроль	ЛКС-T20
	% от сухой биомассы		
фосфатидилэталомин (ФЭ)	3,5	4,1	2,0
фосфатидилсерин (ФС)	2,3	3,8	2,0
фосфатидилхолин (ФХ)	4,2	6,7	2,9
сфингомиелин (СМ)	1,3	3,1	1,4
гликолипид (ГЛ)	0,3	0,3	0,1
кардиолипин (КЛ)	0,1	0,1	0,0
сульфогликолипид (СФЛ)	0,5	0,5	0,3
стерол (СТ)	1,9	2,1	1,0
	% от Σ липидов		
фосфатидилэталомин (ФЭ)	24,8	20,0	20,6
фосфатидилсерин (ФС)	16,4	18,3	20,1
фосфатидилхолин (ФХ)	30,0	32,2	30,3
сфингомиелин (СМ)	9,4	15,0	14,1
гликолипид (ГЛ)	2,0	1,2	1,4
кардиолипин (КЛ)	0,4	0,4	0,0
сульфогликолипид (СФЛ)	3,5	2,6	2,7
стерол (СТ)	13,5	10,4	10,7

рином, фосфатидилхолином, сфингомиелином и стеролом.

Ответом на стресс, вызванный протоколом замораживания/оттаивания, является перестройка мембранных связей сперматозоидов за счет изменения соотношения не только основных (ФЭ, ФС, ФХ, СМ и СТ), но и изменения минорных липидов (ГЛ, КЛ, СГЛ). Известно, что изменения в соотношении глицерин-фосфолипид-холестерин играют существенную роль в саморегуляции мембран сперматозоидов, связанной с криотолерантностью [13, 14]. Соотношение липидов плазматических мембран может быть постулатом для общей основы прогнозируемых криповреждений сперматозоидов.

Липиды, относящиеся, по литературным данным, к внутреннему слою плазматической мембраны – фосфатидилсерин и фосфатидилэтанолмин, у сперматозоидов нативного семени суммарно составили 41,2% от общего количества липидов, а липиды наружного слоя – фосфатидилхолин и сфингомиелин – 39,4% (таблица 2). В протоколе замораживания/оттаивания (среда ЛКС-контроль) этот показатель составил 38,3% и 47,2% соответственно. Таким образом, показано изменение соотношения между мембранными липидами внутреннего и наружного слоев под влиянием протокола замораживания/оттаивания. При использовании криопротекторной среды ЛКС-T20 это соотношение составляло 40,7% и 44,5% соответственно. Нами отмечено, что наиболее значимое влияние протокола замораживания/оттаивания сперматозоидов было оказано на липиды, относящиеся к внешнему слою плазматической мембраны, но это изменение было менее выражено при использовании криозащитной среды ЛКС-T20, содержащей дисахарид трегалозу. Таким образом, было получено объяснение экзоцеллюлярного действия трегалозы в протоколе криоконсервации сперматозоидов петухов. Кроме того, было установлено изменение соотношения холестерин-фосфолипиды в составе плазматических мембран под влиянием про-

цесса криоконсервации. Это соотношение в плазматических мембранах сперматозоидов нативного семени составляло 0,166, а после деконсервации – 0,121 и 0,126 в зависимости от состава криопротекторной среды (ЛКС-контроль и ЛКС-T20 соответственно). Эти результаты согласуются с результатами исследований Longobardi V. et al. (2017), полученных на *Bubalus bubalis*, что низкотемпературный стресс индуцирует изменение соотношения холестерин-фосфолипиды в плазматических мембранах сперматозоидов, приводящее к криокаптации и преждевременной акросомной реакции в размороженных сперматозоидах [15].

Для определения состава углеводов и полиолов в цитозоле сперматозоидов петухов под влиянием используемых криозащитных сред и протокола криоконсервации, проведен хроматографический анализ; идентифицировали углеводы – фруктозу, глюкозу, трегалозу и полиолы – глицерин, маннит, инозит. Были получены результаты, показывающие динамическое изменение в составе цитозоля, что выражалось в резком увеличении содержания глицерина в расчете от общей суммы углеводов и полиолов (среда ЛКС-контроль) – почти в 8 раз, с 3,9% до 30,8% (табл. 3).

Отмечено значительное (более чем в 3 раза) снижение общей суммы углеводов и полиолов заморожено/оттаянных сперматозоидов при использовании криопротекторной среды ЛКС-контроль по сравнению со значением нативного семени – 0,1145 мг/мл и 0,0360 мг/мл соответственно (табл. 3). При использовании криопротекторной среды ЛКС-T20, содержащей трегалозу, это изменение составило лишь 5,2%, по сравнению с нативным семенем. Было обнаружено содержание трегалозы в цитозоле заморожено/оттаянных сперматозоидов в концентрации 0,0495 мг/мл, что говорит о возможности транспортировки дисахарида через мембраны клетки, несмотря на характеристики трегалозы как непроникающего криопротекторного агента [16].

Таблица 3 – Состав углеводов и полиолов цитозоля нативных и заморожено/оттаянных сперматозоидов петухов породы род-айланд

Углеводы и полиолы цитозоля		Нативная сперма	Оттаянная сперма	
			ЛКС-контроль	ЛКС-T20
мг/мл	глицерин	0,0045	0,011	0,0095
	фруктоза	0,012	0,010	0,0275
	глюкоза	0,0005	0,001	0,0045
	маннит	0,002	0,000	0,000
	инозит	0,095	0,0135	0,0175
	трегалоза	отсутствует	отсутствует	0,0495
Σ углеводов и полиолов, мг/мл		0,1145	0,0360	0,1085
% от Σ	глицерин	3,9	30,8	8,65
	фруктоза	59,05	27,95	25,45
	глюкоза	0,55	1,9	4,3
	маннит	2,05	1,15	0,05
	инозит	83,0	38,2	16,15
	трегалоза	отсутствует	отсутствует	45,4

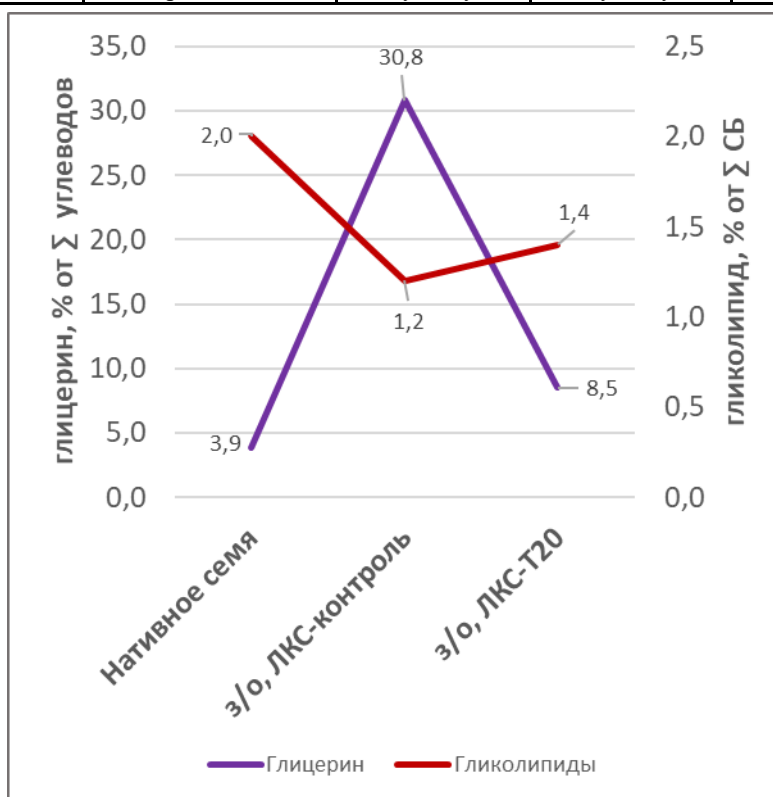


Рисунок 1 – Схема соотношения гликолипидов и глицерола сперматозоидов петухов под влиянием протокола криоконсервации семени.

Полученные в результате хроматографического анализа липидома мембран и состава цитозоля сперматозоидов данные (рис. 1) свидетельствуют о том, что состав криозащитного разбавителя оказал значимое влияние на соотношение гликолипидов и глицерина в составе клеточных структур оттаянных сперматозоидов. Вероятно, что снижение количества гликолипидов в составе плазматической мембраны сперматозоидов, при использовании среды ЛКС-контроль, является результатом их частичного разрушения, что вызвало резкое повышение в цитозоле уровня высвободившегося глицерина. Использование среды ЛКС-T20 смягчает повреждающее действие температурного стресса на клеточные структуры.

ВЫВОДЫ / CONCLUSIONS

Определено, что под влиянием протокола криоконсервации сперматозоидов петухов углеводно-полиольный состав цитозоля может быть весьма подвижен, как в части компонентного состава, и в части количественного соотношения, что приводит к изменению криорезистентности сперматозоидов петухов в различной степени, в зависимости от состава криопротекторных сред. В углеводном составе цитозоля оттаянных сперматозоидов при использовании среды ЛКС-T20 отмечено присутствие трегалозы. Этот факт впервые доказывает возможность транспорта молекул этого дисахарида через плазматическую мембрану и перспективу использования трегалозы в качестве криопротектора как экзо-, так и эндоцеллюлярного действия. Механизмом такого транспорта, вероятно, является простая диффузия молекул через аквапорины [17], поскольку трегалозе свойственна устойчивая связь с молекулами воды. Кроме того, многократное снижение содержания инозитола в составе цитозоля оттаянных сперматозоидов в 7 и 5,5 раз, в зависимости от использованного криозащитного разбавителя, говорит о присутствии множественных внутриклеточных окислительных реакций.

При изучении динамики липидного состава плазматических мембран сперма-

тозоидов петухов в цикле замораживания/оттаивания установлена роль состава криозащитной среды в поддержании стабильности липидной мембранной архитектуры. Использование новой среды, содержащей трегалозу (ЛКС-T20), обеспечивает лучшую защиту липидома плазматических мембран сперматозоидов по сравнению со средой ЛКС-контроль.

LIPID COMPOSITION OF PLASMA MEMBRANES OF ROOSTER SPERMATOOZOA (GALLUS GALLUS DOMESTICUS) AND ITS DYNAMICS UNDER THE INFLUENCE OF THE CRYOPRESERVATION PROTOCOL

Stanishevskaya O.I. – Dr. Habil (Biol. Sci.), Head of the Laboratory of Genetics, Breeding and Conservation of the Genetic Resources of Farm Birds; **Silyukova Y.L.** – Junior Researcher, Laboratory of Genetics, Breeding and Conservation of the Genetic Resources of Farm Birds.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

*olgastan@list.ru

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

ABSTRACT

The structural features of the plasma membranes of avian sperm make them more sensitive, compared to those of mammals, to low-temperature stress. The qualitative and quantitative composition of membrane lipids can become a determining factor in the development of new effective compositions of cryoprotective media. The purpose of the study was to determine the lipid composition of the plasma membranes of native rooster sperm, the content of carbohydrates and polyols in their cytosol, as well as dynamic changes in the membrane lipidome and cytosol composition under the influence of the cryopreservation protocol, depending on the composition of the cryoprotective medium. The studies were carried out on Rhode Island roosters (n=10), the total and progressive sperm motility and membrane damage

were determined. Semen freezing and thawing was carried out using fast protocols. To determine the lipid composition of the plasma membranes of sperm and the composition of their cytosol, a chromatographic analysis method was used. The following were identified in the membranes of native spermatozoa: phospholipids, glycolylipids and neutral lipids, represented by phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, sphingomyelin and sterol. A change in the ratio between membrane lipids of the inner and outer layers of the plasma membrane of rooster spermatozoa under the influence of the cryopreservation protocol was shown. In native spermatozoa this ratio was 41.2% and 39.4%, respectively, in thawed sperm when using the LCM-control medium – 38.3% и 47.2%, respectively, when using the LCM-T20 medium - 40.7% and 44.5%, respectively. There was a significant decrease, more than 3 times, in the total amount of carbohydrates (fructose, glucose, trehalose) and polyols (glycerol, mannitol, inositol) in the cytosol of frozen/thawed spermatozoa when using the cryoprotective medium LCM-control compared with the values of the native spermatozoa - 0.1145 mg/ml and 0.0360 mg/ml, respectively. When using the LCM-T20 medium, the change was insignificant and the delta was 5.2%. The effectiveness of using cryoprotective medium LCM-T20 containing trehalose has been proven to maintain the lipid membrane architecture of rooster spermatozoa, the carbohydrate-polyol composition of their cytosol and, as a consequence, the morphofunctional usefulness of gametes during the freezing/thawing process.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Vireque A.A. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm / A.A. Vireque, A. Tata, O.F. Silva, E.G. LoTurco, A. Azzolini, C.R. Ferreira, M.H. Dantas, R.A. Ferriani, R.M. Reis // *Fertility and sterility*. – 2016. – Т. 106. – №. 2. – С. 273-283.
2. Кузнецов В.И. Липиды в структуре и функционировании биологических мембран / В.И. Кузнецов, В.В. Моррисон, О.Б. Лиско, Т.Д. Царева, Д.А. Сретенская, И.Б. Гаврилова, О.А. Хлебозарова // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2014. – Т. 10. – №. 2. – С. 262-266.
3. Mandal R. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation / R. Mandal, D. Badyakar, J. Chakrabarty // *Advances in Andrology*. – 2014. – Т. 2014.
4. Stanishevskaya O. Effects of saccharides supplementation in the extender of cryopreserved rooster (*Gallus gallus domesticus*) semen on the fertility of frozen/thawed spermatozoa / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, N. Pleshanov, A. Kurochkin, E. Fedorova, Z. Fedorova, O. Perinek, A. Prituzhalova, I. Meftakh // *Animals*. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 189.
5. Королькова Т.Н., Амбарцумян Л.Л., Шепилова И.А. Роль трегалозы в продолжительности клинического эффекта биоревитализантов // *Клиническая дерматология и венерология*. – 2020. – Т. 19. – №. 2. – С. 240-248.
6. Sum A.K. Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides / A.K. Sum, R. Faller, J.J. de Pablo // *Biophysical journal*. – 2003. – Т. 85. – №. 5. – С. 2830-2844.
7. Maiti A., Daschakraborty S. Unraveling the Molecular Mechanisms of Trehalose-Mediated Protection and Stabilization of *Escherichia coli* Lipid Membrane during Desiccation // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2023. – Т. 127. – №2. – С. 4496-4507.
8. Целютин К. В., Тур Б. К. Искусственное осеменение и криоконсервация спермы сельскохозяйственной птицы (петухи, индюки, гусаки, селезни) // СПб.-Пушкин: ГНУ ВНИИГРЖ Россельхозакадемии. – 2013.
9. Stanishevskaya O.I. Effects of Trehalose Supplementation on Lipid Composition of Rooster Spermatozoa Membranes in a Freeze/Thaw Protocol / O.I. Stanishevskaya, Y. Silyukova, E. Fedorova, N. Pleshanov, A. Kurochkin, V.M. Tereshina, E. Ianutsevich // *Animals*. – 2023. – Т. 13. – №. 6. – С. 1023.
10. Pintado B. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains pro-

- pidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability / B. Pintado, J. de la Fuente, E.R. Roldan // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 2000. – Т. 118. – №. 1. – С. 145-152.
11. Feng H. L. Impact of Ca²⁺ flux inhibitors on acrosome reaction of hamster spermatozoa / H.L. Feng, Y.B. Han, A. Hershtlag, I.J. Zheng // *Journal of andrology*. – 2007. – Т. 28. – №. 4. – С. 561-564.
12. Януцевич Е. А. Мембранные липиды и углеводы цитозоля у *Aspergillus niger* в условиях осмотического, окислительного и холодового воздействий / Е.А. Януцевич, О.А. Данилова, Н.В. Гроза, В.М. Терешина // *Микробиология*. – 2016. – Т. 85. – №. 3. – С. 283-292.
13. Moore A.I. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival / Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K. // *Cryobiology*. – 2005. – Т. 51. – №. 3. – С. 241-249.
14. Hezavehei M. Membrane lipid replacement with nano-micelles in human sperm cryopreservation improves post-thaw function and acrosome protein integrity / M. Hezavehei, M. Sharafi, R. Fathi, A. Shahverdi, M.A.S. Gilani // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2021. – № 43(2). – С. 257–268.
15. Longobardi V. Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm / V. Longobardi, G. Albero, C. De Canditiis, A. Salzano, A. Natale, A. Balestrieri, G. Neglia, G. Campanile, B. Gasparrini // *Theriogenology*. – 2017. – № 89. – С. 359-364.
16. Chen T. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells / T. Chen, J. P. Acker, A. Eroglu, S. Cheley, H. Bayley, A. Fowler, M. Toner // *Cryobiology*. – 2001. – Vol. 43. – p. 168–181.
17. Delgado-Bermúdez A. Aquaporins are essential to maintain motility and membrane lipid architecture during mammalian sperm capacitation / A. Delgado-Bermúdez, S. Recuero, M. Llavanera, Y. Mateo-Otero, A. Sandu, I. Barranco, J. Ribas-Maynou, M. Yeste // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – № 9. – С. 656438.