

УДК: 636.5.

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.4.525

## КАЛЬЦИЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ В НАТИВНЫХ И ДЕКРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЗОИДАХ *GALLUS GALLUS D.*

**Кузьмина Т.И.** – д-р биол. наук, проф., глав. науч. сотрудник, зав. лабораторией биологии развития, (ORCID 0000-0002-4218-6080); **Курочкин А.А.\*** – науч. сотр. лаборатории биологии развития (ORCID 0000-0003-4430-4770); **Плешанов Н.В.** – биолог лаборатории биологии развития (ORCID 0000-0002-4634-7515); **Притужалова А.О.** – науч. сотр. лаборатории биологии развития (ORCID 0000-0002-2865-9582)

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](mailto:kurochkin.anton.66@gmail.com)

**Ключевые слова:** криоконсервация, сперма петухов, индивидуальный эякулят, внутриклеточные ионы кальция, жизнеспособность, заморожено/оттаянное семя, биомаркеры.

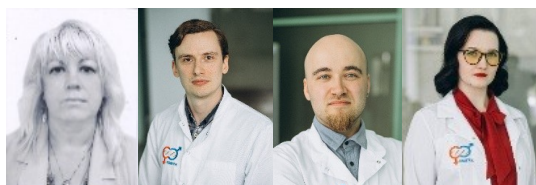
**Key words:** cryopreservation, rooster sperm, individual ejaculate, intracellular calcium ions, viability, frozen/thawed semen, biomarkers.

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке РНФ номер проекта 25-16-00131.

Поступила: 16.08.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



### РЕФЕРАТ

Современное птицеводство активно использует вспомогательные репродуктивные технологии, в частности криоконсервацию спермы, эффективность которой зависит от сохранения жизнеспособности клеток и их функциональной активности.

С целью раннего выявления производителей с высокими показателями заморожено/оттаянного семени петухов ведется поиск высокоинформативных биомаркеров, детерминирующих качество спермы. Митохондрии, являющиеся источником АТФ, играют ключевую роль в подвижности сперматозоидов и их активности, в том числе посредством трансдукции ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ). Цель исследования – идентификация эффектов сверхнизких температур на подвижность заморожено/оттаянных мужских гамет *Gallus Gallus d.*, митохондриальную активность и содержание в них цитозольного  $Ca^{2+}$ . Объектом исследования служили образцы свежеполученных эякулятов и заморожено/оттаянного семени ( $\text{♂n} = 10$ ) породы царскосельская (селекция ВНИИГРЖ) в возрасте 61–63 недель. Сперму получали методом абдоминального массажа в пенициллиновые

флаконы дважды в неделю, в течение двух недель. В ходе исследования выявлена высокая индивидуальная изменчивость в объемах нативных эякулятов особей и концентрации сперматозоидов. Высокое содержание внутриклеточного  $Ca^{2+}$  было значительно выше в сперматозоидах с интактной плазматической мембраной ( $56,48 \pm 3,37\%$ ) по сравнению с клетками с поврежденной плазматической мембраной ( $3,51 \pm 0,81\%$ ). После цикла замораживания/оттаивания популяция клеток с интактной плазматической мембраной и высоким содержанием внутриклеточного  $Ca^{2+}$  существенно снизилась и составила  $9,97 \pm 0,74\%$ . Таким образом, направленность изменения содержания внутриклеточного кальция (снижение) в размороженных сперматозоидах, в сочетании с другими представленными в настоящем исследовании индикаторами жизнеспособности и функциональной активности мужских гамет (митохондриальная активность), может рассматриваться в качестве одного из кандидатов превентивных биомаркеров криорезистентности.

### ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Сохранение генетических ресурсов домашней птицы во многом основывается на возможности сохранения жизнеспособности и функциональной активности мужских гамет в условиях сверхнизких температур. Механизмы, детерминирующие криорезистентность сперматозоидов *Gallus gallus d.*, несмотря на значительные достижения в этой области, окончательно не выяснены, а технология криоконсервации мужских гамет требует дальнейшего совершенствования. Эффективность глубокого замораживания сперматозоидов (криоконсервация в условиях сверхнизких температур) зависит от многих факторов, обеспечивающих целостность клеточных компартментов сперматозоида во время процедуры замораживания-оттаивания, а также возможности сохранения их функциональной активности. Качество нативного семени во многом определяет ее криосохранность [1]. В связи с этим, встает вопрос о поиске предиктивных биомаркеров, обеспечивающих выявление особей с высокой криотолерантностью спермы петухов.

Фертильность спермы определяется, в первую очередь, высокой подвижностью, необходимой для преодоления половых путей самки и достижения женской гаметы. Этот процесс требует энергии в форме АТФ (аденозинтрифосфат). Митохондрии являются основным источником АТФ в сперматозоидах, и любое изменение функционирования этих органелл ведет к снижению подвижности сперматозоидов [2,3]. Митохондрии имеют

внешнюю и внутреннюю мембраны, которые содержат собственные специфические ионные каналы, транспортеры и насосы, регулирующие ионный гомеостаз митохондрий, их функционирование и поддержание митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) [4]. При этом функциональная активность митохондрий в мужских гаметах имеет тесную взаимосвязь с гомеостазом кальция ( $Ca^{2+}$ ). Успешное оплодотворение невозможно без исправно функционирующей системы регуляции кальциевого гомеостаза в гаметах. Ионы кальция играют ключевую для инициации подвижности мужской гаметы, гиперактивации, капацитации, акросомной реакции и, следовательно, оплодотворения [5, 6].

Цель исследования – идентификация эффектов сверхнизких температур на подвижность заморожено/оттаянных мужских гамет *Gallus Gallus d.*, митохондриальную активность и содержание в них внутриклеточного  $Ca^{2+}$ .

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Объектом исследования служили образцы свежеполученных эякулятов и заморожено/оттаянного семени петухов (*Gallus gallus domesticus*), ( $\sigma^n = 10$ ) породы царскосельская (селекция ВНИИГРЖ) в возрасте 61–63 недель (ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур»). Сперму получали методом абдоминального массажа в пенициллиновые флаконы дважды в неделю, в течение двух недель. Криоконсервацию проводили по методике, разработанной

Л.Е. Нарубиной, А.Д. Курбатовым и др., путем прямого накапывания семени в жидкий азот. В экспериментах для криоконсервации гамет использовали разбавитель ЛКС-1 в соотношении 1:1, в качестве криопротектора применяли N, N-диметилацетамид (DMA) (Sigma (Aldrich, США) в конечной концентрации 6%. Оттаивание гранул производили на нагретой металлической пластине ( $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Для оценки общей подвижности сперматозоидов использовали программное обеспечение Аргус-САСА, (Аргуссофт, Санкт-Петербург). Концентрация сперматозоидов определялась с помощью фотометра Accuread (IMV, США). Объем эякулятов измерялся градуированной пипеткой.

Оценку показателей жизнеспособности (целостность плазматических мембран) и функциональной активности нативных и заморожено/оттаянных сперматозоидов (митохондриальная активность, содержание внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ ) проводили с использованием проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter Inc., США). Для каждого образца исследовали не менее 2000 событий при скорости потока 50 клеток/сек. Популяцию сперматозоидов отбирали с помощью бокового светорассеяния (SSC-A) и малоуглового светорассеяния (FSC-A) для исключения дробиса, посторонних клеток и конгломератов сперматозоидов. Для анализа данных, полученных на проточном цитофлуориметре, использовали программное обеспечение CytExpert, Version 2.4.0.28 (Beckman Coulter Inc., США).

Оценку мембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) в мужских гаметах определяли с помощью флуоресцентного красителя тетраметилродамина (TMRE). Данный краситель селективно накапливается в активных митохондриях благодаря трансмембранному потенциалу, который митохондрии поддерживают в нормальном состоянии. Деполяризация митохондрий вследствие запуска процессов апоптоза, некроза или других факторов, что характеризуется уменьшением мембранного потенциала и, как следствие,

уменьшением накопления красителя и его флуоресценции по сравнению с интактными клетками, имеющими поляризованные митохондрии. Таким образом, популяция клеток подразделяется на группу с низкой митохондриальной активностью (низкая интенсивность флуоресценции TMRE) и высокой митохондриальной активностью (высокая интенсивность флуоресценции TMRE).

Для этого к образцам семени с концентрацией сперматозоидов  $3 \times 10^6/\text{мл}$  добавляли раствор TMRE до конечной концентрации 1 мкМ и инкубировали в темноте 20 мин при  $t=25^{\circ}\text{C}$ , после чего дважды отмывали образцы клеток от остатков флуорохрома (1200 об./мин в течение 7 мин).

Оценку содержания внутриклеточных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в сперматозоидах определяли с помощью флуоресцентного зонда Fluo3-AM. Данный краситель метаболизируется внутриклеточными эстеразами, после чего способен связываться с  $\text{Ca}^{2+}$ , что ведет к появлению зеленого флуоресцентного сигнала, интенсивность которого зависит от содержания внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким образом, популяция клеток исследуемых образцов разделяется на субпопуляции: с высокой интенсивностью свечения Fluo3-AM (высокое содержание внутриклеточного кальция) и низкой интенсивностью свечения Fluo3-AM (низкое содержание внутриклеточного кальция). Пробоподготовку проводили, как и для флуоресцентного красителя TMRE, добавляли Fluo3-AM в конечной концентрации 2 мкМ. После отмывки красителя непосредственно перед оценкой образцов на проточном цитометре к пробам добавляли флуорохром – PI (пропидия йодид, конечная концентрация 1 мкМ), для оценки целостности цитоплазматической мембраны клеток.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2021 и Statistica 7.0. Данные в работе представлены в виде средних значений (M) и стандартных ошибок средних (SEM). Различия групп нативного и заморожено-

оттаянного семени оценивали по критерию Манна Уитни. Корреляционный анализ выполняли с использованием коэффициента Спирмена.

**РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS**

Первым этапом экспериментальной работы являлась оценка показателей качества нативной спермы петухов (n особей =10). Непосредственно после взятия спермы был оценен объем эякулятов, диапазон значений составил от 0,14±0,04 до 0,67±0,02 мл, а значение концентрации сперматозоидов в эякуляте имело диапазон от 1,802±0,299 до 4,687±0,328 млрд/мл. Стоит отметить, что при анализе дан-

ных показателей наблюдали высокую индивидуальную изменчивость (коэффициенты вариации составили 48,26% и 34,08% соответственно), тогда как у каждого отдельного производителя, от взятия к взятию эякулятов, в этих показателях была выявлена высокая повторяемость. Низкий коэффициент вариации отмечен при оценке общей подвижности сперматозоидов – 14,78%, а диапазон значений составил от 52,00±5,76 до 87,67±0,33%. Также была выявлена положительная взаимосвязь между объемом эякулята и концентрацией в нем сперматозоидов – 0,58 (p<0,01) (Таблица 1).

**Таблица 1 – Показатели качества нативных сперматозоидов петухов (n особей =10)**

№ петуха	Объем эякулята, мл	Концентрация сперматозоидов, млрд/мл	Общая подвижность, %
1	0,67±0,02	4,687±0,328	86,67±0,88
2	0,30±0,05	3,540±0,474	87,25±0,48
3	0,63±0,04	4,170±0,247	87,67±0,33
4	0,38±0,03	3,080±1,150	87,00±0,00
5	0,51±0,11	3,173±0,192	52,00±5,76
6	0,31±0,07	3,798±0,567	83,50±3,18
7	0,20	2,310	85,00
8	0,46±0,04	2,743±0,489	84,25±1,75
9	0,34±0,06	3,503±0,852	82,75±1,32
10	0,14±0,04	1,802±0,299	87,00±0,88
<b>M</b>	0,40	3,323	81,48
<b>CV</b>	48,26	34,08	14,78

Примечание: данные представлены в виде M±SEM, CV – коэффициент вариации (%)

Цитофлуориметрический анализ митохондриальной активности сперматозоидов в нативных эякулятах показал, что доля сперматозоидов с высокой митохондриальной активностью фиксировалась в диапазоне от 74,03±2,00 % до 88,58±0 % (Таблица 2). Выявлена взаимосвязь между общей подвижностью гамет и долей клеток с высокой митохондриальной активностью – 0,42 (p<0,05), что подтверждается результатами других исследований, оценивающих вовлеченность митохондрий в кинетические показатели сперматозоидов сельскохозяйственных живот-

ных [7].

Согласно результатам ряда исследований, внутриклеточные ионы Ca<sup>2+</sup> играют ключевую роль в передаче сигналов, направленных на изменение энергетического обмена, непосредственно влияющего на подвижность мужских гамет и инициацию акросомальной реакции [8], что подтверждается данными, указывающими на высокую подвижность сперматозоидов с интактной плазматической мембраной [9]. В наших исследованиях оценка содержания ионов Ca<sup>2+</sup> в сперматозоидах нативных эякулятов петухов выявила его

более высокий уровень в клетках с интактной плазматической мембраной (среднее значение показателя  $56,48 \pm 3,37\%$ ), в отличие от клеток с высоким содержанием внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и поврежденной мембраной (среднее значение показателя  $3,51 \pm 0,81\%$ ,  $p < 0,05$ ), что может указывать на участие  $Ca^{2+}$  в процессах, детерминирующих жизнеспособность и функциональную активность клеток [10,11] (Таблица 2). Следует отметить

высокие коэффициенты вариации для всех значений (доли гамет с низким и высоким уровнем содержания  $Ca^{2+}$  в интактных и поврежденных клетках), которые составили 50,94, 140,48, 110,97 и 28,62%, соответственно. Такие высокие значения, вероятно, свидетельствуют об индивидуальной чувствительности данных признаков к воздействию внешних факторов.

**Таблица 2 – Кальциевый гомеостаз в нативных сперматозоидах с интактной и поврежденной цитоплазматической мембраной (n особей =10)**

№ петуха	Fluo-3AM-/PI-, %	Fluo-3AM-/PI+, %	Fluo-3AM+ /PI+, %	Fluo-3AM+ /PI-, %	TMRE+, %
1	27,38±7,52	1,44±1,23	2,75±0,37	68,43±8,39	83,93±2,08
2	33,38±21,89	5,60±3,50	6,23±3,39	54,78±17,26	84,02±3,38
3	41,36±6,59	0,58±0,41	0,61±0,06	57,46±6,25	75,71±2,22
4	61,94	0,00	0,31	37,74	82,41±2,18
5	23,12±8,24	6,99±4,56	4,79±2,19	65,10±1,46	74,03±2,00
6	39,10±11,79	0,92±0,88	1,83±1,23	58,14±10,44	82,62±1,02
7	69,69	1,21	0,50	28,60	88,58
8	36,08±5,95	0,84±0,26	6,57±2,95	56,52±5,15	80,63±2,62
9	44,04±10,37	1,71±1,64	1,80±0,62	52,45±11,31	74,56±2,94
10	24,78±4,60	7,09±3,22	3,88±3,26	64,27±11,07	84,23±0,46
M	37,34	2,67	3,51	56,48	80,27
CV	50,94	140,48	110,97	28,62	7,00

*Примечание: данные представлены в виде M±SEM, CV – коэффициент вариации (%), Fluo-3AM-/PI-: доля гамет с низким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и интактной плазматической мембраной, Fluo-3AM-/PI+: доля гамет с низким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и поврежденной плазматической мембраной, Fluo-3AM+/PI+: доля гамет с высоким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и поврежденной плазматической мембраной, Fluo-3AM+/PI-: доля гамет с высоким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и интактной плазматической мембраной; TMRE+: доля клеток с высокой митохондриальной активностью.*

Эффекты криоконсервации на сперматозоиды, вызываются воздействием ультранизких температур, вызывая холодовой шок. При этом происходят изменения осмолярности и показатели окислительного стресса, что приводит к снижению жизнеспособности, вследствие повреждения плазматических мембран мужских гамет [12]. В нашем исследовании наблюдали изменение ряда показателей (Таблица 3). Так, доля клеток с высоким митохондриальным потенциалом значительно снизилась, составив  $47,53 \pm 1,77\%$

(в нативных сперматозоидах процент клеток с вышеуказанным показателем составил  $80,27 \pm 1,04\%$ ,  $p < 0,05$ ), что подтверждается результатами других исследователей [13] Доля клеток с высоким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  в клетках с интактной плазматической мембраной снизилась и составила в среднем  $9,97 \pm 0,74\%$ , в сравнении с образцами нативной спермы  $56,48 \pm 3,37\%$ . Была обнаружена корреляция между популяцией клеток с высоким содержанием  $Ca^{2+}$  и долей клеток с высоким митохондриальным потенциалом

( $r^2=0,40$ ,  $p<0,05$ ), что может указывать на непосредственное вовлечение ионов  $Ca^{2+}$  в регуляторные механизмы функциональной активности митохондрий в заморожено/оттаянных мужских гамет. Результаты исследований Kumaresan A. et al. объ-

ясняли пониженное содержание ионов  $Ca^{2+}$  их вытеснением вследствие нарушения целостности плазматической мембраны в сперматозоидах хряков и, как следствие, утечкой ионов  $Ca^{2+}$  [14].

**Таблица 3 – Содержание ионов  $Ca^{2+}$ , целостность плазматических мембран и митохондриальная активность заморожено/оттаянного семени (n особей=10)**

№ Пету- туха	Fluo-3AM-/ PI-, %	Fluo-3AM-/ PI+, %	Fluo-3AM+/ PI+, %	Fluo-3AM+/ PI-, %	TMRE+, %
1	52,28±2,78	33,27±5,48	2,97±0,67	11,48±2,14	51,87±4,08
2	51,67±1,47	29,29±1,30	3,25±0,09	15,79±2,15	57,33±3,37
3	54,14±2,45	36,61±2,26	2,79±0,45	6,45±1,36	40,70±4,58
4	41,94	41,89	3,90	12,28	52,73±2,55
5	43,34±3,42	43,30±2,31	4,13±0,42	9,24±2,44	36,13±2,61
6	28,86±5,56	60,34±7,90	2,60±0,40	8,19±2,30	26,65±0,69
7	60,58±2,44	27,29±1,64	2,03±0,40	10,10±1,32	62,02±1,88
8	49,18±4,33	31,95±3,63	9,72±1,75	9,16±0,78	50,59±1,59
9	43,73±9,09	41,27±9,70	6,19±1,99	8,81±2,45	43,56±0,24
10	0,00	0,00	0,00	0,00	55,03±4,15
<b>M</b>	47,79	37,84	4,41	9,97	47,53
<b>CV</b>	23,12	32,52	69,55	37,88	23,27

Примечание: данные представлены в виде  $M \pm SEM$ ,  $M$  – среднее значение всех образцов,  $CV$  – коэффициент вариации (%), Fluo-3AM-/PI-: доля гамет с низким содержанием ионов  $Ca^{2+}$ , в клетках с интактной плазматической мембраной, Fluo-3AM-/PI+: доля гамет с низким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и поврежденной плазматической мембраной, Fluo-3AM+/PI+: доля гамет с высоким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и поврежденной плазматической мембраной, Fluo-3AM+/PI-: доля гамет с высоким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  и интактной плазматической мембраной, TMRE+: доля клеток с высокой митохондриальной активностью.

#### ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Анализ содержания ионов  $Ca^{2+}$  в сперматозоидах нативных эякулятов петухов выявил его более высокий уровень в клетках с интактной плазматической мембраной ( $56,48 \pm 3,37\%$ ), в отличие от поврежденных клеток ( $3,51 \pm 0,81\%$ ,  $p<0,05$ ) После цикла замораживания/оттаивания отмечено значительное снижение доли клеток с высоким содержанием ионов  $Ca^{2+}$  в клетках с интактной плазматической мембраной (среднее значение  $9,97 \pm 0,74\%$ ), в сравнении с клетками в образцах нативной спермы (среднее значение  $56,48 \pm 3,37$ ).

В целом, анализ полученных результатов свидетельствует о том, что опреде-

ление содержания внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в сперматозоидах, в комплексе с другими, рассмотренными в нашем исследовании биомаркерами качества нативных и декриоконсервированных сперматозоидов, может рассматриваться в качестве кандидата эффективного превентивного молекулярного биомаркера для скрининга исходной популяции мужских гамет с целью их использования в технологии криоконсервации семени птиц.

#### CALCIUM HOMEOSTASIS IN NATIVE AND DECRYOPRESERVED SPERMATOOZOA OF GALLUS GAL-LUS D.

Kurochkin A.A.\* – Junior Researcher,

Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0003-4430-4770); **Kuzmina T.I.** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0002-4218-6080); **Pleshanov N.V.** – biologist Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0002-4634-7515); **Prituzhalova A.O.** – Researcher, Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0002-2865-9582)

\**kurochkin.anton.66@gmail.com*

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

**Funding:** *The work was supported by the Russian scientific foundation project No. 25-16-00131.*

#### ABSTRACT

Modern poultry farming actively use assisted reproductive technologies, particularly sperm cryopreservation, which effectiveness depends on maintaining cell integrity and functional activity. In order to early identify roosters with high frozen/thawed semen quality, a search is underway of highly informative biomarkers, determines sperm quality. Mitochondria, which produce ATP, play a key role in sperm motility and activity, including through ion transduction ( $\text{Ca}^{2+}$ ). The object of the study were samples of freshly obtained ejaculates and frozen/thawed semen ( $n = 10$ ) of the Tsarskoye Selo breed (selection of the All-Russian Research Institute of Gastroenterology and Gastroenterology) at the age of 61–63 weeks. Study revealed high interindividual variability in volume of native ejaculates and sperm composition. Proportion of cells with elevated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels was significantly higher in live sperm ( $56.48 \pm 3.37\%$ ) compared to dead cells ( $3.51 \pm 0.81\%$ ). Following a freeze/thaw cycle, population of viable cells with elevated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in male gametes decreased and formed at  $9.97 \pm 0.74\%$ . Thus, level of intracellular

$\text{Ca}^{2+}$  in spermatozoa, in combination with other currently available bioindicators of male gamete stability and functional activity (mitochondrial activity) within framework of sperm quality and cryoresistance assessment protocols, can serve as an effective preventative biomarker for cryopreservation technology.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Mohammad M. S., Mardenli O., AL-Tawash A. S. A. Evaluation of The Cryopreservation Technology of Poultry Sperm: A Review Study. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021; 735:012016. DOI 10.1088/1755-1315/735/1/012016.
2. Nowicka-Bauer K., Lepczynski A., Ozgo M., Kamieniczna M., Fraczek M., Stanski L., Olszewska M., Malcher A., Skrzypczak W., Kurpisz M.K. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. J. Physiol. Pharmacol. 2018;69 doi: 10.26402/jpp.2018.3.05.
3. Nowicka-Bauer K., Szymczak-Cendlak M. Structure and Function of Ion Channels Regulating Sperm Motility-An Overview. Int J Mol Sci. 2021;22(6):3259. doi:10.3390/ijms22063259
4. Bravo A., Treulen F., Uribe P., Boguen R., Felmer R., Villegas J.V. Effect of mitochondrial calcium uniporter blocking on human spermatozoa. Andrologia. 2015;47:662–668. doi: 10.1111/and.12314.
5. Денисенко В. Ю. Влияние ингибиторов протеинкиназ на акросомную реакцию и внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$  в сперматозоидах быков // Достижения науки и техники АПК. 2020;34(5):65–68. doi: 10.24411/0235-2451-2020-10513.
6. Okunade G. W., Miller M. L., Pyne G. J., Sutliff R. L., O'Connor K. T., Neumann J. C., Andringa A., Miller D. A., Prasad V., Doetschman T., Paul R. J., Shull G. E. Targeted ablation of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. The Journal of biological chemistry. 2004;279(32):33742

- 33750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404628200>
7. Xu Z., Yan Q., Zhang K., Lei Y., Zhou C., Ren T., Gao N., Wen F., Li X. Mitochondrial Regulation of Spermatozoa Function: Metabolism, Oxidative Stress and Therapeutic Insights. *Animals*. 2025;15:2246. <https://doi.org/10.3390/ani15152246>.
8. Sushadi P. S., Kuwabara M., Maung E. E. W., Mohamad Mohtar M. S., Sakamoto K., Selvaraj V., Asano A. Arresting calcium-regulated sperm metabolic dynamics enables prolonged fertility in poultry liquid semen storage. *Scientific reports*. 2023;13(1):21775. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48550-2>.
9. Hamad S. K., Elomda A. M., Sun Y., Li Y., Zong Y., Chen J., Abbas A. O., Stino F. K. R., Nazmi A., Mehaisen G. M. K. The In Vitro Evaluation of Rooster Semen Pellets Frozen with Dimethylacetamide. *Animals*. 2023; 11;13(10):1603. doi: 10.3390/ani13101603.
10. Garriga F., Codina-Benaiges J., Yeste M., Llavanera M. Calcium homeostasis role in preserving sperm function and metabolic activity during liquid storage of pig semen. *Theriogenology*. 2026;249; 117638. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.117638>.
11. Khaeruddin, Ciptadi G., Yusuf M., Fattah A. H., Junaedi, Syamsuryadi B., Wahjuningih, S. The Quality of Gaga Roosters Semen During Cold Storage Using a Diluent Supplemented with Sorbitol. *Tropical Animal Science Journal*. 2024;47(4):436-447. doi: 10.5398/TASJ.2024.47.4.436.
12. Authaida S., Ratchamak R., Boonkum W., Chankitisakul V. Increasing sperm production and improving cryosurvival of semen in aged Thai native roosters as affected by selenium supplementation. *Animal bio-science*. 2023;36(11), 1647–1654. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0079>.
13. Zong Y., Li Y., Sun Y., Han X., Yuan J., Ma L., Ma H., Chen J., Mitochondrial aspartate aminotransferase (GOT2) protein as a potential cryodamage biomarker in rooster spermatozoa cryopreservation. *Poultry Science*. 2025; 104(2):104690. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104690>.
14. Kumaresan A., Gonzalez R., Johannisson A., Berqvist A. S. Dynamic quantification of intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation in cryopreserved boar spermatozoa during short-time incubation with oviductal fluid. *Theriogenology*. 2014;82:1145–53. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.029.

## REFERENCES

1. Mohammad M. S., Mardenli O., AL-Tawash A. S. A. Evaluation of The Cryopreservation Technology of Poultry Sperm: A Review Study. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021: 735;012016. DOI 10.1088/1755-1315/735/1/012016.
2. Nowicka-Bauer K., Lepczynski A., Ozgo M., Kamieniczna M., Fraczek M., Stanski L., Olszewska M., Malcher A., Skrzypczak W., Kurpisz M.K. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. *J. Physiol. Pharmacol*. 2018;69 doi: 10.26402/jpp.2018.3.05.
3. Nowicka-Bauer K., Szymczak-Cendlak M. Structure and Function of Ion Channels Regulating Sperm Motility-An Overview. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3259. doi:10.3390/ijms22063259
4. Bravo A., Treulen F., Uribe P., Boguen R., Felmer R., Villegas J.V. Effect of mitochondrial calcium uniporter blocking on human spermatozoa. *Andrologia*. 2015;47:662–668. doi: 10.1111/and.12314.
5. Denisenko V. Yu. Effects of protein kinase inhibitors on the acrosome reaction and the concentration of intracellular Ca<sup>2+</sup> in bovine spermatozoa. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2020;34(5):65-8. [In russian]. doi: 10.24411/0235-2451-2020-10513.
6. Okunade G. W., Miller M. L., Pyne G. J., Sutliff R. L., O'Connor K. T., Neumann J. C., Andringa A., Miller D. A., Prasad V., Doetschman T., Paul R. J., Shull G. E. Targeted ablation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(32):33742

- 33750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404628200>
7. Xu Z., Yan Q., Zhang K., Lei Y., Zhou C., Ren T., Gao N., Wen F., Li X. Mitochondrial Regulation of Spermatozoa Function: Metabolism, Oxidative Stress and Therapeutic Insights. *Animals*. 2025;15:2246. <https://doi.org/10.3390/ani15152246>.
8. Sushadi P. S., Kuwabara M., Maung E. E. W., Mohamad Mohtar M. S., Sakamoto K., Selvaraj V., Asano A. Arresting calcium-regulated sperm metabolic dynamics enables prolonged fertility in poultry liquid semen storage. *Scientific reports*. 2023;13(1):21775. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48550-2>.
9. Hamad S. K., Elomda A. M., Sun Y., Li Y., Zong Y., Chen J., Abbas A. O., Stino F. K. R., Nazmi A., Mehaisen G. M. K. The In Vitro Evaluation of Rooster Semen Pellets Frozen with Dimethylacetamide. *Animals*. 2023; 11;13(10):1603. doi: 10.3390/ani13101603.
10. Garriga F., Codina-Benaiges J., Yeste M., Llavanera M. Calcium homeostasis role in preserving sperm function and metabolic activity during liquid storage of pig semen. *Theriogenology*. 2026;249; 117638. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.117638>.
11. Khaeruddin, Ciptadi G., Yusuf M., Fattah A. H., Junaedi, Syamsuryadi B., Wahjungsih, S. The Quality of Gaga Roosters Semen During Cold Storage Using a Diluent Supplemented with Sorbitol. *Tropical Animal Science Journal*. 2024;47(4):436-447. doi: 10.5398/TASJ.2024.47.4.436.
12. Authaida S., Ratchamak R., Boonkum W., Chankitisakul V. Increasing sperm production and improving cryosurvival of semen in aged Thai native roosters as affected by selenium supplementation. *Animal bio-science*. 2023;36(11), 1647–1654. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0079>.
13. Zong Y., Li Y., Sun Y., Han X., Yuan J., Ma L., Ma H., Chen J., Mitochondrial aspartate aminotransferase (GOT2) protein as a potential cryodamage biomarker in rooster spermatozoa cryopreservation. *Poultry Science*. 2025; 104(2):104690. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104690>.
14. Kumaresan A., Gonzalez R., Johannisson A., Berqvist A. S. Dynamic quantification of intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation in cryopreserved boar spermatozoa during short-time incubation with oviductal fluid. *Theriogenology*. 2014;82:1145–53. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.029.