

УДК: 636.5.

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2026.1.360

ВЛИЯНИЕ СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЕТУХОВ

Курочкин А.А.* – науч. сотр. лаборатории биологии развития (ORCID 0000-0003-4430-4770); Кузьмина Т.И. – д-р биол. наук, проф., глав. науч. сотрудник, зав. лабораторией биологии развития (ORCID 0000-0002-4218-6080); 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

Ключевые слова: криоустойчивость, сперма петухов, индивидуальный эякулят, митохондриальная активность, жизнеспособность, криоконсервация.

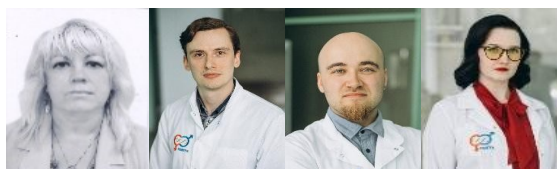
Key words: cryostability, rooster sperm, individual ejaculate, mitochondrial activity, viability, cryopreservation.

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

Поступила: 16.08.2025

Принята к публикации: 09.12.2025

Опубликована онлайн: 01.04.2026



РЕФЕРАТ

В исследовании рассматривается влияние цикла криоконсервации на показатели жизнеспособности и функциональной активности сперматозоидов в индивидуальных эякулятах петухов. Анализ экспериментов выявил, что в свежей сперме доля живых сперматозоидов составляет в среднем $77,16 \pm 1,93\%$, при этом процент клеток с высоким митохондриальным мембранным потенциалом ($\Delta\Psi_m$) остается высоким и составил в среднем значении $81,07 \pm 1,52\%$ при низком коэффициенте корреляции ($5,93\%$), что свидетельствует о высокой жизнеспособности и энергетической активности клеток. После криоконсервации наблюдается существенное снижение процента живых клеток (до $52,12 \pm 3,99\%$), а также снижение доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом (на $33,41\%$), и увеличение доли клеток с признаками некроза (на $12,37\%$). Взаимосвязь между показателями активности митохондрий и жизнеспособности указывает на важную роль митохондриального мембранного потенциала, как прогностического маркера качества заморожено/оттаянного семени. Высокая индивидуальная вариативность показателей после цикла замораживания

ния/оттаивания свидетельствует о гетерогенности популяции петухов породы царско-сельская по криоустойчивости, что важно учитывать при разработке эффективных методов криоконсервации. Результаты подчеркивают целесообразность использования показателей жизнеспособности и функциональной активности (митохондриальный мембранный потенциал) при оценке качества и прогнозировании эффективности криосохранности спермы петухов.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Криоконсервация мужских гамет сельскохозяйственных животных и птиц на сегодняшний день является одним из самых эффективных методов сохранения генетических ресурсов, а для птиц - единственным возможным способом хранения репродуктивных клеток. Несмотря на многолетние исследования, направленные на разработку, совершенствование и внедрение протоколов долговременного хранения спермы в условиях сверхнизких температур, показатели жизнеспособности, функциональной активности заморожено/оттаянного семени петухов остаются на низком уровне в сравнении с другими видами сельскохозяйственных животных, что сказывается на фертильности оттаянных сперматозоидов [1]. При этом рядом исследований отмечено, что, помимо особей с высокими показателями заморожено/оттаянного семени, выявлены производители, чья сперма имеет низкую криоустойчивость, что характеризуется снижением общей подвижности сперматозоидов вследствие нарушений морфофункциональных характеристик (митохондриальная активность) и целостности мембраны (жизнеспособность) [2,3].

На сегодняшний день существующие рутинные методы оценки, используемые при анализе свежеполученных эякулятов, не позволяют в полной мере спрогнозировать качество заморожено/оттаянного семени, а также выявить ранние признаки дефектов, которые, при отсутствии видимых внешних повреждений мужской гаметы, могут указывать на начальные стадии внутриклеточных патологий [4]. Выявление морфофункциональных характеристик жизнеспособности мужских гамет, коррелирующих с криоустойчивостью спермы, позволит совершенствовать уже имеющиеся протоколы криоконсервации,

что, в свою очередь, даст возможность улучшить показатели жизнеспособности и оплодотворяющей способности заморожено-оттаянной спермы птиц.

Цель исследования – с использованием комплексной сравнительной морфофункциональной оценки показателей жизнеспособности (целостность плазматических мембран) и митохондриальной активности нативных и заморожено/оттаянных сперматозоидов индивидуальных эякулятов петухов проанализировать деструктивные процессы в сперматозоидах, вызванные циклом криоконсервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Исследование проводилось на базе ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», ВНИИГРЖ в 2025 году. Объектом исследования служила сперма петухов (*Gallus gallus domesticus*), ($\sigma^n = 10$) породы царскосельская (селекция ВНИИГРЖ) в возрасте 61–63 недель. Сперму собирали методом абдоминального массажа (Burrows and Quinn) [5] в пенициллиновые флаконы дважды в неделю в течение двух недель. Объем эякулята составлял от 0,14 до 0,67 мл. Образцы нативной спермы с общей подвижностью сперматозоидов ниже 80% не использовали. Для криоконсервации к эякулятам добавляли разбавитель ЛКС-1 в соотношении 1:1, после чего образцы разбавленного семени эквilibрировали при $t = 5^\circ\text{C}$ в течение 40 мин. Затем в каждый образец вносили N, N-диметилацетамид (DMA) (Sigma Aldrich, США) до конечной концентрации 6%, и производили криоконсервацию в гранулах по методике, разработанной Л.Е. Нарубиной, А.Д. Курбатовым и др., путем прямого накапывания семени в жидкий азот [6, 7]. Размораживание гранул производили на нагретой металлической пластине ($t = 60^\circ\text{C}$), после чего про-

изводили анализ сперматозоидов.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью набора для определения апоптотических клеток (Annexin V-AF488 Apoptosis Detection Kit, Lumiprobe, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Данный набор позволяет разделить популяцию сперматозоидов в образце на 4 субпопуляции (живые клетки, мертвые клетки, некротические клетки, апоптотические клетки).

Долю клеток с высоким мембранным потенциалом митохондрий ($\Delta\Psi_m$) в мужских гаметех определяли с помощью флуоресцентного красителя тетраметилродамина (TMRE). Для этого к образцам семени с концентрацией сперматозоидов 3×10^6 /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 клеточных показателей нативных и заморожено/оттаянных сперматозоидов 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 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).

Для статистической обработки данных использовали программные приложения Microsoft Excel 2021 и Statistica 7.0. Данные в работе представлены в виде средних значений (M) и стандартных ошибок средних (SEM). Различия внутри групп нативного и заморожено-оттаянного семени оценивали по t-критерию Стьюдента и считали достоверными при трех уровнях значимости ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Корреляционный анализ выполняли с использованием коэффициента

Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

На первом этапе исследования была проведена оценка свежеполученных эякулятов петухов. Как видно из Таблицы 1, среднее значение доли живых клеток составило $77,16 \pm 1,93\%$. Коэффициент вариации для данного показателя составил $7,92\%$, что свидетельствует о невысокой индивидуальной изменчивости. Стоит отметить, что значения таких показателей, как доли нативных сперматозоидов в состоянии некроза и апоптоза находились на достаточно низком уровне и составили в среднем $3,94 \pm 0,97$ и $2,55 \pm 0,31\%$, соответственно. Что может указывать на отсутствие внешних повреждающих факторов, интрацитоплазматических нарушений и подтверждается высокими значениями доли клеток с показателем мембранного потенциала митохондрий в мужских гаметех, среднее значение которых составило $81,07 \pm 1,52\%$ при коэффициенте вариации $5,93\%$. В целом полученные результаты согласуются с работами других авторов, которые также отмечают гомогенность показателей нативной спермы [8].

Однако, несмотря на высокие показатели жизнеспособности, митохондриальной активности и низкую вариативность показателей в индивидуальных эякулятах нативной спермы, после криоконсервации были выявлены существенные индивидуальные различия (Таблица 2).

Так, среднее значение доли живых клеток в образцах заморожено/оттаянного семени составило $52,12 \pm 3,99$, что на $25,04\%$ ниже, чем в нативной популяции ($p < 0,001$). При этом, коэффициент вариации вышеуказанного показателя показал существенный рост ($24,26\%$) и диапазон значений составлял от $35,90$ до $70,88\%$, что говорит о присутствии в исследуемой популяции особей, чья сперма имеет высокую и низкую переживаемость цикла криоконсервации [9, 10]. Митохондриальная активность мужских гамет играет важную роль в регуляции кинетических параметров, отвечая за выработку энергии, необходимой для биения жгутиков.

Движение сперматозоидов позволяет пересечь женские половые пути и достичь места оплодотворения [11, 12, 13]. После цикла криоконсервации наблюдалось снижение доли клеток с высоким мембранным потенциалом митохондрий – среднее значение составило $47,66 \pm 3,41\%$, что на $33,41\%$ ниже, чем в нативной популяции клеток ($p < 0,001$). При оценке данного показателя в заморожено/

оттаянном семени было выявлено существенное изменение вариативности в сравнении с нативными клетками ($22,62\%$ против $5,93\%$), диапазон значений находился в пределах от $26,65\%$ до $62,02\%$, что также подтверждает наличие петухов с низкой и высокой криоустойчивостью спермы. Подобная тенденция наблюдается у всех видов сельскохозяйственных животных (14,15,16).

Таблица 1 – Показатели жизнеспособности нативной спермы петухов

№	Живые клетки, %	Мертвые клетки, %	Некротические клетки, %	Апоптотические клетки, %	Клетки с высоким $\Delta\Psi_m$, %
1	$79,54 \pm 3,93$	$15,54 \pm 6,17$	$2,65 \pm 1,44$	$2,27 \pm 1,09$	$83,93 \pm 2,08$
2	$80,11 \pm 5,48$	$16,31 \pm 5,53$	$2,00 \pm 0,27$	$1,58 \pm 0,79$	$84,02 \pm 3,38$
3	$78,58 \pm 3,38$	$16,11 \pm 3,88$	$2,55 \pm 0,46$	$2,75 \pm 0,51$	$75,71 \pm 2,22$
4	$77,76 \pm 1,14$	$15,89 \pm 0,55$	$3,56 \pm 0,74$	$2,80 \pm 0,94$	$82,41 \pm 2,18$
5	$60,62 \pm 4,35$	$22,52 \pm 2,38$	$12,38 \pm 3,46$	$4,60 \pm 1,05$	$74,03 \pm 2,00$
6	$77,23 \pm 1,06$	$14,98 \pm 2,67$	$4,14 \pm 1,07$	$3,65 \pm 2,18$	$82,62 \pm 1,02$
7	$81,55 \pm 0$	$14,29 \pm 0$	$1,87 \pm 0$	$2,29 \pm 0$	$88,58 \pm 0$
8	$80,08 \pm 2,97$	$14,09 \pm 2,77$	$3,75 \pm 0,64$	$2,09 \pm 0,59$	$80,63 \pm 2,62$
9	$75,23 \pm 3,80$	$18,66 \pm 3,18$	$3,88 \pm 0,59$	$2,24 \pm 0,69$	$74,56 \pm 2,94$
10	$80,95 \pm 2,37$	$15,17 \pm 1,13$	$2,62 \pm 1,27$	$1,26 \pm 0,59$	$84,23 \pm 0,46$
M, %	$77,16 \pm 1,93$	$16,36 \pm 0,80$	$3,94 \pm 0,97$	$2,55 \pm 0,31$	$81,07 \pm 1,52$
CV, %	7,92	15,38	77,93	38,23	5,93

Примечание: $\Delta\Psi_m$ – мембранный потенциал митохондрий.

Воздействие сверхнизких температур вызвало существенное увеличение долей клеток с признаками некроза в сравнении с популяцией клеток нативного эякулята на $12,37\%$ ($p < 0,001$). Причинами подобных изменений могут быть нарушение целостности цитоплазматических мембран сперматозоидов, вызванные механическими факторами, а также осмотический и тепловой шок в процессе оттаивания [17]. Цитоплазматическая мембрана птиц имеет повышенное содержание полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах в сравнении со сперматозои-

дами других видов сельскохозяйственных животных, что делает половые клетки петухов более восприимчивыми к оксидативному стрессу, инициирующему апоптотический процесс [18]. Однако, в нашем исследовании анализ апоптотических изменений в клетках не выявил достоверных различий после цикла криоконсервации – средняя доля клеток находилась на уровне $3,26 \pm 1,03\%$, что может указывать на иные механизмы, детерминирующие снижение жизнеспособности сперматозоидов.

Митохондрии играют центральную

роль в функционировании сперматозоидов, генерируя АТФ посредством окислительного фосфорилирования (ОХРНОС), регулируя окислительно-восстановительный баланс и инициируя процесс внутреннего апоптотического пути посредством изменения мембранного потенциала [19]. В исследовании отмечено наличие высоких коэффициентов корреляции между значением доли клеток с высоким митохондриальным потенциалом и процентом жизнеспособных сперматозоидов (0,84, $p < 0,01$).

В результате сравнительной оценки исследуемых показателей в нативной и заморожено/оттаянной сперме были выявлены следующие корреляционные взаимосвязи (Таблица 3).

Значение доли живых клеток нативной спермы находится в прямой взаимосвязи со значением долей мужских гамет с показателем высокого мембранного потенциала митохондрий заморожено/оттаянного семени (0,46, $p < 0,05$). При этом, значение доли клеток с высоким мембранным потенциалом митохондрий в нативных мужских гаметах напрямую коррелирует с показателем живых сперматозоидов (0,55, $p < 0,01$), значением доли клеток с высоким мембранным потенциалом митохондрий (0,44, $p < 0,05$), а также находится в обратной корреляции со значением доли мертвых клеток (-0,6, $p < 0,01$) после цикла криоконсервации.

Таблица 2 – Показатели жизнеспособности заморожено/оттаянной спермы петухов.

№	Живые клетки, %	Мертвые клетки, %	Некротические клетки, %	Апоптотические клетки, %	Клетки с высоким $\Delta\Psi_m$, %
1	65,79±6,10	18,22±2,97	14,45±2,91	1,54±0,48	51,87±4,08
2	66,56±5,83	16,47±2,90	12,35±1,17	4,63±2,26	57,33±3,37
3	41,07±4,32	53,79±5,28	4,26±0,72	0,88±0,34	40,70±4,58
4	56,35±1,82	21,26±7,13	16,46±2,88	5,94±2,44	52,73±2,55
5	36,97±5,24	31,30±5,89	29,26±3,40	2,48±0,71	36,13±2,61
6	35,90±7,44	44,31±0,70	18,50±6,76	1,19±0,17	26,65±0,69
7	70,88±1,36	16,47±2,29	9,22±1,62	3,43±0,18	62,02±1,88
8	50,14±1,31	25,06±2,74	17,11±1,21	7,69±2,66	50,59±1,59
9	44,73±3,14	40,95±5,35	12,57±2,30	1,75±0,68	43,56±0,24
10	52,87±3,70	15,21±2,81	28,91±3,79	3,02±0,56	55,03±4,15
M, %	52,12±3,99	28,30±4,33	16,31±2,50	3,26±1,03	47,66±3,41
CV, %	24,26	48,39	48,39	68,36	22,62

Примечание: $\Delta\Psi_m$ – мембранный потенциал митохондрий.

Таблица 3 – Корреляционные взаимосвязи показателей жизнеспособности и функциональной активности сперматозоидов до и после цикла замораживания/

		Нативная сперма		
		Живые клетки	Высокий митохондриальный потенциал	Мертвые клетки
З / О с е м я	Живые клетки	0,46*	0,55**	-0,42*
	Высокий митохондриальный потенциал	0,46*	0,44*	-0,32
	Мертвые клетки	-0,22	-0,6**	0,23

Примечание З/О – заморожено-оттаянная сперма. * - достоверное значение при $p < 0,05$; ** - достоверное значение при $p < 0,01$.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Установленные достоверные корреляционные связи между проанализируемыми показателями жизнеспособности и функциональной активности свежеполученного и заморожено/оттаянного семени (в том числе мембранного потенциала митохондрий) указывают на необходимость их углубленного изучения, как перспективных биомаркеров криорезистентности мужских гамет для разработки предиктивной оценки качества декриоконсервированных сперматозоидов и выявления на ранних этапах особей с высокой криоустойчивостью спермы.

EFFECT OF ULTRA-LOW TEMPERATURES ON VIABILITY AND MORPHOFUNCTIONAL ACTIVITY OF ROOSTER SPERMATOZOEA

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).

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

*kurochkin.anton.66@gmail.com

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

ABSTRACT

Study examines impact of cryopreservation cycle on sperm viability and individual functional activity in rooster ejaculates. Analysis revealed that proportion of live cells in fresh semen was at level $77.16 \pm 1.93\%$, while the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) remained high, was at level $81.07 \pm 1.52\%$ with a low correlation coefficient (5.93%), indicating good cell viability and energetic activity. After cryopreservation process was observed a significant decreasing in percentage of live cells (to $52.12 \pm 3.99\%$), an increasing in proportion of necrotic cells (by 12.37%), and a decrease in high $\Delta\Psi_m$ by almost 33.41%, and an increase in the proportion of cells with signs of necrosis (by 12.37%) are observed. The relationship between mitochondrial activity and viability indicates the important role of mitochondrial membrane potential as a prognos-

tic marker of frozen/thawed semen quality. High individual variability in these parameters after a freeze/thaw cycle indicates heterogeneity in cryopreservation within the thar-skoselskaya rooster population, which is important to consider when developing effective cryopreservation methods. The results highlight the usefulness of using viability and functional activity indicators (mitochondrial membrane potential) in assessing the quality and predicting the effectiveness of rooster sperm cryopreservation.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Arif A., Zahoor N., Tang J., Tang M., Dong L., Khan S. Z., Dai G. Cryopreservation Strategies for Poultry Semen: A Comprehensive Review of Techniques and Applications. *Veterinary Sciences*. 2025; 12 (2):145. <https://doi.org/10.3390/vetsci12020145>.
2. Siudzińska A., Łukaszewicz E. The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. *Anim Sci Papers Rep*. 2008;26 (4):331–40.
3. Makhafola M. B., Lehloenyha K. C., Mphaphathi M. L., Dinnyes A., Nedambale T. L. The effect of breed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. *South African Journal of Animal Science*. 2009;39(Supplement 1):242–5. DOI: 10.4314/sajas.v39i1.61225.
4. Максимова М. А., Корочкина Е. А. Криорезистентность спермы разных видов животных (обзор). *Генетика и разведение животных*. 2023;(4):127-134. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2023-4-127-134>.
5. Burrows W. H. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey / W. H. Burrows, J. P. Quinn // *Poultry Science*. – 1937. – т. 16. – P. 19-24
6. Курбатов А. Д., Нарубина Л. Е., Бубляева Г. Б., Москаленко Л. И., Целютин К. В. Среда для низкотемпературной консервации спермы птиц. АС № 1130339, СССР, 1984.
7. Нарубина Л. Е., Курбатов А. Д., Бубляева Г. Б., Целютин К. В. Способ криоконсервации спермы петухов в виде гранул. АС № 1343587, СССР, 1987.
8. Mohan J., Singh R. P., Sastry K. V., Moudgal R. P., Biswas A., Shit N. Influence of chicken native breeds on some physical and biochemical characteristics and short-term storage of semen. *Br Poult Sci*. 2011;52 (3):395-400. doi: 10.1080/00071668.2011.585145.
9. Madeddu M., Zaniboni L., Marelli S. P., Tognoli C., Belcredito S., Iaffaldano N., Di Iorio M., Cerolini S. Selection of Male Donors in Local Chicken Breeds to Implement the Italian Semen Cryobank: Variability in Semen Quality, Freezability and Fertility. *Vet Sci*. 2024 Mar 27;11(4):148. doi: 10.3390/vetsci11040148.
10. Blesbois E., Seigneurin F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard J., Gourichon D. et al. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. *Poult Sci*. 2007;86(3):555–64. <https://doi.org/10.1093/ps/86.3.555>.
11. Gualtieri R., Kalthur G., Barbato V., Di Nardo M., Adiga S. K., Talevi R. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. *Antioxidants* 2021, 10, 337. <https://doi.org/10.3390/antiox10030337>.
12. Masoudi R., Asadzadeh N., Sharafi M. Effects of freezing extender supplementation with mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on frozen-thawed rooster semen quality and reproductive performance. *Anim Reprod Sci*. 2021;225:106671. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106671.
13. Tiwari S., Dewry R. K., Srivastava R., Nath S., Mohanty T. K. Targeted antioxidant delivery modulates mitochondrial functions, ameliorates oxidative stress and preserve sperm quality during cryopreservation. *Theriogenology*. 2022;179:22-31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.11.013.
14. Duračka, M.; Benko, F.; Tvrdá, E. Molecular Markers: A New Paradigm in the Prediction of Sperm Freezability. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24:3379. <https://doi.org/10.3390/ijms24043379>.
15. Jiménez-Rabadán, P.; Soler, A.J.; Ramón, M.; García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Iniesta-Cuerda, M.; Fernández-

- Santos, M.R.; Montoro, V.; Pérez-Guzmán, M.D.; Garde, J.J. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;167:103–108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013>
16. Ezzati, M.; Shanehbandi, D.; Hamdi, K.; Rahbar, S.; Pashaiasl, M. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell Tissue Bank.* 2020;21(1):1–15. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09797-0>.
17. Öztürk A. E., Bucak M. N., Bodu M., Başpınar N., Çelik İ., Shu Z., Keskin N., Gao D. Cryobiology and Cryopreservation of Sperm. In: *Cryopreservation - Current Advances and Evaluations.* IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.89789.
18. Плешанов Н.В., Курочкин А.А., Накидкина А.Н. Связь уровня активных форм кислорода в нативных сперматозоидах петухов с качественными показателями спермы до и после замораживания-оттаивания. *Генетика и разведение животных.* 2022;(3):105-110. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2022-3-105-110>.
19. 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 (Basel).* 2025;15(15):2246. doi:10.3390/ani15152246).
- REFERENCES**
1. Arif A., Zahoor N., Tang J., Tang M., Dong L., Khan S. Z., Dai G. Cryopreservation Strategies for Poultry Semen: A Comprehensive Review of Techniques and Applications. *Veterinary Sciences.* 2025; 12(2):145. <https://doi.org/10.3390/vetsci12020145>.
2. Siudzińska A., Łukaszewicz E. The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. *Anim Sci Papers Rep.* 2008;26(4):331–40.
3. Makhafola M. B., Lehloenyha K. C., Mphaphathi M. L., Dinnyes A., Nedambale T. L. The effect of breed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. *South African Journal of Animal Science.* 2009;39(Supplement 1):242–5. DOI: 10.4314/sajas.v39i1.61225.
4. Maksimova M., Korochkina E. Sperm cryoresistance of different animal species. *Genetics and breeding of animals.* 2023; (4):127-134. (In Russ.) <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2023-4-127-134>.
5. Burrows W. H. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey / W. H. Burrows, J. P. Quinn // *Poultry Science.* – 1937. – т. 16. – P. 19-24
6. Kurbatov A. D., Narbina L. E., Bubbeyeva G. B., Moskalenko L.I., Tselyutin K.V. Wednesday for low-temperature preservation of bird sperm. AS No. 1130339, USSR, 1984.
7. Narbina L.E., Kurbatov A. D., Bubbeyeva G. B., Tselyutin K.V. Method of cryoconservation of sperm of roosters in the form of granules. AS No. 1343587, USSR, 1987.
8. Mohan J., Singh R. P., Sastry K. V., Moudgal R. P., Biswas A., Shit N. Influence of chicken native breeds on some physical and biochemical characteristics and short-term storage of semen. *Br Poult Sci.* 2011;52(3):395-400. doi:10.1080/00071668.2011.585145.
9. Madeddu M., Zaniboni L., Marelli S. P., Tognoli C., Belcredito S., Iaffaldano N., Di Iorio M., Cerolini S. Selection of Male Donors in Local Chicken Breeds to Implement the Italian Semen Cryobank: Variability in Semen Quality, Freezability and Fertility. *Vet Sci.* 2024 Mar 27;11(4):148. doi:10.3390/vetsci11040148.
10. Blesbois E., Seigneurin F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard J., Gourichon D. et al. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. *Poult Sci.* 2007;86(3):555–64. <https://doi.org/10.1093/ps/86.3.555>.
11. Gualtieri R., Kalthur G., Barbato V., Di Nardo M., Adiga S. K., Talevi R. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. *Antioxidants* 2021, 10, 337. <https://doi.org/10.3390/antiox10030337>.

- doi.org/10.3390/antiox10030337.
12. Masoudi R., Asadzadeh N., Sharafi M. Effects of freezing extender supplementation with mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on frozen-thawed rooster semen quality and reproductive performance. *Anim Reprod Sci.* 2021;225:106671. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106671.
13. Tiwari S., Dewry R. K., Srivastava R., Nath S., Mohanty T. K. Targeted antioxidant delivery modulates mitochondrial functions, ameliorates oxidative stress and preserve sperm quality during cryopreservation. *Theriogenology.* 2022;179:22-31. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.11.013.
14. Duračka, M.; Benko, F.; Tvrdá, E. Molecular Markers: A New Paradigm in the Prediction of Sperm Freezability. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:3379. <https://doi.org/10.3390/ijms24043379>.
15. Jiménez-Rabadán, P.; Soler, A.J.; Ramón, M.; García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Iniesta-Cuerda, M.; Fernández-Santos, M.R.; Montoro, V.; Pérez-Guzmán, M.D.; Garde, J.J. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;167:103–108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013>
16. Ezzati, M.; Shanehbandi, D.; Hamdi, K.; Rahbar, S.; Pashaiasl, M. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell Tissue Bank.* 2020;21(1):1–15. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09797-0>.
17. Öztürk A. E., Bucak M. N., Bodu M., Başpınar N., Çelik İ., Shu Z., Keskin N., Gao D. Cryobiology and Cryopreservation of Sperm. In: *Cryopreservation - Current Advances and Evaluations.* IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.89789.
18. Pleshanov N., Kurochkin A., Nakidkina A. Relationship between the level of reactive oxygen species in native rooster spermatozoa and the quality indicators of fresh and frozen-thawed sperm. *Genetics and breeding of animals.* 2022;(3):105-110. (In Russ.) <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2022-3-105-110>
19. 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 (Basel).* 2025;15(15):2246. doi:10.3390/ani15152246).