

ИЗМЕНЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЕТУХОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ*

Ю. Л. Силукова, Е. С. Федорова, кандидат биологических наук,
О. И. Станишевская, доктор биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста
196625, Санкт-Петербург, Тярлево, Московское ш., 55а
E-mail: svadim33@mail.ru

Проблема снижения фертильности семени петухов в цикле «нативная сперма–разбавление–кратковременное и длительное хранение (криоконсервация)» остро актуальна. Цель исследования – определить влияние различных способов подготовки (центрифугирование или фильтрация) семени петухов на его качественные характеристики с учетом способа снижения числа микробных тел, а также оценить изменение состава цитозоля сперматозоидов нативной спермы под влиянием разбавления и при кратковременном хранении. Использовали семя петухов (n=22) русской белой породы. Сперму делили на 3 части (образца): I разводили синтетической криозащитной средой ЛКС в соотношении 1:1, II фильтровали разведенное средой семя (диаметр пор мембраны 0,2 мкм), III центрифугировали (при 3000 об/мин в течение 10 мин). Оценивали нативную и заморожено/оттаянную сперму по показателям поврежденности мембран, хроматина и акросом сперматозоидов. Определяли состав углеводов и полиолов сперматозоидов нативной спермы под влиянием разбавления и после хранения (3 ч). Отмечено преимущество фильтрации, как способа технологической подготовки семени, по сравнению с центрифугированием, по показателю прогрессивной (прямолинейно-поступательное движение) подвижности сперматозоидов (41,0 % против 27,0 %) и поврежденности хроматина (43,4 % против 66,4 %). Аналогичное преимущество отмечено у заморожено/оттаянного семени, профильтрованного перед замораживанием, по показателю прогрессивной подвижности (25,5 % против 5,5 %) и поврежденности хроматина (16,5 % против 33,6 %). Фильтрация семени, как способ технологической обработки семени петухов, может быть эффективным дополнительным этапом его подготовки для искусственного осеменения и/или краткосрочного хранения. Основной компонент в составе цитозоля нативных сперматозоидов при оценке содержания углеводов и полиолов – инозитол (73,7 % от суммы углеводов и полиолов). Технологические факторы хранения семени петухов в различных режимах (кратковременное при температуре 5 °С и длительное при температуре –196 °С) оказывают значительное влияние на соотношение компонентов цитозоля сперматозоидов (углеводов и полиолов). Значительное (в 2,5 раза) снижение относительного содержания инозитола в составе цитозоля заморожено/оттаянных сперматозоидов, по сравнению с показателями нативного семени, позволяет рекомендовать введение этого антиоксиданта в состав криозащитных сред для семени петухов.

CHANGES IN KINETIC PARAMETERS AND CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ROOSTER SPERMATOZOA UNDER THE INFLUENCE OF TECHNOLOGICAL FACTORS

Yu. L. Silyukova, E. S. Fedorova, O. I. Stanishevskaya

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding –
Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry,
196625, Sankt-Peterburg, Tyarlevo, Moskovskoe sh., 55a
E-mail: svadim33@mail.ru

The problems of fertility reducing of rooster semen in the cycle «native sperm-equilibration-short-term and long-term storage (cryopreservation)» are urgent. The purpose of this study was to determine the effect of different methods of preparation (centrifugation or filtration) of rooster semen on its quality characteristics, depending on the method of removing possible pollutions; to evaluate the change in the composition of the cytosol of spermatozoa of native sperm under the influence of dilution and during short-term storage. Materials and methods. Semen of roosters (n=22) of the Russian white breed was used. Experiment 1: semen was divided into 3 aliquots: I – diluted with synthetic cryoprotective medium LCM in a ratio of 1:1, II – filtered semen diluted with medium (membrane pore diameter 0.2 μm), III – centrifuged (at 3000 rpm in for 10 minutes). Native and frozen/thawed sperm were evaluated in terms of damage to spermatozoa membranes, chromatin, and acrosomes. The composition of carbohydrates and polyols of native spermatozoa was assessed under the influence of dilution and after storage (3 h). The advantage of filtration as a method of technological preparation of semen compared to centrifugation in terms of progressive motility (with rectilinear-translational movement) of sperm (41.0 % versus 27.0 %) and chromatin damage (43.4 % versus 66.4 %) has been shown. The same advantage was observed in frozen/thawed sperm filtered before freezing in terms of progressive motility (25.5 % vs. 5.5 %) and chromatin damage – 16.5 % vs. 33.6 %, respectively. Semen filtration, as a method of technological processing of rooster semen, can be an effective additional step in the preparation of semen for artificial insemination and/or short-term storage. The main component in the composition of the cytosol of native spermatozoa, according to the content of carbohydrates and polyols, was inositol – 73.7 % of Σ carbohydrates and polyols. The level of inositol decreased during storage by 6.5 times (from 0.030 mg/ml to 0.007 mg/ml). The data obtained let us suppose the role of inositol as the main antioxidant in the cytosol of spermatozoa. Technological factors of storing rooster semen in various modes (short-term at a temperature of 5°C and long-term at a temperature of –196°C) have a significant impact on the ratio of sperm cytosol components (carbohydrates and polyols). A significant, 2.5-fold decrease in the relative content of inositol in the cytosol of frozen/thawed spermatozoa, compared with the indicators of native semen, allows us to recommend the introduction of the antioxidant inositol into the composition of cryoprotective media for rooster semen.

Ключевые слова: сперма, хранение семени, петухи, фильтрация, цитозоль, инозитол, синтетические разбавители.

Key words: sperm, semen storage, roosters, filtration, cytosol, inositol, synthetic diluents.

* работа осуществлена в рамках темы Государственного задания Минобрнауки России № 121052600357–8 «Изучение биологических механизмов формирования продуктивных и адаптационных признаков домашних кур (Gallus gallus domesticus) с использованием физиолого-биохимических, цитологических, генетических и вирусологических методов исследований с целью создания новых селекционных форм».

Современные методы оценки качества семени предполагают определение следующих параметров: объем эякулята (мл); концентрация сперматозоидов (млрд/мл); общая подвижность (ОП) и прогрессивная подвижность (ПП) сперматозоидов (%) с использованием системы CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis); жизнеспособность (целостность мембран), целостность хроматина, морфологическая полноценность, целостность акросом с использованием микроскопических методов. Могут быть проведены и более глубокие исследования семени по таким показателям, как митохондриальный потенциал репродуктивной клетки, концентрация активных форм кислорода (АФК), степень перекисного окисления липидов (ПОЛ), общая антиоксидантная емкость (ОАК) и ферментативная активность супероксиддисмутазы (СОД) [1].

В практическом, рутинном процессе искусственного осеменения наиболее применимыми оценочными характеристиками по-прежнему остаются объем эякулята, концентрация сперматозоидов, доля сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением и их морфологическая полноценность [2, 3]. При оценке качества заморожено/оттаянного семени наиболее значимы такие критерии, как прогрессивная подвижность сперматозоидов, жизнеспособность (поврежденность мембран клеток), степень фрагментации хроматина и целостность акросом [4, 5].

В связи с особенностями строения полового аппарата петухов необходимо уделять большое внимание микробиологическим показателям получаемого эякулята, поскольку существует вероятность его загрязнения следами мочи и/или помета, а также соматическими клетками (эритроцитами, лимфоцитами, эпителиальными, микробными и другими). Загрязненная сперма имеет, как правило, более низкую оплодотворяющую способность, кроме того, это сопряжено высоким риском распространения инфекции в области половых путей, поскольку загрязненная/зараженная сперма попадает непосредственно в яйцевод курицы. Негативное влияние загрязнения семени петухов выражается в снижении подвижности сперматозоидов, увеличении числа и объемов их агрегированных конгломератов, нарушении целостности мембран клеток и ДНК из-за усиления степени перекисного окисления липидов и высокого уровня АФК (активных форм кислорода) [5, 6]. В условиях производственного процесса такие риски недопустимы.

Возможный способ снижения степени микробиологического загрязнения в семени – центрифугирование, то есть полное удаление загрязненной семенной плазмы с последующей заменой ее на полноценную по составу синтетическую среду. Кроме того, возможно санирование семени петухов с использованием противомикробных препаратов, что в большинстве случаев приводит к снижению оплодотворяющей способности сперматозоидов и повышению резистентности микрофлоры к используемым противомикробным препаратам [6].

В опубликованных материалах исследователи расходятся во мнении о значимости семенной плазмы как для искусственного осеменения, так и для протокола криоконсервации семени петухов. Семенная плазма – ключевая биологическая жидкость, которая модулирует функцию сперматозоидов у всех видов животных, но ее роль в хранении спермы птиц *in vitro* остается до конца не изученной, поскольку обнаружено как положительное, так и отрицательное влияние на результативность искусственного осеменения [6]. Поскольку для семени петухов свойственны активные аэробные процессы при ее транспорте от самца к половым путям самки, семенная плазма имеет ряд природных защитных

механизмов, способных нейтрализовать избыточное образование АФК [7]. Исследования состава семенной плазмы петухов выявили наличие специфических белков – овотрансферрина и галлинацина-9, которые несут антибактериальную функцию [8, 9].

В состав семенной плазмы в качестве энергетических и пластических компонентов входят углеводы и полиолы. Установлено, что нарушение фертильности сперматозоидов петухов может быть связано с изменением содержания углеводных компонентов [5], роль которых в поддержании фертильности при краткосрочном и долговременном хранении хорошо исследована [10, 11, 12]. Однако, кроме знания состава семенной плазмы, необходимо понимание изменений в составе цитозоля сперматозоидов под влиянием таких технологических факторов, как разбавление семенной плазмы или ее полное замещение после центрифугирования, которые до сих пор изучены недостаточно.

Цель исследования – определить влияние различных способов подготовки (центрифугирование или фильтрация) и сроков хранения семени петухов на его качественные характеристики.

Методика. Проведение исследований было согласовано и утверждено этической комиссией ВНИИГРЖ (протокол № 11/2023 от 07.02.2023) в соответствии с принятыми принципами биоэтики ст. 5 часть 2 European Convention for the Protection of Vertebrate Animals for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 123 1986).

Работу проводили на петухах породы русская белая яичного направления продуктивности ($n=22$), 60...64 недели жизни биоресурсной коллекций «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста. Режим содержания и кормления соответствовал принятой в коллекционарию технологии. Нативное семя оценивали по следующим показателям: объем (мл), концентрация (млрд/мл), общая подвижность (%) в соответствии с ГОСТ 27267-2017 [2]. Анализ общей и прогрессивной (клетки с прямолинейно-поступательным движением) подвижности сперматозоидов проводили с использованием визуализирующей системы CASA (АргусСофт, Россия). Для проведения экспериментов были отобраны петухи со следующими показателями качества семени: общая подвижность сперматозоидов в сперме – не менее 60,0 % (CV 12,1 %), поврежденность мембран – не более 30,0 % (CV 23,2 %). В среднем в нативном семени петухов породы русская белая ($n=22$) общая подвижность (ОП) сперматозоидов составляла $84,3 \pm 2,2$ %; прогрессивная подвижность (ПП) – $66,5 \pm 2,5$ %; поврежденность мембран – $27,1 \pm 5,6$ %; поврежденность хроматина – $18,9 \pm 1,0$ %.

Для более полного понимания процессов, происходящих в сперматозоидах на субклеточном уровне под влиянием ряда технологических воздействий, был изучен состав цитозоля клеток. Ввиду отсутствия значимых различий по поврежденности плазматических мембран сперматозоидов нативного семени, установленных на первом этапе исследований, между вариантами, состав цитозоля сперматозоидов оценивали для нативного семени, разбавленного семени после хранения в течение 3 ч и заморожено/оттаянного семени.

Индивидуальные эякуляты объединяли и разделяли на 3 части (аликвоты) для последующих операций: хранение в течение 3 ч (обычная продолжительность использования семени в производственном процессе искус-

Показатели качества семени в зависимости от способа технологической подготовки

Показатель	Нативное семя после хранения в течение 3 ч при температуре 5 °С			Заморожено/оттаянное семя		
	I (разбавление)	II (фильтрация)	III (центрифугирование)	I (разбавление)	II (фильтрация)	III (центрифугирование)
Подвижность, %:						
общая	80,0±1,5 ^c	79,8±0,6 ^c	69,5±0,8 ^d	44,7±5,2 ^{ab}	52,2±2,3 ^a	30,4±3,6 ^b
прогрессивная	39,2±1,5 ^c	41,0±1,6 ^c	27,0±1,2 ^d	21,4±0,9 ^a	25,5±2,5 ^a	5,5±0,4 ^b
Поврежденность, %:						
мембран	34,8±0,1	41,4±0,1	40,8±0,0	73,2±0,4 ^a	59,9±1,7 ^b	66,6±2,6 ^b
хроматина	69,1±4,1 ^c	43,4±0,8 ^d	66,4±2,9 ^c	9,6±6,3 ^a	16,5±7,5 ^a	33,6±2,1 ^b
акросом	1,5±0,3	3,7±0,5	1,9±0,3	31,8±1,1 ^a	31,3±3,1 ^a	43,1±2,0 ^b

^{c,d} различия между показателями, обозначенными разными буквами, достоверны при $p < 0,01$, ^{a,b} — при $p < 0,001$.

ственного осеменения кур) и замораживание. Аликвота I – семя, разбавленное в соотношении 1:1 криопротекторной средой ЛКС (ленинградская криозащитная среда) [13, 14], аликовта II – семя, профильтрованное и разбавленное средой ЛКС (при фильтрации использовали многообразные фильтрующие мембранные насадки с диаметром пор 0,2 мкм, SWINNEX® (China), размер которых был подобран с учетом размеров сперматозоидов петухов и непатогенных микробных тел, присутствующих в семени). При подготовке аликовты III семя центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин, объем удаленной семенной плазмы измеряли градуированной пипеткой, доводили разбавителем ЛКС до первоначального, после чего семя разбавляли в соотношении 1:1 криопротекторной средой ЛКС. Все этапы эксперимента выполняли в 3 повторностях. Семя замораживали, хранили в течение 10...15 дней и оттаивали по протоколу, разработанному для гранул [15]. Образцы для хроматографической оценки готовили по протоколу, изложенному Stanishevskaya, et al. (2021) [11]. Хроматографический анализ углеводов и полиолов цитозоля сперматозоидов проводили по адаптированной методике [16], содержание каждого из этих компонентов определяли в процентах от сухой биомассы (СБ) их суммы. В качестве маркеров использовали глицерин, глюкозу, инозитол, трегалозу и маннит (Sigma, США); оценку выполняли дважды.

Микроскопический анализ поврежденности мембран сперматозоидов осуществляли по протоколу эозин/нигрозин, визуализировали на Axio Imager 1.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия, 1000x под иммерсией) [17]. В каждом образце оценивали не менее 200 клеток. Клетки, окрашенные в розовый цвет, считали поврежденными. Сохранность хроматина определяли с использованием протокола Toluidine Blue (ТВ) [18]; сперматозоиды с интактным хроматином были окрашены в голубой цвет, сперматозоиды с поврежденным хроматином – в темно-синий. В каждом образце оценивали не менее 200 клеток с использованием фазово-контрастного оптического микроскопа (Motic BA410E, Китай, увеличение x40). Интактность акросом сперматозоидов определяли по протоколу Coomassie [19, 20]: интактными считали акросомы сперматозоидов, окрашенные в синий цвет, поврежденными – не окрашенные. Оценивали 5–6 микроскопических полей, всего не менее 200 клеток. Степень агрегации в семени определяли по соотношению числа агрегированных сперматозоидов в конгломерате к общему числу сперматозоидов в поле зрения при увеличении x100 с использованием системы CASA (ArgusSoft, Россия); оценивали не менее 5 полей зрения. Сравнение показателей жизнеспособности, подвижности, целостности хроматина и акросом между свежими и заморожено/оттаянными сперматозоидами проводили с использованием парных t-тестов, различия между выборками оценивали по методу Стьюдента. Результаты выражены как Mean ± SEM. Для статистического анализа было проведено по 3 повторности каждого испытания.

Результаты и обсуждение. Фильтрация и центрифугирование, как способы технологической подготовки семени, снижали концентрацию сперматозоидов соответственно на 6,0 % и 33,4 %.

Способ технологической подготовки семени оказал значительное влияние на качественные показатели семени после 3 ч хранения (см. табл.). При использовании фильтрации общая и прогрессивная подвижности сперматозоидов были выше, чем после центрифугирования, соответственно на 10,3 % и 14,0 %, а поврежденность хроматина сперматозоидов меньше на 23,0 % ($p < 0,001$). По поврежденности мембран и акросом сперматозоидов преимуществ фильтрации не установлено.

В результате оценки показателей заморожено/оттаянного семени отмечено достоверное ($p < 0,01$) преимущество предварительной фильтрации, по сравнению с центрифугированием, по общей подвижности сперматозоидов на 21,8 %, по прогрессивной подвижности – на 20,0 %, по поврежденности хроматина – на 17,1 %, поврежденности акросом – на 11,8 %.

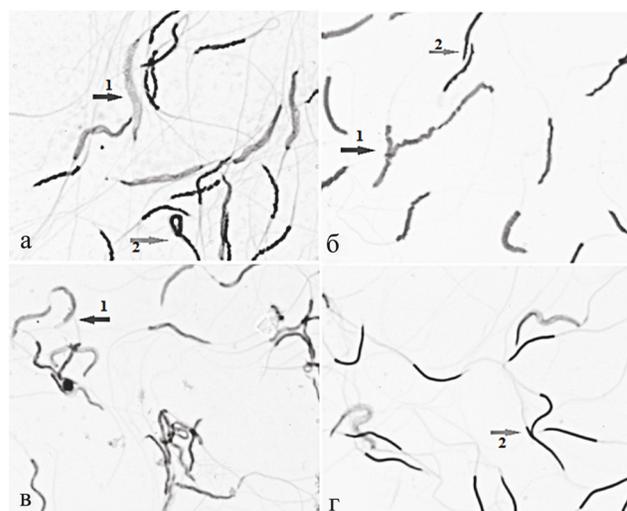


Рис. 1. Целостность хроматина (окрашивание ТВ) сперматозоидов под влиянием различных способов подготовки в протоколе замораживания/оттаивания: а) семя разбавленное, хранение 3 ч; б) семя разбавленное замороженное, в) семя размороженное профильтрованное, г) семя размороженное центрифугированное (стрелки 1 – интактный хроматин, стрелки 2 – поврежденный хроматин).

При микроскопической оценке степени поврежденности хроматина сперматозоидов нативного и заморожено/оттаянного семени было визуально отмечено изменение плотности окрашивания хроматина в клетках и интенсивности его окрашивания (рис. 1) в зависимости от способа технологической подготовки семени. У интактных и поврежденных сперматозоидов, не прошедших предвари-

тельную обработку (хранение 3 ч, рис. 1а) и оттаянных (разбавление, рис. 1б) отмечено наличие нечетких контуров, рыхлость и фрагментарность хроматина. Заморожено/оттаянные сперматозоиды в варианте с фильтрацией (рис. 1в) отличаются высокой сохранностью хроматина (светлые клетки с интактным хроматином имеют ровные четкие контуры, без рыхлости и фрагментарности). При использовании центрифугирования отмечено значительное количество сперматозоидов с поврежденным хроматином (темные клетки, рис. 1г).

Известно, что агглютинация сперматозоидов может возникнуть под влиянием нескольких факторов, в том числе присутствия инородных микрочастиц в эякуляте, а также при изменении электрического потенциала мембран сперматозоидов в результате их повреждений [21, 22]. В наших исследованиях поврежденность мембран заморожено/оттаянных сперматозоидов при использовании фильтрации была ниже (см. табл.), чем при других технологических способах, что, вероятно, способствовало сохранению электрического потенциала мембран сперматозоидов. Можно предположить, что при фильтрации семени происходит более эффективное удаление возможных инородных микрочастиц, чем при других технологических способах, в результате отмечено достоверное ($p < 0,01$), в два и более раза, снижение степени агглютинации при использовании этого метода (рис. 2).

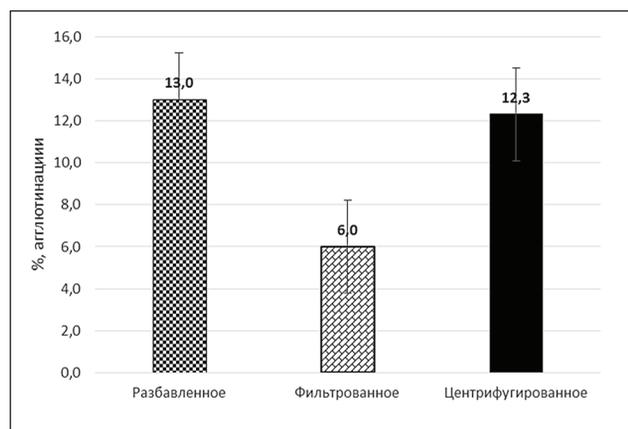


Рис. 2. Показатели степени агглютинации заморожено/оттаянного семени в зависимости от его технологической подготовки.

Важные энергетические и структурные компоненты плазматической мембраны и цитозоля сперматозоидов – углеводы и полиолы. По результатам хроматографического анализа было установлено, что в нативном неразбавленном семени их сумма в цитозоле составила 0,040 % от СБ, в образце семени после хранения с разбавителем ЛКС – 0,096 % от СБ, в заморожено/оттаянном семени – 0,024 % от СБ. Amaral A. (2022) [23] при изучении динамики общего содержания углеводов и полиолов доказал их связь с метаболизмом и энергетическим расходом клеток. Эти процессы происходят при использовании экзогенных и/или эндогенных субстратов для эффективного производства АТФ [23]. Наблюдаемая в нашем исследовании динамика содержания углеводов и полиолов в цитозоле клеток у разбавленного семени при хранении, вероятно, объясняется составом криопротекторного разбавителя ЛКС, содержащего фруктозу; у заморожено/оттаянного семени – разрушением части клеток при низкотемпературном воздействии и выходе содержимого цитозоля за пределы мембран.

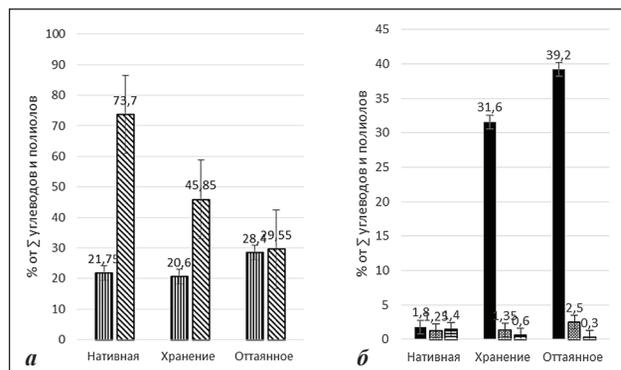


Рис. 3. Динамика состава цитозоля (нативное семя, хранение в течение 3 ч, заморожено/оттаянное семя) сперматозоидов петухов, % от суммы углеводов и полиолов: а) полиолы (■ — глицерин, ▨ — инозитол); б) углеводы (■ — фруктоза, ▨ — глюкоза, ▩ — маннит).

В нативном семени преобладали глицерин (73,7 % от суммы углеводов и полиолов) и инозитол (21,8 %) содержание углеводов было значительно меньше (1,2...1,8 %). Основные изменения в составе цитозоля, произошедшие в результате хранения и замораживания/оттаивания семени, выражались в уменьшении относительного содержания инозитола соответственно на 27,8 % и 44,2 % от суммы углеводов и полиолов (рис. 3). Такое значительное снижение, вероятно, объясняется расходом клетками инозитола в качестве антиоксиданта в течение хранения и замораживания/оттаивания семени [24]. Увеличение концентрации фруктозы в цитозоле сперматозоидов до 31,6 % от суммы углеводов и полиолов произошло под влиянием разбавителя ЛКС в результате транспорта молекул фруктозы через плазматическую мембрану сперматозоидов, который может осуществляться путем простой диффузии при хранении семени. Рост величины этого показателя до уровня 39,2 % от суммы углеводов и полиолов при замораживании/оттаивании клеток может быть обусловлен снижением общего содержания углеводов и полиолов в СБ в результате повышения поврежденности мембран сперматозоидов (на 38,4 %) и изменения баланса углеводов и полиолов цитозоля.

Выводы. Фильтрация, как способ технологической обработки семени петухов, может быть эффективным дополнительным этапом подготовки семени для искусственного осеменения и/или краткосрочного хранения, а также долговременного хранения в условиях ультранизких температур. Его использование позволяет снизить поврежденность мембран заморожено/оттаянных сперматозоидов на 13,3 %, степень их агглютинации – в 2 раза и повысить прогрессивную подвижность на 4,1 %, по сравнению с разбавленным заморожено/оттаянным семенем без применения фильтрации. Центрифугирование при подготовке семени к замораживанию не оказывает значимого влияния на степень агглютинации сперматозоидов, но значительно снижает уровень их общей и прогрессивной подвижности (соответственно на 14,3 и 15,9 %), а также целостность хроматина на 24,0 %, поэтому его использование нецелесообразно для использования в технологии криоконсервации семени петухов.

Технологические факторы хранения семени петухов в различных режимах (кратковременное при температуре 5 °С и долговременное при температуре –196 °С) оказывают значительное влияние на соотношение компонентов цитозоля сперматозоидов (углеводов и полиолов).

Снижение относительного содержания инозитола в составе цитозоля заморожено/оттаянных сперматозоидов, по сравнению с показателями нативного семени, в 2,5 раза позволяет рекомендовать введение в состав криозащитных сред для семени петухов антиоксиданта инозитола.

Представленные результаты имеют не только научно-теоретическое значение в плане изучения динамических изменений кинетических и морфологических параметров сперматозоидов, но и способствуют решению практических задач в племенном промышленном птицеводстве – повышению эффективности применения технологии искусственного осеменения кур.

Литература

- Zrimšek P., Manafi M. E. Evaluation of a new method and diagnostic test in semen analysis // *Artificial insemination in farm animals* / ed. M. E. Manafi. Rijeka, Croatia, InTech. 2011. P. 131–152.
- ГОСТ 27267-2017 Средства воспроизводства. Сперма петухов и индюков неразбавленная свежесполученная. Технические условия. М.: Стандартинформ, 2017. 9 с.
- Коноплева А. П., Андреева А. А., Трохалис Т. Н. Разбавители спермы и их влияние на эффективность искусственного осеменения // *Сборник научных трудов ВНИТИП. Сергиев Посад: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства*, 2010. Т. 85. С. 25–29.
- Целютин К. В., Тур Б. К. Криоконсервация спермы птиц – как инструмент сохранения генофонда // *Генетика и разведение животных*. 2015. № 1. С. 50–52.
- Peláez J., Bongalhardo D. C., Long J. A. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates // *Poultry science*. 2011. Vol. 90. No. 2. P. 435–443.
- The Impact of in vitro inoculation and dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on sperm quality of aged White Leghorn roosters / M. N. Dos Santos, R. Ramachandran, K. Wamsley, et al. // *Journal of Applied Poultry Research*. 2018. No. 27. P. 304–315.
- Negative correlation between presence of reactive oxygen species and Sperm Motility Index in whole semen samples of infertile males / S. Kuroda, Y. Yumura, K. Mori, et al. // *Revista Internacional de Andrología*. 2017. Vol. 15. No. 3. P. 84–89.
- Intact cell MALDI-TOF MS on sperm: A molecular test for male fertility diagnosis / L. Soler, V. Labas, A. Thélie, et al. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2016. Vol. 15. No. 6. P. 1998–2010.
- Santiago-Moreno J., Blesbois E. Functional aspects of seminal plasma in bird reproduction // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. No. 16. P. 5664. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/16/5664> (дата обращения: 16.04.2023)
- Seminal plasma proteome as an indicator of sperm dysfunction and low sperm motility in chickens / Y. Li, Y. Sun, A. Ni, et al. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2020. Vol. 19. No. 6. P. 1035–1046.
- Michailidis G., Avdi M. Transcriptional profiling of gallinacins antimicrobial peptides in the chicken reproductive tract and embryos // *Journal of Biological Research*. 2010. No. 14. P. 211–218.
- Role of mono- and disaccharide combination in cryoprotective medium for rooster semen to ensure cryoresistance of spermatozoa / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, N. Pleshanov, et al. // *Molecules*. 2021. Vol. 26. No. 19. P. 5920. URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/19/5920> (дата обращения: 10.04.2023)
- Целютин К. В., Тур Б. К. Искусственное осеменение и криоконсервация спермы сельскохозяйственной птицы (петухи, индюки, гусаки, селезни). СПб.-Пушкин: ГНУ ВНИИГРЖ Россельхозакадемии, 2013. 87 с.
- Авторское свидетельство № 1130339 А1 СССР, МПК А61D 7/02. Среда для низкотемпературной консервации спермы птиц: № 3434811: заявл. 18.03.1982: опубл. 23.12.1984 / А. Д. Курбатов, Л. Е. Нарубина, Г. Б. Бубляева и др.; заявитель Всесоюзный научно-исследовательский институт разведения и генетики сельскохозяйственных животных.
- Эффективность использования комбинаций сахаридов в средах для криоконсервации спермы петухов / Ю. Л. Силукова, О. И. Станисhevская, Н. В. Плешанов и др. // *Сельскохозяйственная биология*. 2020. Т. 55. № 6. С. 1148–1158.
- Effects of Trehalose Supplementation on Lipid Composition of Rooster Spermatozoa Membranes in a Freeze/Thaw Protocol / O. I. Stanishevskaya, Y. Silyukova, E. Fedorova, et al. // *Animals*. 2023. Vol. 13. No. 6. P. 1023. URL: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/6/1023> (дата обращения: 10.04.2023). doi: 10.3390/ani13061023
- Pintado B., de la Fuente J., Roldan E. R. S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability // *Journal of Reproduction and Fertility*. 2000. Vol. 118. No. 1. P. 145–152. doi: 10.1530/reprod/118.1.145.
- Beletti M. E., Mello M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology // *Theriogenology*. 2004. Vol. 62. No. 3–4. P. 398–402.
- Trehalose as a Stabilizer of the Lipid Composition of Membranes and the Composition of the Cytosol of Frozen/Thawed Rooster Spermatozoa / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, V. Tereshina, et al. // *Agriculture*. 2023. No. 13. P. 1387. URL: <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/7/1387> (дата обращения: 12.04.2023). doi: 10.3390/agriculture13071387.
- Evaluation of the acrosomal status in Lama glama sperm incubated with acrosome reaction inducers / M. I. Carretero, F. G. Fumuso, D. M. Neild, et al. // *Animal reproduction science*. 2015. No. 160. P. 1–11. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432015001451?via%3Dihub> (дата обращения: 12.04.2023)
- Characteristics and possible role of bovine sperm head-to-head agglutination / K. Umezū, S. Kurata, H. Takamori, et al. // *Cells*. 2020. Vol. 9. No. 8. P. 1865. URL: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/8/1865> (дата обращения: 10.04.2023).
- Penicillamine prevents ram sperm agglutination in media that support capacitation / T. Leahy, J. P. Rickard, R. J. Aitken, et al. // *Reproduction*. 2016. Vol. 151. No. 2. P. 167–177.
- Amaral A. Energy metabolism in mammalian sperm motility // *WIREs Mech. Dis*. 2022. No 114. e1569. URL: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wsbm.1569> (дата обращения: 14.04.2023) doi: 10.1002/wsbm.1569
- Oxidative stress and male fertility: role of antioxidants and inositols / M. N. De Luca, M. Colone, R. Gambioli, et al. // *Antioxidants*. 2021. Vol. 10. No. 8. C. 1283. URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/8/1283> (дата обращения: 14.04.2023)

Поступила в редакцию 05.05.2023
После доработки 10.07.2023
Принята к публикации 15.08.2023