

# Влияние ферментативных антиоксидантов на показатели спермы петухов с разной устойчивостью к сверхнизким температурам

Антон Алексеевич Курочкин, Николай Вячеславович Плешанов

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных (ВНИИГРЖ) – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»

**Аннотация:** Криоконсервация спермы петухов является важным методом сохранения генетического материала птиц. В настоящее время основной проблемой при криоконсервации спермы петухов является снижение ее общей подвижности и фертильности. Одной из причин деструктивного влияния процесса криоконсервации является повышенная выработка клетками активных форм кислорода (АФК), спровоцированная циклом замораживания-оттаивания. АФК в клетках образуются, в основном, при протекании окислительно-восстановительных реакций, они необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток. Однако процесс криоконсервации спермы индуцирует образование избыточного количества АФК, что оказывает повреждающее воздействие на клетки. В нашем исследовании мы определяли степень влияния внутриклеточного пероксида водорода на показатели заморожено-оттаянного семени петухов с разной криоустойчивостью. Ферментативные антиоксиданты оказали положительное воздействие на показатели заморожено-оттаянного семени петухов. Для супероксиддисмутазы эффективная концентрация составила 75 МЕ/мл, для каталазы – 200 мг/мл. Большой эффект от введения ферментативных антиоксидантов в состав разбавителя для криоконсервации семени петухов был получен в группе петухов с исходно низкой криоустойчивостью спермы, что может говорить о том, что снижение общей подвижности спермы петухов после криоконсервации в большей степени связано с окислительным стрессом.

**Ключевые слова:** сперма петухов, криоконсервация, окислительный стресс, разбавители, ферментативные антиоксиданты.

**Для цитирования:** Курочкин, А.А. Влияние ферментативных антиоксидантов на показатели спермы петухов с разной устойчивостью к сверхнизким температурам / А.А. Курочкин, Н.В. Плешанов // Птицеводство. – 2023. – №11. – С. 15-20.

**doi:** 10.33845/0033-3239-2023-72-11-15-20

**Введение.** Одной из причин деструктивного влияния процесса криоконсервации спермы на структурную целостность сперматозоидов является повышенная выработка клетками активных форм кислорода (АФК), спровоцированная циклом замораживания-оттаивания. АФК в клетках образуются, в основном, при протекании окислительно-восстановительных реакций, они необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток. В малых концентрациях АФК способствуют капацитации сперматозоидов [1,2], гиперакти-

вации и целостности акросом [3]. Однако процесс криоконсервации спермы индуцирует образование избыточного количества АФК, которые оказывают повреждающее воздействие на клетки. Снижение активности антиоксидантных клеточных ферментов также индуцирует повреждение сперматозоидов во время криоконсервации [4].

Влияние свободных радикалов и перекисей включает в себя повреждение белков, перекисное окисление липидов и повреждение целостности структуры молекул мтДНК и яДНК. Окислитель-

ный стресс считается основной причиной фрагментации ДНК в сперме, и, учитывая, что криоконсервация также повышает уровень АФК в сперме, он, вероятно, также является основной причиной фрагментации ДНК в криоконсервированной сперме [5]. Таким образом, криоиндуцированное повреждение ДНК преимущественно вызвано окислительным стрессом [6-8].

Холестерин и фосфолипиды важны для поддержания структурной целостности мембранных систем и играют роль в криорези-





стенности спермы птиц [9]. В частности, плазматическая мембрана сперматозоидов содержит большие количества полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), необходимых для акросомной реакции и взаимодействия с мембраной ооцита. С другой стороны, высокое содержание ПНЖК в плазматических мембранах сперматозоидов делает их очень восприимчивыми к липопероксидации и уязвимыми для окислительного стресса, что особенно проявляется у спермы птиц [10,11].

Известно, что, в отличие от сперматозоидов млекопитающих, в сперматозоидах птиц мало цитоплазматических антиоксидантов, а мембраны богаты ПНЖК [11-13]. Данная особенность строения плазматической мембраны спермиев делает сперму птиц особенно восприимчивой к свободнорадикальному окислению липидов [14]. Наиболее распространенными АФК являются супероксидный анион-радикал ( $O_2^-$ ) и пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) [1], поэтому оценка внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  может отражать антиоксидантную способность клеток.

Более того, в исследованиях ряда авторов доля клеток с повышенным содержанием пероксида водорода разнится. Так, в одном исследовании при использовании разбавителя Lake доля клеток с повышенным содержанием  $H_2O_2$  составила  $28,5 \pm 3,2\%$ , а разбавителя Betsville –  $45,9 \pm 3,2\%$  [15]. В другом исследовании этот показатель составил  $19,0 \pm 1,32\%$  [16]. Такие различия могут говорить об изменчивости данного показателя вследствие индивидуальных особенностей отдельных особей.

В нашем исследовании мы определяли степень влияния вну-

триклеточного пероксида водорода на показатели заморожено-оттаянного семени петухов с разной общей подвижностью после криоконсервации.

**Материалы и методика исследований. Взятие и криоконсервация спермы.** В исследовании использовались петухи породы красный род-айленд ( $n=20$ ) в возрасте 52-56 недель жизни из «Генетической коллекции редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ. Взятие спермы осуществляли методом абдоминального массажа в пенициллиновые флаконы. Сперму собирали дважды в неделю на протяжении 3 недель. В ходе первичной оценки индивидуальных эякулятов были отобраны особи с общей подвижностью заморожено-оттаянного семени  $\geq 30\%$  ( $n=8$ , группа 1) и  $\leq 30\%$  ( $n=12$ , группа 2). Для каждой группы свежеполученные эякуляты смешивали в один кластер и делили на равные аликвоты в соответствии с экспериментальными группами.

Для составления экспериментальных сред к разбавителю ЛКС-1 (Ленинградская криозащитная среда), разработанному ВНИИГРЖ [17], добавлялись ферментативные антиоксиданты: супероксиддисмутаза (СОД; Sigma-Aldrich, США) в количестве 75 МЕ/мл (группа S75) и 200 МЕ/мл (группа S200), каталаза (Sigma-Aldrich, США) в количестве 100 мкг/мл (группа C100) и 200 мкг/мл (группа C200). Разбавители добавлялись к свежеполученным эякулятам сразу после взятия в соотношении 1:1.

Разбавленное семя помещали в холодильную камеру ( $t=5^\circ C$ ) для эквilibрации на 40 мин. В качестве криопротектора использова-

ли N,N-диметилацетамид (DMA; Sigma-Aldrich, США). После эквilibрации осуществлялось добавление DMA в количестве, соответствующем конечной концентрации 6%. После внесения DMA образцы снова помещали в холодильную камеру на 1 мин для уравнивания температуры. Криоконсервация производилась в гранулах, по методике [18]. Размораживание гранул происходило на нагретой металлической пластине ( $t=60^\circ C$ ) по методике ВНИИГРЖ (1989).

#### **Проточная цитометрия.**

Анализ образцов спермы петухов проводили с использованием проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter, Inc.). Перед исследованием образцы разбавленной спермы дважды промывали двухкомпонентным разбавителем для спермы петухов ВНИИГРЖ (патент № 2482816, 2013) при 214 г в течение 7 мин. В каждом образце анализировалось не менее 10000 событий. Целевую популяцию клеток отбирали на точечном графике, построенном на основании данных бокового светорассеяния (SSC-A), и малоуглового светорассеяния (FSC-A) для исключения посторонних клеток и конгломератов сперматозоидов. Анализ данных, полученных на проточном цитофлуориметре, проводили с помощью программного обеспечения CytExpert, v. 2.4.0.28 (Beckman Coulter, Inc.).

#### **Определение жизнеспособности сперматозоидов.**

Долю живых, мертвых, некротических и апоптотических клеток определяли, используя набор Аннексин V, AF488/PI, Lumiprobe. Образцы семени петухов после двукратной отмывки ресуспензировали



в буфере и отбирали 100 мкл суспензии клеток для окрашивания. Аннексин добавляли к образцам в количестве 2 мкл и инкубировали в течение 10 мин при  $t=25^{\circ}\text{C}$ . По прошествии этого времени к образцам добавляли 400 мкл буфера для связывания. Перед оценкой образцов на проточном цитофлуориметре к ним добавлялся второй флуорохром – PI (5 мкл на 500 мкл образца). Все разведения образцов и используемые концентрации флуорохромов использовались в соответствии с рекомендациями производителя набора. При оценке жизнеспособности образцов нативной и заморожено-оттаянной спермы исследуемая популяция клеток была разделена на четыре субпопуляции по цвету и интенсивности флуоресценции: живые, апоптотические, некротические и мертвые клетки.

**Определение содержания внутриклеточного пероксида водорода в сперматозоидах.** Для детектирования внутриклеточного пероксида водорода использовали флуорохром 2,7-дихлорфлуоресцеина диацетат (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, США). Образцы семени были разбавлены до концентрации  $3 \times 10^6$  сперматозоидов на 1 мл. Затем к образцам спермы добавляли 4 мкл DCFH-DA (конечная концентрация 4 мкМ) и помещали в темное место на 20 мин ( $t=25^{\circ}\text{C}$ ). Спустя 20 мин образцы отмывались от остатков флуорохрома (1200 об./мин. в течение 7 мин). Перед тем, как образцы были оценены на проточном цитофлуориметре, к ним добавлялся второй флуорохром – PI (2 мкл на 1000 мкл образца). При оценке уровня флуоресценции на проточном цитофлуориметре выделяли две популяции клеток

с интактной плазматической мембраной – с высоким и низким содержанием  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Оценка мембранного потенциала митохондрий.** Для окрашивания митохондрий в живых клетках использовали тетраметилродамин (TMRE). Этот липофильный и положительно заряженный краситель проникает через плазматическую мембрану клеток, селективно накапливаясь в активных митохондриях благодаря трансмембранному потенциалу, который митохондрии поддерживают в нормальном состоянии. Деполяризация митохондрий вследствие запуска процессов апоптоза, некроза или других факторов характеризуется уменьшением мембранного потенциала и, как следствие, уменьшением накопления красителя и его флуоресценции, по сравнению с интактными клетками, имеющими поляризованные митохондрии. Образцы семени были разбавлены до концентрации  $3 \times 10^6$  сперматозоидов на 1 мл. После к образцам спермы добавляли 1 мкл TMRE (конечная концентрация 1 мкМ/мл) и помещали в темное место на 20 мин ( $t=25^{\circ}\text{C}$ ). Спустя 20 мин производилась двойная отмывка образцов от остатков флуорохрома (1200 об./мин. в течение 7 мин), после чего окрашенные образцы оценивались на проточном цитофлуориметре.

**Результаты исследований и их обсуждения.** Доля живых клеток в нативной сперме в группе 1 была больше на 8,26% ( $p<0,05$ ), доля мертвых клеток – меньше на 4,91% ( $p<0,05$ ) по сравнению с группой 2. Доля клеток с повышенным содержанием внутриклеточного пероксида во-

дорода в группах 1 и 2 составила  $43,11 \pm 5,94$  и  $35,37 \pm 2,49\%$  соответственно, доля клеток с высоким митохондриальным потенциалом –  $76,30 \pm 8,33$  и  $80,81 \pm 11,88\%$  (табл. 1). Таким образом, показатели нативной спермы находились на высоком уровне и достоверно различались между двумя группами, что говорит о взаимосвязи полученных данных с общей подвижностью сперматозоидов петухов в свежеполученных эякулятах.

В образцах заморожено-оттаянного семени разница между группами с разной общей подвижностью нативной спермы была выше. Так, в группе 1 доля живых клеток в контроле составила  $67,34 \pm 8,52$ , апоптотических клеток  $3,43 \pm 1,54$ , некротических клеток  $12,37 \pm 3,35$ , мертвых клеток  $8,41 \pm 0,17\%$ ; в группе 2 данные показатели составили  $52,94 \pm 4,43$ ;  $2,34 \pm 0,52$ ;  $19,94 \pm 1,87$  и  $24,90 \pm 6,88\%$  соответственно.

Известно, что СОД и каталаза способны нивелировать деструктивное влияние АФК путем ускорения реакций распада пероксида водорода, а также уменьшать окислительный стресс за счет поддержания баланса между  $\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  [19,20]. Мы наблюдали достоверное снижение доли клеток с повышенным содержанием пероксида водорода в заморожено-оттаянной сперме в экспериментальных группах с добавлением антиоксидантов в сравнении с контролем. Данная тенденция прослеживалась и в группе 1, и в группе 2. Взаимосвязь данного показателя с долей апоптотических клеток составила  $r=0,57$  ( $p<0,05$ ) для группы 2 и  $r=0,69$  ( $p<0,05$ ) для группы 1, что говорит о непосредственном влиянии внутриклеточного пероксида водорода на запуск процесса



**Таблица 1. Показатели заморожено-оттаянной спермы петухов с разной устойчивостью к сверхнизким температурам с добавлением ферментативных антиоксидантов**

Группа	Группа 1						Группа 2					
	Живые клетки, %	Апоптоз, %	Некроз, %	Мертвые клетки, %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , %	Мит. потенциал, %	Живые клетки, %	Апоптоз, %	Некроз, %	Мертвые клетки, %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , %	Мит. потенциал, %
Нативная сперма	82,26 ± 1,18 <sup>CA</sup>	2,44 ± 0,54 <sup>C</sup>	4,01 ± 0,66 <sup>CK</sup>	11,29 ± 0,97 <sup>CHA</sup>	43,11 ± 5,94 <sup>CHK</sup>	80,81 ± 11,88 <sup>C</sup>	73,98 ± 1,55 <sup>AG</sup>	3,18 ± 0,88 <sup>AC</sup>	6,64 ± 1,14 <sup>A</sup>	16,20 ± 1,18 <sup>AG</sup>	35,37 ± 2,49 <sup>ACDEF</sup>	76,30 ± 8,33 <sup>A</sup>
Контроль	67,34 ± 8,52 <sup>H</sup>	3,43 ± 1,54 <sup>H</sup>	12,37 ± 3,35 <sup>H</sup>	8,41 ± 0,17 <sup>HG</sup>	39,45 ± 11,39 <sup>HJL</sup>	67,13 ± 8,38 <sup>H</sup>	52,94 ± 4,43 <sup>BA</sup>	2,34 ± 0,52 <sup>BC</sup>	19,94 ± 1,87 <sup>BA</sup>	24,90 ± 6,88 <sup>B</sup>	41,37 ± 11 <sup>BCDEF</sup>	62,81 ± 5,73 <sup>B</sup>
S75	71,04 ± 6,54 <sup>I</sup>	1,66 ± 0,41 <sup>I</sup>	12,11 ± 2,49 <sup>I</sup>	15,20 ± 4,08 <sup>I</sup>	15,29 ± 7,28 <sup>IG</sup>	75,72 ± 6,62 <sup>I</sup>	56,59 ± 13,79 <sup>CA</sup>	0,70 ± 0,06 <sup>CAB</sup>	12,93 ± 4,43 <sup>C</sup>	34,33 ± 14,29 <sup>C</sup>	12,69 ± 3,19 <sup>CAB</sup>	64,04 ± 13,63 <sup>C</sup>
S200	70,09 ± 6,68 <sup>J</sup>	2,17 ± 1,38 <sup>J</sup>	12,06 ± 2,16 <sup>J</sup>	9,21 ± 0,73 <sup>JD</sup>	8,20 ± 2,37 <sup>JHG</sup>	71,05 ± 5,79 <sup>J</sup>	51,49 ± 8,69 <sup>DA</sup>	1,01 ± 0,31 <sup>D</sup>	18,90 ± 0,40 <sup>DA</sup>	19,92 ± 0,49 <sup>DJ</sup>	10,02 ± 3,79 <sup>DAB</sup>	52,01 ± 16,61 <sup>D</sup>
C100	63,38 ± 8,18 <sup>K</sup>	0,91 ± 0,51 <sup>K</sup>	12,57 ± 1,80 <sup>KC</sup>	15,21 ± 5,83 <sup>K</sup>	11,08 ± 2,53 <sup>KG</sup>	75,24 ± 0,32 <sup>K</sup>	50,30 ± 3,23 <sup>EA</sup>	2,48 ± 0,66 <sup>E</sup>	23,77 ± 0,59 <sup>E</sup>	20,24 ± 1,95 <sup>E</sup>	13,92 ± 6,55 <sup>EAB</sup>	72,65 ± 5,34 <sup>E</sup>
C200	67,60 ± 5,98 <sup>L</sup>	2,16 ± 1,29 <sup>L</sup>	14,44 ± 3,73 <sup>L</sup>	21,35 ± 11,10 <sup>L</sup>	8,47 ± 2,70 <sup>LH</sup>	76,32 ± 3,07 <sup>L</sup>	58,21 ± 7,11 <sup>FA</sup>	1,90 ± 0,55 <sup>F</sup>	13,16 ± 7 <sup>F</sup>	13,72 ± 2,30 <sup>F</sup>	12,84 ± 6,20 <sup>FAB</sup>	64,38 ± 8,49 <sup>F</sup>

Данные в таблице представлены в виде средних величин, ± ст. ошибка. Латинским буквам соответствуют разные группы (Группа – 2, нативная сперма: А, контроль: В, S75: С, S200: D, C100: E, C200: F, группа – 1, нативная сперма: G, контроль: H, S75: I, S200: J, C100: K, C200: L), несколько букв обозначают достоверность разницы между показателями, (p<0,05), группы сравнивались между собой внутри каждого показателя, но не между показателями. Контролем являлась группа заморожено-оттаянного семени с разбавителем ЛКС-1. Достоверность рассчитывали по t-критерию Стьюдента.

апоптоза клеток. Приняв во внимание тенденцию к увеличению митохондриального потенциала клеток в экспериментальных группах с добавлением антиоксидантов, можно предположить, что причиной наблюдаемого нами запуска клеточной гибели является активация каспазного каскада и экспрессия фосфатидилсерина на поверхности клеток вследствие высвобождения митохондриями цитохрома С и других апоптогенных факторов [21].

СОД, добавленная к среде в количестве 75 МЕ/мл, увеличивала жизнеспособность клеток в сравнении с контролем. Добавление большего количества антиоксиданта в среду (200 МЕ/мл) дало незначительные улучшения только в группе 1, а в группе 2 данная

концентрация оказала токсичное действие на сперматозоиды. Для каталазы, напротив, более высокая концентрация в разбавителе (200 мг/мл) оказала более выраженное положительное действие на показатели спермы после цикла замораживания-оттаивания, в т.ч. в группе 2 (табл. 1).

**Выводы.** Ферментативные антиоксиданты (СОД и каталаза) оказали положительное воздействие на показатели заморожено-оттаянного семени петухов. Для СОД эффективная концентрация составила 75 МЕ/мл, для каталазы – 200 мг/мл. Среднее увеличение доли живых клеток было больше в группе 2 (с изначально более низкой общей подвижностью заморожено-оттаянного семени), что может говорить о том, что снижение общей

подвижности спермы петухов после криоконсервации в большей степени связано с окислительным стрессом. Достоверная взаимосвязь между долей клеток с повышенным содержанием пероксида водорода и долей апоптотических клеток говорит о непосредственном влиянии АФК на запуск процессов клеточного апоптоза.

Использование предлагаемых составов разбавителей для криоконсервации семени петухов, вероятно, даст возможность расширить спектр самцов, пригодных для криоконсервации репродуктивных клеток, что будет способствовать сохранению биоразнообразия сельскохозяйственных птиц.

**Работа выполнена в рамках государственного задания № 121052600357-8.**

### Литература / References

1. Aitken, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage / R.J. Aitken // Mol. Reprod. Dev. - 2017. - V. 84. - No 10. - P. 1039-1052. doi: 10.1002/mrd.22871



2. Ford, W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species / W.C.L. Ford // *Hum. Reprod. Update.* - 2004. - V. 10. - No 5. - P. 387-399. doi: 10.1093/humupd/dmh034
3. Pons-Rejraji, H. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility / H. Pons-Rejraji, B. Sion, F. Saez, F. Brugnol, L. Janny, G. Grizard // *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* - 2009. - V. 37. - No 6. - P. 529-535. doi: 10.1016/j.gyobfe.2009.04.015
4. Kowalczyk, A. Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process / A. Kowalczyk, E. Czerniawska Piątkowska // *Andrology.* - 2021. - V. 9. - No 4. - P. 1275-1281. doi: 10.1111/andr.12996
5. Thomson, L.K. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis / L.K. Thomson, S.D. Fleming, R.J. Aitken, G.N. De Luliis, J.-A. Zieschang, A.M. Clark // *Hum. Reprod.* - 2009. - V. 24. - No 9. - P. 2061-2070. doi: 10.1093/humrep/dep214
6. Kläver, R. Routine cryopreservation of spermatozoa is safe — Evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes / R. Kläver, A. Bleiziffer, K. Redmann, C. Mallidis, S. Kliesch, J. Gromoll // *J. Assist. Reprod. Genet.* - 2012. - V. 29. - No 9. - P. 943-950. doi: 10.1007/s10815-012-9813-z
7. Aitken, R.J. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line / R.J. Aitken, G.N. De Luliis, R.I. McLachlan // *Intl. J. Androl.* - 2008. - V. 32. - No 1. - P. 46-56. doi: 10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x
8. Agarwal, A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction / A. Agarwal, R.A. Saleh, M.A. Bedaiwy // *Fertil. Steril.* - 2003. - V. 79. - No 4. - P. 829-843. doi: 10.1016/s0015-0282(02)04948-8
9. Плешанов, Н.В. Криоустойчивость спермы петухов в зависимости от содержания в ней липидов / Н.В. Плешанов, О.И. Станишевская // *Генетика и разведение животных.* - 2015. - №1. - С. 53-57.
10. Surai, P.F. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen / P.F. Surai, N. Fujihara, B.K. Speake, J.-P. Brillard, G.J. Wishart, N.H.C. Sparks // *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* - 2001. - V. 17. - No 7. - P. 1024-1050. doi: 10.5713/ajas.2001.1024
11. Surai, P.F. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation / P.F. Surai, S. Cerolini, G.J. Wishart, B.K. Speake, R.C. Noble, N.H.C. Sparks // *Poult. Avian Biol. Rev.* - 1998. - V. 9. - No 1. - P. 11-23.
12. Mehaisen, G.M.K. Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality / G.M.K. Mehaisen, A. Partyka, Z. Ligocka, W. Nizański // *Anim. Reprod. Sci.* - 2020. - V. 212. - P. 106238. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106238
13. Moghbeli, M. Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? / M. Moghbeli, H. Kohram, A. Zare-Shahaneh, M. Zhandi, M. Sharafi, M.M. Nabi, V. Zahedi, H. Sharideh // *Cryobiology.* - 2016. - V. 72. - No 3. - P. 264-268. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.03.008
14. Khan, R.U. Antioxidant and poultry semen quality / R.U. Khan // *World's Poult. Sci. J.* - 2011. - V. 67. - No 2. - P. 297-308. doi: 10.1017/S0043933911000316
15. Salehi, M. Cryopreservation of rooster semen: evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm / M. Salehi, A.H. Mahdavi, M. Sharafi, A. Shahverdi // *Theriogenology.* - 2019. - V. 142. - No 1. - P. 15-25. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.030
16. Rezaie, F.S. Improving the post-thaw quality of rooster semen using the extender supplemented with resveratrol / F.S. Rezaie, M. Hezavehei, M. Sharafi, A. Shahverdi // *Poult. Sci.* - 2021. - V. 100. - No 9. - P. 101290. doi: 10.1016/j.psj.2021.101290
17. Среда для низкотемпературной консервации спермы птиц / А.Д. Курбатов, Л.Е. Нарубина, Г.Б. Бубляева, Л.И. Москаленко, К.В. Целютин. - А.с. № 1130339, 22.08.1984.
18. Способ криоконсервации спермы петухов в виде гранул / Л.Е. Нарубина, А.Д. Курбатов, Г.Б. Бубляева, К.В. Целютин. - А.с. № 1343587, 1987.
19. Partyka, A. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen / A. Partyka, E. Łukaszewicz, W. Nizański // *Theriogenology.* - 2012. - V. 77. - No 8. - P. 1497-1504. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.006
20. Partyka, A. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm / A. Partyka, W. Nizański, J. Bajzert, E. Łukaszewicz, M. Ochota // *Cryobiology.* - 2013. - V. 67. - No 2. - P. 132-136. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.06.002
21. Pujianto, D.A. Hydrogen peroxide has adverse effects on human sperm quality parameters, induces apoptosis, and reduces survival / D.A. Pujianto, M. Oktarina, I.A. Sharma Sharaswati, Yulhasri // *J. Hum. Reprod. Sci.* - 2021. - V. 14. - No 2. - P. 121-128. doi: 10.4103/jhrs.jhrs\_241\_20

**Сведения об авторах:**

**Курочкин А.А.:** младший научный сотрудник лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; kurochkin.anton.66@gmail.com. **Плешанов Н.В.:** научный сотрудник лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; klaus-90@list.ru.

Статья поступила в редакцию 22.08.2023; одобрена после рецензирования 02.10.2023; принята к публикации 21.10.2023.

**Research article**

**Effects of Enzymatic Antioxidants in the Dilutants on the Parameters of Frozen/Thawed Rooster Sperm with Natively High and Low Tolerance to Ultra-Low Temperatures**

Anton A. Kurochkin, Nikolay V. Pleshanov

All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding - branch of the L.K. Ernst's Federal Research Center for Animal Husbandry

**Abstract.** Cryopreservation of roosters' sperm is an important method of preservation of avian genetic material; however, at present the efficiency of this method is constrained by the decreased motility and fertility of frozen/thawed sperm. The deterioration of quality of frozen/thawed sperm is directly related to the cellular production of reactive oxygen species (ROS) during these procedures. ROS are the normal products of cellular redox reactions necessary for cellular metabolism; however, the processes of cryopreservation of the sperm induce the excessive ROS production which can result in the damages of the cells. In the study presented we found the interrelationship between intracellular concentration of hydrogen peroxide and the parameters of frozen/thawed rooster semen samples with different native cryotolerance (i.e. resistance of general motility of the spermatozoa to the freezing/thawing cycle). Introduction of enzymatic antioxidants superoxide-dismutase (SOD) or catalase into the sperm dilutants prior to cryopreservation beneficially affected the parameters of frozen/thawed semen; the most effective concentration of SOD in the dilutant was found to be 75 IU/mL, concentration of catalase 200 mg/mL. Since the effect of these antioxidants was more evident with the sperm with natively lower cryotolerance it was concluded that oxidative stress induced by the cryopreservation of semen can be probably regarded as the main factor contributing to the decrease in general motility of the spermatozoa in frozen/thawed rooster sperm.

**Keywords:** rooster sperm, cryopreservation, oxidative stress, sperm dilutants, enzymatic antioxidants.

**For Citation:** Kurochkin A.A., Pleshanov N.V. (2023) Effects of enzymatic antioxidants in the dilutants on the parameters of frozen/thawed rooster sperm with natively high and low tolerance to ultra-low temperatures. *Ptitsevodstvo*, 72(11): 15-20. (in Russ.)

**doi:** 10.33845/0033-3239-2023-72-11-15-20

(For references see above)

**Authors:**

**Kurochkin A.A.:** Junior Research Officer, Lab. of Genetics, Breeding, and Gene Pool Preservation of Poultry; kurochkin.anton.66@gmail.com. **Pleshanov N.V.:** Research Officer, Lab. of Genetics, Breeding, and Gene Pool Preservation of Poultry; klaus-90@list.ru.

Submitted 22.08.2023; revised 02.10.2023; accepted 21.10.2023.

© Курочкин А.А., Плешанов Н.В., 2023

