

А.А. Курочкин ✉

Т.И. Кузьмина

О.И. Станишевская

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального исследовательского центра животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Санкт-Петербург, Россия

✉ kurochkin.anton.66@gmail.com

Поступила в редакцию:  
29.04.2024

Одобрена после рецензирования:  
12.07.2024

Принята к публикации:  
28.07.2024

## Research article

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-385-8-132-138

Anton A. Kurochkin ✉

Tatiana I. Kuzmina

Olga I. Stanishevskaya

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

✉ kurochkin.anton.66@gmail.com

Received by the editorial office:  
29.04.2024

Accepted in revised:  
12.07.2024

Accepted for publication:  
28.07.2024

## Влияние внутриклеточного пероксида водорода на качественные показатели спермы петухов в цикле замораживания/оттаивания

## РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Одним из факторов снижения общей подвижности после криоконсервации спермы петухов является влияние повышенной концентрации активных форм кислорода. Морфологические и биохимические особенности строения сперматозоидов птиц, делающие их более восприимчивыми к процессу криоконсервации по сравнению со сперматозоидами млекопитающих, могут также являться причиной, по которой сперма птиц больше подвержена влиянию оксидативного стресса.

**Методы.** Цели исследования — проследить изменение уровня внутриклеточных активных форм кислорода, в частности пероксида водорода ( $H_2O_2$ ), в процессе криоконсервации спермы петухов, оценить его влияние на качественные показатели и жизнеспособность сперматозоидов.

**Результаты.** Выявлена отрицательная корреляция ( $r = -0,68$ ,  $p < 0,05$ ) между внутриклеточным уровнем пероксида водорода и количеством мертвых клеток в нативной сперме. В замороженном (оттаянном) семени между данными показателями наблюдалась слабая взаимосвязь ( $r = -0,10$ ). Наблюдалось достоверное влияние уровня внутриклеточного пероксида водорода в свежеполученных эякулятах на общую подвижность замороженного (оттаянного) семени ( $r = -0,65$ ,  $p < 0,05$ ). Это позволяет сделать предположение, что аналогично со сперматозоидами млекопитающих продуцирование клетками повышенного количества активных форм кислорода ( $H_2O_2$ ) в цикле замораживания (оттаивания) негативно сказывается на функциональном статусе митохондрий, которые, как известно, являются основным источником энергии для сперматозоида, обеспечивающей работу кинетического аппарата сперматозоида и его общей подвижности. Были получены данные по индивидуальной изменчивости содержания пероксида водорода в сперматозоидах петухов в возрасте 61 недели в цикле замораживания (оттаивания), позволяющие вести отбор петухов по этому показателю.

**Ключевые слова:** петухи, криоконсервация, активные формы кислорода, пероксид водорода

**Для цитирования:** Курочкин А.А., Кузьмина Т.И., Станишевская О.И. Влияние внутриклеточного пероксида водорода на качественные показатели спермы петухов в цикле замораживания/оттаивания. *Аграрная наука*. 2024; 385(8): 132–138.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-385-8-132-138>

© Курочкин А.А., Кузьмина Т.И., Станишевская О.И.

## Intracellular hydrogen peroxide's effect on quality parameters of rooster sperm in freeze/thaw cycle

## ABSTRACT

**Relevance.** One of the factors decreasing total motility after cryopreservation rooster's sperm is influence of reactive oxygen species. Morphological and biochemical features of avian spermatozoa structure, which make them more susceptible to cryopreservation process compared to mammalian spermatozoa, may also be the reason why avian spermatozoa are more susceptible to oxidative stress.

**Methods.** The purpose of the study is to trace the change in the level of intracellular reactive oxygen species, in particular hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), during the cryopreservation of rooster sperm, to assess its effect on the quality and viability of sperm.

**Results.** A negative correlation ( $r = -0.68$ ,  $p < 0.05$ ) was found between the intracellular level of hydrogen peroxide and the number of dead cells in native sperm. In the frozen (thawed) seed, a weak relationship was observed between these indicators ( $r = -0.10$ ). There was a significant effect of the level of intracellular hydrogen peroxide in freshly obtained ejaculates on the overall mobility of frozen (thawed) semen ( $r = -0.65$ ,  $p < 0.05$ ). This allows us to assume that, similarly to mammalian spermatozoa, the production by cells of an increased amount of reactive oxygen species ( $H_2O_2$ ) in the freezing (thawing) cycle negatively affects the functional status of mitochondria, which, as is known, are the main source of energy for the sperm, ensuring the operation of the kinetic apparatus of the sperm and its general mobility. Data were obtained on the individual variability of the hydrogen peroxide content in the sperm of roosters at the age of 61 weeks in the freezing (thawing) cycle, allowing the selection of roosters according to this indicator.

**Key words:** roosters, cryopreservation, reactive oxygen species, hydrogen peroxide

**For citation:** Kurochkin A.A., Kuzmina T.I., Stanishevskaya O.I. Intracellular hydrogen peroxide's effect on quality parameters of rooster sperm in freeze/thaw cycle. *Agrarian science*. 2024; 385(8): 132–138 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-385-8-132-138>

© Kurochkin A.A., Kuzmina T.I., Stanishevskaya O.I.

## Введение/Introduction

Для сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц *in vitro* разработаны методики хранения спермы петухов и примордиальных зародышевых клеток в условиях сверхнизких температур. На данный момент самым распространенным методом является криоконсервация спермы [1].

Исследования в области замораживания сперматозоидов птиц в условиях сверхнизких температур начались более 70 лет назад [2], и за это время были разработаны и опробованы протоколы криоконсервации, отличающиеся скоростью фазового перехода семени от жидкого состояния к твердому, использованы криопротекторы проникающего и непроникающего типа действия, опробованы разбавители, отличающиеся компонентным составом [3–6].

На данный момент криоконсервация спермы петухов — единственный неинвазивный и наименее дорогой в реализации метод *in vitro*, доступный на сегодняшний день, позволяющий сохранять редкие генотипы птиц [7, 8].

Несмотря на многолетние исследования по разработке и модернизации протоколов криоконсервации спермы петухов, до сих пор не существует стандартизированной методики, обеспечивающей стабильные и высокие показатели фертильности [9, 10].

Основной проблемой криоконсервации спермы птиц по-прежнему остается низкая общая подвижность замороженных (оттаянных) сперматозоидов в сравнении с другими сельскохозяйственными животными [11].

Одной из причин снижения общей подвижности после криоконсервации спермы петухов может быть влияние повышенной концентрации образующихся активных форм кислорода. Известно, что супероксидный анион — радикал  $O_2^-$  — и пероксид водорода  $H_2O_2$  являются наиболее распространенными активными формами кислорода (АФК). В малых концентрациях они способствуют капацитации сперматозоидов [12, 13], гиперактивации и целостности акросом [14], в то время как высокие концентрации АФК увеличивают степень фрагментации ДНК [15, 16] и снижают общую подвижность сперматозоидов, что было показано в исследованиях, проведенных на семени человека, лошади и свиньи [17–20].

Морфологические и биохимические особенности строения сперматозоидов птиц, делающие их более восприимчивыми к процессу криоконсервации по сравнению со сперматозоидами млекопитающих [21], могут также являться причиной, по которой сперма птиц больше подвержена влиянию оксидативного стресса.

Согласно ряду исследований, липидный состав плазматической мембраны сперматозоидов имеет существенные отличия от состава мембран соматических клеток и содержит высокие концентрации эфирных липидов и стеролов [22, 23]. В отличие от сперматозоидов млекопитающих, в сперматозоидах птиц мало цитоплазматических антиоксидантов, а мембраны богаты полиненасыщенными жирными кислотами [24–26].

Данная особенность строения плазматической мембраны спермиев делает сперму птиц восприимчивой к свободнорадикальному окислению липидов [27], результатом процесса перекисного окисления липидов являются снижение текучести мембран, облегчение перехода молекул фосфолипидов из одного монослоя

мембран в другой, увеличение проницаемости мембран для различных субстанций ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  и т. д.), ковалентная модификация и изменение функциональной активности мембранных протеинов, рецепторов, энзимов и ионных каналов. Некоторые из продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот оказывают выраженное цитотоксическое действие<sup>1</sup>.

Антиоксидантная способность сперматозоидов низка, но ферментативные и неферментативные антиоксиданты семенной плазмы защищают сперму от окислительного стресса, нивелируя влияние свободных радикалов [28, 29]. Однако, когда концентрация АФК превышает возможности антиоксидантных систем клеток, свободные радикалы повреждают макромолекулы, такие как ДНК, белки и липиды, могут влиять на образование митохондриальной АТФ [30], что в конечном итоге приводит к снижению фертильности спермы [31, 32].

Сигналом для запуска данного типа реакции может служить некоторое изменение внутриклеточной среды, приводящее к смещению равновесия концентраций прооксидантных и антиоксидантных компонентов с последующей активацией процессов окисления. Одним из таких факторов является процесс криоконсервации. Цикл замораживания (оттаивания) напрямую влияет на выработку АФК [33].

**Цели исследования** — проследить изменение уровня внутриклеточных АФК, в частности пероксида водорода ( $H_2O_2$ ), в процессе криоконсервации спермы петухов, оценить его влияние на качественные показатели спермы петухов и жизнеспособность сперматозоидов.

## Материалы и методы исследования / Materials and methods

Исследование проводилось на базе ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», ВНИИГРЖ в 2022 году. Объектом исследования служили петухи (*Gallus gallus domesticus*), ( $\delta n = 10$ ) мясо-яичной породы царскосельская (селекция ВНИИГРЖ) в возрасте 61–63 недель.

Экспериментальное поголовье содержалось в одинаковых условиях, все особи находились в индивидуальных клетках. Кормление, поение и световой режим — в соответствии с возрастными нормами<sup>2</sup>, принятыми в ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», ВНИИГРЖ. Сперму собирали методом абдоминального массажа (Burrows and Quinn) [34] в пенициллиновые флаконы объемом 10 мл дважды в неделю в течение двух недель. К свежеполученным эякулятам добавляли разбавитель ЛКС-1<sup>3</sup> в соотношении 1:1 с целью дальнейшей криоконсервации.

Оценку качественных показателей спермы проводили для нативных эякулятов и криоконсервированного семени в лабораторных условиях с помощью программного обеспечения CASA (Computer-Assisted Semen Analysis; программное обеспечение Аргус-CASA, ООО «АргусСофт», Россия; микроскоп Motic® BA310E, Motic Instruments Inc., Канада).

Индивидуальные эякуляты разбавляли двухкомпонентным разбавителем<sup>4</sup> ВНИИГРЖ до соотношения 1:100 и помещали 10 мкл семени в камеру Маклера. Каждый эякулят был оценен по таким показателям, как общая подвижность, объем эякулята и концентрация сперматозоидов в двух повторностях. Концентрация

<sup>1</sup> Биохимия оксидативного стресса: Учебно-методическое пособие / Под ред. проф. А.В. Шестопалова. 2018.

<sup>2</sup> СОП-8. Содержание взрослого поголовья.

<sup>3</sup> Ленинградская криозащитная среда, разработка ВНИИГРЖ (авторское свидетельство № 1130339).

<sup>4</sup> Разработка ВНИИГРЖ. Санкт-Петербург. Патент № 2482816. 2013.

сперматозоидов определялась с помощью спектрофотометра Accuread Photometer (IMV Technologies, UK).

Эквилибрация разбавленного семени происходила в условиях  $t = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 40 мин. В качестве криопротектора использовали N, N-диметилацетамид (DMA) производства Sigma (Aldrich, США). Добавление DMA осуществлялось после эквилибрации эякулятов 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<sup>5</sup> по методике, разработанной Л.Е. Нарубиной, А.Д. Курбатова и др.

Семя набирали в капиллярную пипетку и накапывали в жидкий азот с расстояния 7,5 см от поверхности ( $-41,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Контроль положения пипетки осуществлялся с помощью термопары (Temperature measuring instrument THERM 2420, Ahlborn, Германия). Скорость раскапывания составляла ~1,4 гранулы в секунду. Размораживание гранул производили на нагретой металлической пластине<sup>6</sup> ( $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Анализ образцов спермы петухов 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.

Зеленую флуоресценцию регистрировали с помощью полосового фильтра FITC длиной волны 525/40 нм, красную флуоресценцию — с помощью полосового фильтра PE длиной волны 585/42 нм.

Для анализа данных, полученных на проточном цитофлуориметре, использовали программное обеспечение CytExpert, Version 2.4.0.28 (Beckman Coulter Inc., США).

Соотношение клеток, содержащих повышенный уровень внутриклеточного пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), анализировали методом проточной цитометрии. Для детектирования данного соединения использовали флуорохром — 2,7-дихлорфлуоресцеина диацетат (DCFH-DA) производства Sigma (Aldrich, США). Этот краситель при связывании с  $\text{H}_2\text{O}_2$  и возбуждении соединения длиной волны 492–495 нм испускает флуоресценцию зеленого цвета.

Образцы семени были разбавлены до концентрации  $30 \times 10^6$  сперматозоидов на 1 мл. Суспензию клеток дважды промывали двухкомпонентным разбавителем для спермы петухов ВНИИГРЖ (патент № 2482816, 2013 г.) при 1200 об/мин в течение 7 мин. После к образцам спермы добавляли 20 мкл DCFH-DA (конечная концентрация — 5 мкМ/мл) и помещали в термостат на 30 мин. ( $t = 39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Спустя 30 мин. производилась двойная отмычка образцов от остатков флуорохрома (1200 об/мин в течение 7 мин.) (рис. 2) [35].

При оценке уровня флуоресценции на проточном цитофлуориметре выделяли две популяции клеток — с высоким содержанием  $\text{H}_2\text{O}_2$  и с низким содержанием  $\text{H}_2\text{O}_2$  (рис. 2). Часть суспензии клеток, предназначенной для исследования на проточном цитофлуориметре, использовали для приготовления цитологических препаратов. Цель данной манипуляции — визуализация

корректности работы флуорохрома на сперматозоидах петухов.

Использовался микроскоп с флуоресценцией Axio Imager A1, увеличение —  $\times 1000$  (Carl Zeiss Microscopy, Germany).

Вышеописанный протокол детекции внутриклеточного  $\text{H}_2\text{O}_2$  использовался как для образцов свежеполученных эякулятов, так и для образцов замороженного (оттаянного) семени.

Популяции живых и мертвых клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием флуорохрома — пропидия йодид (PI) — производства Sigma (Aldrich, США). PI не проникает в живые и апоптотические клетки, но окрашивает мертвые клетки, связываясь с нуклеиновыми кислотами. Максимум возбуждения данного флуорохрома наблюдается при длине волны 535 нм.

Образцы спермы были разбавлены до концентрации  $30 \times 10^6$  сперматозоидов на 1 мл. Суспензию клеток дважды промывали двухкомпонентным разбавителем для спермы петухов ВНИИГРЖ<sup>7</sup> при 1200 об/мин в течение 7 мин. После к образцам спермы добавляли 2 мкл PI (конечная концентрация — 5 мкг/мл) (рис. 1) [36].

Вышеописанный протокол окраски красителем PI использовался как для образцов свежеполученных эякулятов, так и для образцов замороженного (оттаянного) семени.

Статистический анализ данных включал в себя расчет средних значений, стандартной ошибки средней и коэффициента изменчивости. Оценку значимости различий между массивами данных проводили при помощи t-критерия Стьюдента.

Для определения взаимосвязи между массивами данных рассчитывался ранговый коэффициент Спирмена. Различия считались достоверными при уровне 95% ( $p < 0,05$ ). Анализ осуществляли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2013 (США).

## Результаты и обсуждение / Results and discussion

Общая подвижность сперматозоидов в свежеполученных эякулятах петухов ( $\bar{\delta}n = 10$ ) находилась в пределах от 85 до 90%. Объем эякулята в среднем составил  $0,65 \pm 0,05$  мл, средняя концентрация сперматозоидов —  $3,566 \pm 0,305$  млрд/мл (табл. 1).

Подвижность замороженного (оттаянного) семени находилась в пределах от 22,50 до 52,50%. Качественные показатели нативных эякулятов имели минимальные отличия и находились на высоком уровне, отвечая требованиям нормативных документов<sup>8</sup>.

Анализ показателей жизнеспособности сперматозоидов в индивидуальных эякулятах, оцененной с использованием флуорохрома PI, показал незначительные различия между особями в нативной сперме — от 15,24 до 20,84% мертвых клеток, в замороженном (оттаянном) семени различия были более выраженными и находились в пределах от 26,85 до 39,87% мертвых клеток от общей популяции. Среднее увеличение доли мертвых клеток в образцах семени после криоконсервации — 13,49%.

Точечные графики, построенные из данных, полученных на проточном цитофлуориметре Cytotflex (Beckman Coulter, Inc.), отображают данные различия на примере индивидуальных эякулятов (табл. 2, рис. 1).

<sup>5</sup> Нарубина Л.Е., Курбатов А.Д., Бубляева Г.Б., Целютин К.В. Способ криоконсервации спермы петухов в виде гранул. АС № 1343587, СССР. 1987.

<sup>6</sup> Разработка ВНИИГРЖ. Санкт-Петербург. 1989.

<sup>7</sup> Разработка ВНИИГРЖ. Санкт-Петербург. Патент РФ № 2482816. Среда для разбавления спермы сельскохозяйственных птиц. 2013.

<sup>8</sup> ГОСТ 27267-2017 Средства воспроизводства. Сперма петухов и индюков неразбавленная свежеполученная. Технические условия.

Таблица 1. Качественные показатели нативной спермы и замороженного (оттаянного) семени петухов породы царскосельская ( $\delta n = 10, M \pm SEM, CV$ )

Table 1. Qualitative indicators of native sperm and frozen (thawed) semen of Tsarskoye Selo breed roosters ( $\delta n = 10, M \pm SEM, CV$ )

№ петуха	Объем эякулята, мл	Общая подвижность нативной спермы, %	Концентрация спермы, млрд/мл	Общая подвижность з/о семени, %
1	0,55±0,05	87,50±2,50	3,055±0,402	30,00±0
2	0,65±0,25	85,00±0	2,667±0,070	45,00±5,00
3	0,75±0,05	87,50±2,50	3,145±0,155	42,50±2,50
4	0,55±0,05	87,50±2,50	4,945±0,048	42,50±2,50
5	0,75±0,05	90,0±0	5,270±0,453	35,00±5,00
6	0,90±0,10	87,50±2,50	2,522±0,138	42,50±2,50
7	0,50±0,10	87,50±2,50	4,060±0,753	47,50±2,50
8	0,80±0,10	90,0±0	4,073±0,573	52,50±2,50
9	0,35±0,05	85,00±0	3,030±0,367	22,50±2,50
10	0,65±0,15	87,50±2,50	2,893±0,663	27,50±7,50
Среднее значение	0,65±0,05	87,50±0,50	3,566±0,305	38,80±3,00
CV, %	25,17	1,90	27,07	24,75

Стоит отметить, что полученные данные согласуются с опытами зарубежных исследователей, которые использовали двойную окраску SYBR-14/PI и готовые коммерческие киты для определения апоптоза (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (APOAF-50TST, Sigma, St. Louis, MO, USA) [31, 36, 37], что говорит о возможности более простой оценки жизнеспособности сперматозоидов петухов посредством использования одного флуорохрома — PI.

Анализ содержания внутриклеточного пероксида водорода в индивидуальных эякулятах показал, что в нативной сперме средний процент клеток с высоким содержанием  $H_2O_2$  составлял от 38,77 до 71,71%, в замороженной (оттаянной) сперме диапазон значений был меньше и составил от 62,13 до 81,09% (табл. 2, рис. 2).

Популяция клеток с высоким содержанием внутриклеточного пероксида водорода в нативных эякулятах в среднем составила 55,25%, в замороженном (оттаянном) семени доля клеток увеличилась и составила уже 71,34%.

Стоит отметить, что достоверной прямолинейной взаимосвязи между содержанием внутриклеточного  $H_2O_2$  и жизнеспособностью сперматозоидов, как в

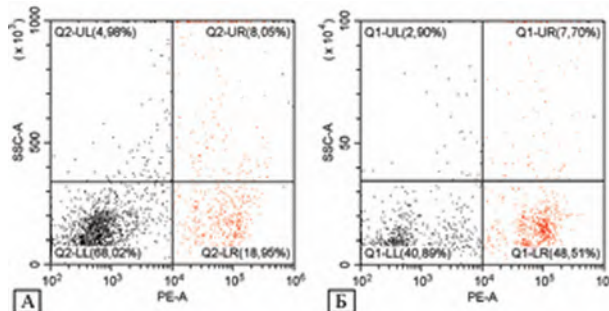
Таблица 2. Изменение содержания внутриклеточного пероксида водорода и доли мертвых клеток в цикле замораживания (оттаивания) ( $\delta n = 10, M \pm SEM, CV$ )

Table 2. Changes in the content of intracellular hydrogen peroxide and the proportion of dead cells in the freezing (thawing) cycle ( $\delta n = 10, M \pm SEM, CV$ )

№ петуха	Нативная сперма		Замороженное (оттаянное) семя	
	доля клеток с высоким содержанием внутриклеточного $H_2O_2$ , %	доля мертвых клеток, %	доля клеток с высоким содержанием внутриклеточного $H_2O_2$ , %	доля мертвых клеток, %
1	71,71	15,37	67,26	26,85
2	50,91	18,67	63,56	39,87
3	60,44	16,51	62,13	28,05
4	62,61	12,27	81,09	32,65
5	65,63	15,24	77,93	32,07
6	46,61	19,70	67,91	26,99
7	49,56	19,45	77,43	27,10
8	38,77	19,83	63,68	30,87
9	57,71	20,84	75,53	28,11
10	48,57	17,33	70,29	37,54
Среднее значение	55,25	17,52	71,34	31,01
CV, %	18,18	15,29	8,73	14,85

рис. 1. Соотношение живых и мертвых сперматозоидов, индивидуальный эякулят. Точечные графики по боковому светорассеиванию (side scatter, SSC-A) и интенсивности красной флуоресценции (PE-A): А — нативная сперма, Б — замороженное (оттаянное) семя. Левые нижние квадранты (Q2-LL, Q1-LL) — живые клетки, правые нижние квадранты (Q2-LR, Q2-LL) — мертвые

Fig. 1. The ratio of live and dead sperm, individual ejaculate. Dot graphs for lateral light scattering (side scatter, SSC-A) and red fluorescence intensity (PE-A): A — native sperm, B — frozen (thawed) seed. The lower left quadrants (Q2-LL, Q1-LL) are living cells, the lower right quadrants (Q2-LR, Q2-LL) are dead



нативной сперме, так и в замороженном (оттаянном) семени, не было выявлено (рис. 2).

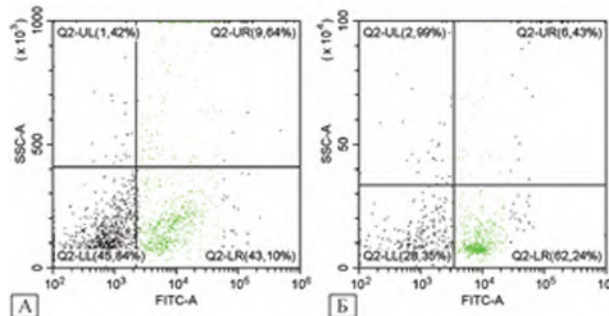
Коэффициент корреляции между уровнем внутриклеточного  $H_2O_2$  в нативной сперме и общей подвижности замороженного (оттаянного) семени составил -0.65 ( $p < 0,05$ ).

Установлено, что в случае нарушения перекисного гомеостаза именно митохондриальная ДНК (мтДНК) подвергается окислительному воздействию АФК в большей степени, чем ядерная, ввиду топологической близости к источникам генерации АФК и не обладает защитой, которую обеспечивают белки гистоны.

В ходе взаимодействия  $H_2O_2$ , продуцируемой в дыхательной цепи с ионами  $Fe_2^+$  и  $Cu_2^+$  (локализованными в митохондриальных мембранах), образуется гидроксид-радикал, ответственный за повреждения мтДНК [38–40]. Несмотря на то что в данном исследовании не оценивался функциональный статус митохондрий, при исследовании цитологических препаратов замороженных (оттаянных) сперматозоидов петухов, окрашенных DCFH-DA, наблюдалась флуоресценция, которая исходила из средней части сперматозоида — области, где расположены митохондрии, которые являются основным источником АФК в сперматозоидах (рис. 3).

рис. 2. Содержание пероксида водорода в сперматозоидах, индивидуальный эякулят. Точечные графики по боковому светорассеиванию (side scatter, SSC-A) и интенсивности зеленой флуоресценции (FITC-A): А — нативная сперма, Б — замороженное (оттаянное) семя. Левые нижние квадранты (Q2-LL) — клетки с низким содержанием  $H_2O_2$ , правые нижние (Q2-LR) — клетки с высоким содержанием  $H_2O_2$

Fig. 2. The content of hydrogen peroxide in spermatozoa, individual ejaculate. Dot graphs for lateral light scattering (side scatter, SSC-A) and green fluorescence intensity (FITC-A): A — native sperm, B — frozen (thawed) seed. The lower left quadrants (Q2-LL) are cells with a low content of  $H_2O_2$ , the lower right (Q2-LR) are cells with a high content of  $H_2O_2$



Согласно литературным данным, криоконсервация способна привести к нарушению или даже полному прерыванию митохондриальной дыхательной цепи. Это прерывание провоцирует восстановление кислорода с образованием вместо молекул воды промежуточных молекул, таких как анион супероксида, гидроксильный радикал и пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [41].

Полученные данные частично согласуются с исследованиями других авторов. Так, при исследовании ингибирующего действия АФК на различные показатели спермы млекопитающих (человека, быка, хряка и жеребца) были получены данные, свидетельствующие о том, что действие пероксида водорода не находится в прямой зависимости от видимых повреждений акросомы, нарушений структуры ДНК, целостности плазматической мембраны и функционального статуса митохондрий [17–20, 42]. Достоверно показано только ингибирующее действие пероксида водорода на показатели общей подвижности сперматозоидов и фертильности после цикла замораживания (оттаивания) [32, 33].

При анализе полученных данных наблюдали аналогичную взаимосвязь между уровнем внутриклеточного пероксида водорода и общей подвижностью замороженного (оттаянного) семени.

У петухов с высоким уровнем (>55,25%, Мср.) внутриклеточного пероксида водорода в свежеполученных эякулятах общая подвижность замороженного (оттаянного) семени была ниже в среднем на 24,6%, что говорит о непосредственном влиянии свободных радикалов на криорезистентность спермы (рис. 4.).

Коэффициент изменчивости содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в нативной сперме составил 18,18%, в замороженном (оттаянном) семени — 8,73%.

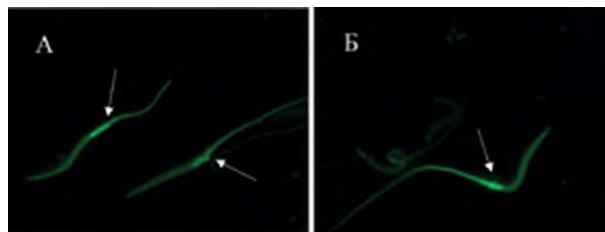
### Выводы/Conclusions

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать предположение, что продуцирование клетками повышенного количества активных форм кислорода, в частности пероксида водорода, в цикле замораживания (оттаивания) негативно сказывается на функциональном статусе митохондрий, которые являются основным источником энергии для сперматозоида, обеспечивающей работу кинетического аппарата сперматозоида и его общей подвижности.

Несмотря на увеличение уровня внутриклеточного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в процессе криоконсервации, определяющим значением для прогнозирования общей подвижности замороженного (оттаянного) семени является уровень АФК в клетках нативной спермы.

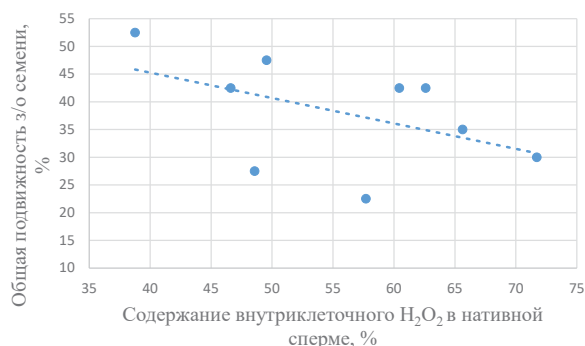
**Рис. 3.** Препараты сперматозоидов петухов, окрашенные DCFH-DA: А — нативная сперма, Б — замороженное (оттаянное) семя, флуоресцентная микроскопия Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy, Germany), увеличение x1000. Стрелками указаны зоны наибольшей флуоресценции

**Fig. 3.** Rooster sperm preparations stained with DCFH-DA: А — native sperm, Б — frozen (thawed) semen, fluorescence microscopy Axio Imager A1 (Carl Zeiss Microscopy, Germany), magnification x1000. The arrows indicate the areas of greatest fluorescence



**Рис. 4.** Взаимосвязь между содержанием внутриклеточного пероксида водорода в нативной сперме и показателями общей подвижности замороженного (оттаянного) семени (♂n = 10)

**Fig. 4.** The relationship between the content of intracellular hydrogen peroxide in native sperm and the overall motility of frozen (thawed) semen (♂n = 10)



Полученные данные показывают достоверное влияние уровня внутриклеточного пероксида водорода в свежеполученных эякулятах на общую подвижность замороженного (оттаянного) семени ( $r = -0,65, p < 0,05$ ).

Впервые получены данные по индивидуальной изменчивости содержания пероксида водорода в сперматозоидах петухов комбинированного направления продуктивности возраста 61 недели в цикле замораживания (оттаивания).

Коэффициент изменчивости внутриклеточного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в свежеполученных эякулятах составил 18,18%, что говорит о возможности отбора петухов по данному показателю с целью выявления особей с потенциально высокими показателями криорезистентности.

Данная информация может быть использована для возможной корректировки рациона петухов за счет введения кормовых антиоксидантов.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные. Все авторы внесли равный вклад в работу. Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data. All authors made an equal contribution to the work. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования выполнены за счет госзадания № НИОКТР 124020200127-7.

### FUNDING

The research was carried out at the expense of the state task of research, development and technological works No. 124020200127-7.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Blesbois E. *et al.* Semen Cryopreservation for Ex Situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*. 2007; 86(3): 555–564. <https://doi.org/10.1093/ps/86.3.555>
- Shaffner C.S., Henderson E.W., Card C.G. Viability of Spermatozoa of the Chicken Under Various Environmental Conditions. *Poultry Science*. 1941; 20(3): 259–265. <https://doi.org/10.3382/ps.0200259>

### REFERENCES

- Blesbois E. *et al.* Semen Cryopreservation for Ex Situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*. 2007; 86(3): 555–564. <https://doi.org/10.1093/ps/86.3.555>
- Shaffner C.S., Henderson E.W., Card C.G. Viability of Spermatozoa of the Chicken Under Various Environmental Conditions. *Poultry Science*. 1941; 20(3): 259–265. <https://doi.org/10.3382/ps.0200259>

3. Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B. Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*. 1995; 36(5): 805–811. <https://doi.org/10.1080/00071669508417825>
4. Chalah T., Seigneurin F., Blesbois E., Brillard J.P. *In vitro* Comparison of Fowl Sperm Viability in Ejaculates Frozen by Three Different Techniques and Relationship with Subsequent Fertility *in Vivo*. *Cryobiology*. 1999; 39(2): 185–191. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2201>
5. Новгородова И.П., Жилинский М.А., Волкова Н.А., Багиров В.А., Зиновьева Н.А. Криоконсервация семени петухов: основные принципы и методические подходы. *Птицеводство*. 2016; 8: 2–7. <https://elibrary.ru/wicjpn>
6. Силукова Ю.Л., Станишевская О.И., Пleshанов Н.В., Курочкин А.А. Эффективность использования комбинаций сахаридов в средах для криоконсервации спермы петухов. *Сельскохозяйственная биология*. 2020; 55(6): 1148–1158. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.6.1148rus>
7. Thélie A., Bailliard A., Seigneurin F., Zerjal T., Tixier-Boichard M., Blesbois E. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poultry Science*. 2018; 98(1): 447–455. <https://doi.org/10.3382/ps/pey360>
8. Ehling C., Taylor U., Baulain U., Weigend S., Henning M., Rath D. Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Landbauforschung*. 2012; 62(3): 151–158.
9. Long J.A., Kulkarni G. An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Science*. 2004; 83(9): 1594–1601. <https://doi.org/10.1093/ps/83.9.1594>
10. Santiago-Moreno J. *et al.* Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. *Cryobiology*. 2012; 65(3): 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.06.008>
11. Long J.A. Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science*. 2006; 85(2): 232–236. <https://doi.org/10.1093/ps/85.2.232>
12. Aitken R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*. 2017; 84(10): 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>
13. Ford W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 2004; 10(5): 387–399. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh034>
14. Pons-Rejraji H., Sion B., Saez F., Brugnol F., Janny L., Grizard G. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et fertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2009; 37(6): 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2009.04.015>
15. Baumber J., Ball B.A., Linfor J.J., Meyers S.A. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2003; 24(4): 621–628. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x>
16. Hamilton T.R.d.S. *et al.* Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. *Reproduction*. 2016; 151(4): 379–390. <https://doi.org/10.1530/rep-15-0403>
17. Armstrong J.S., Rajasekaran M., Chamulitrat W., Gatti P., Hellstrom W.J., Sikka S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 26(7–8): 869–880. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00275-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00275-5)
18. Bilodeau J.-F., Blanchette S., Cormier N., Sirard M.-A. Reactive oxygen species mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*. 2002; 57(3): 1105–1122. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00702-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00702-6)
19. Guthrie H.D., Welch G.R., Long J.A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology*. 2008; 70(8): 1209–1215. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.017>
20. Baumber J., Ball B.A., Gravance C.G., Medina V., Davies-Morel M.C.G. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. *Journal of Andrology*. 2000; 21(6): 895–902. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x>
21. Parks J.E., Lynch D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 1992; 29(2): 255–266. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-v](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-v)
22. Long J.A. Applied andrology in chickens and turkeys. Chenoweth P., Lorton S. (eds.). *Animal Andrology: Theories and Applications*. Boston, MA, USA: CABI. 2014; 197–225. <https://doi.org/10.1079/9781780643168.0197>
23. Surai P.F., Fujihara N., Speake B.K., Brillard J.-P., Wishart G.J., Sparks N.H.C. Polyunsaturated Fatty Acids, Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection in Avian Semen - Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2001; 14(7): 1024–1050. <https://doi.org/10.5713/ajas.2001.1024>
24. Mehaisen G.M.K., Partyka A., Ligocka Z., Nizański W. Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2019; 212: 106238. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106238>
25. Moghbeli M. *et al.* Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? *Cryobiology*. 2016; 72(3): 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.008>
26. Surai P.F., Cerolini S., Wishart G.J., Speake B.K., Noble R.C., Sparks N.H.C. Lipid and Antioxidant Composition of Chicken Semen and its Susceptibility to Peroxidation. *Avian and Poultry Biology Reviews*. 1998; 9(1): 11–23.
27. Khan R.U. Antioxidant and poultry semen quality. *World's Poultry Science Journal*. 2011; 67(2): 297–308. <https://doi.org/10.1017/S0043933911000316>
3. Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B. Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*. 1995; 36(5): 805–811. <https://doi.org/10.1080/00071669508417825>
4. Chalah T., Seigneurin F., Blesbois E., Brillard J.P. *In vitro* Comparison of Fowl Sperm Viability in Ejaculates Frozen by Three Different Techniques and Relationship with Subsequent Fertility *in Vivo*. *Cryobiology*. 1999; 39(2): 185–191. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2201>
5. Novgorodova I.P., Zhilinsky M.A., Volkova N.A., Bagirov V.A., Zinov'yeva N.A. Cryoconservation of Cockerels' Semen: The Basic Principles and Methodical Approaches. *Ptitsvodstvo*. 2016; 8: 2–7 (in Russian). <https://elibrary.ru/wicjpn>
6. Silyukova Yu.L., Stanishevskaya O.I., Pleshanov N.V., Kurochkin A.A. Efficiency of using a combination of mono- and disac-charides in a diluent for freezing rooster semen. *Agricultural Biology*. 2020; 55(6): 1148–1158. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.6.1148eng>
7. Thélie A., Bailliard A., Seigneurin F., Zerjal T., Tixier-Boichard M., Blesbois E. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poultry Science*. 2018; 98(1): 447–455. <https://doi.org/10.3382/ps/pey360>
8. Ehling C., Taylor U., Baulain U., Weigend S., Henning M., Rath D. Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Applied agricultural and forestry research*. 2012; 62(3): 151–158.
9. Long J.A., Kulkarni G. An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Science*. 2004; 83(9): 1594–1601. <https://doi.org/10.1093/ps/83.9.1594>
10. Santiago-Moreno J. *et al.* Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. *Cryobiology*. 2012; 65(3): 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.06.008>
11. Long J.A. Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science*. 2006; 85(2): 232–236. <https://doi.org/10.1093/ps/85.2.232>
12. Aitken R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*. 2017; 84(10): 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>
13. Ford W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 2004; 10(5): 387–399. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh034>
14. Pons-Rejraji H., Sion B., Saez F., Brugnol F., Janny L., Grizard G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2009; 37(6): 529–535 (in French). <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2009.04.015>
15. Baumber J., Ball B.A., Linfor J.J., Meyers S.A. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2003; 24(4): 621–628. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x>
16. Hamilton T.R.d.S. *et al.* Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. *Reproduction*. 2016; 151(4): 379–390. <https://doi.org/10.1530/rep-15-0403>
17. Armstrong J.S., Rajasekaran M., Chamulitrat W., Gatti P., Hellstrom W.J., Sikka S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 26(7–8): 869–880. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00275-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00275-5)
18. Bilodeau J.-F., Blanchette S., Cormier N., Sirard M.-A. Reactive oxygen species mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*. 2002; 57(3): 1105–1122. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00702-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00702-6)
19. Guthrie H.D., Welch G.R., Long J.A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology*. 2008; 70(8): 1209–1215. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.017>
20. Baumber J., Ball B.A., Gravance C.G., Medina V., Davies-Morel M.C.G. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. *Journal of Andrology*. 2000; 21(6): 895–902. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x>
21. Parks J.E., Lynch D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 1992; 29(2): 255–266. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-v](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-v)
22. Long J.A. Applied andrology in chickens and turkeys. Chenoweth P., Lorton S. (eds.). *Animal Andrology: Theories and Applications*. Boston, MA, USA: CABI. 2014; 197–225. <https://doi.org/10.1079/9781780643168.0197>
23. Surai P.F., Fujihara N., Speake B.K., Brillard J.-P., Wishart G.J., Sparks N.H.C. Polyunsaturated Fatty Acids, Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection in Avian Semen - Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2001; 14(7): 1024–1050. <https://doi.org/10.5713/ajas.2001.1024>
24. Mehaisen G.M.K., Partyka A., Ligocka Z., Nizański W. Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2019; 212: 106238. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106238>
25. Moghbeli M. *et al.* Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration? *Cryobiology*. 2016; 72(3): 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.008>
26. Surai P.F., Cerolini S., Wishart G.J., Speake B.K., Noble R.C., Sparks N.H.C. Lipid and Antioxidant Composition of Chicken Semen and its Susceptibility to Peroxidation. *Avian and Poultry Biology Reviews*. 1998; 9(1): 11–23.
27. Khan R.U. Antioxidant and poultry semen quality. *World's Poultry Science Journal*. 2011; 67(2): 297–308. <https://doi.org/10.1017/S0043933911000316>

28. Zhao X., Yang Z.B., Yang W.R., Wang Y., Jiang S.Z., Zhang G.G. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) on laying performance and antioxidant status of laying hens and on dietary oxidation stability. *Poultry Science*. 2011; 90(8): 1720–1727. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01280>
29. Khan R.U., Rahman Z.-u., Javed I., Muhammad F. Effect of vitamins, probiotics and protein on semen traits in post-molt male broiler breeders. *Animal Reproduction Science*. 2012; 135(1–4): 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.09.005>
30. Sikka S.C. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Current Medicinal Chemistry*. 2001; 8(7): 851–862. <https://doi.org/10.2174/0929867013373039>
31. Salehi M., Mahdavi A.H., Sharafi M., Shahverdi A. Cryopreservation of rooster semen: Evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm. *Theriogenology*. 2019; 142: 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.030>
32. Rui B.R. *et al.* Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. *Theriogenology*. 2017; 90: 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.001>
33. Amini M.R., Kohram H., Zare-Shahaneh A., Zhandi M., Sharideh H., Nabi M.M. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology*. 2015; 70(3): 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.001>
34. Burrows W.H., Quinn J.P. The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poultry Science*. 1937; 16(1): 19–24. <https://doi.org/10.3382/ps.0160019>
35. Dikalov S.I., Harrison D.G. Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014; 20(2): 372–382. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4886>
36. Partyka A., Nizański W., Łukaszewicz E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*. 2010; 74(6): 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.032>
37. Bernal B. *et al.* Birchen and Blue Leonesa sperm cryopreservation: a new technique for evaluating the integrity of cockerel sperm membranes. *British Poultry Science*. 2022; 63(2): 244–251. <https://doi.org/10.1080/00071668.2021.1955333>
38. Richter C., Park J.W., Ames B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988; 85(17): 6465–6467. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>
39. Liang Q., Dedon P.C. Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced DNA Damage Is Enhanced by Packaging of DNA as a Nucleosome. *Chemical Research in Toxicology*. 2001; 14(4): 416–422. <https://doi.org/10.1021/tx0002278>
40. Núñez M.E., Noyes K.T., Barton J.K. Oxidative Charge Transport through DNA in Nucleosome Core Particles. *Cell Chemical Biology*. 2002; 9(4): 403–415. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(02\)00121-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(02)00121-7)
41. Córdova Izquierdo A. *et al.* Effect of Oxidative Stress on Sperm Cells. Bagatini M.D. (ed.). *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease*. *IntechOpen*. 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88499>
42. Amaral A., Lourenço B., Marques M., Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 2013; 146(5): R163–R174. <https://doi.org/10.1530/rep-13-0178>
28. Zhao X., Yang Z.B., Yang W.R., Wang Y., Jiang S.Z., Zhang G.G. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) on laying performance and antioxidant status of laying hens and on dietary oxidation stability. *Poultry Science*. 2011; 90(8): 1720–1727. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01280>
29. Khan R.U., Rahman Z.-u., Javed I., Muhammad F. Effect of vitamins, probiotics and protein on semen traits in post-molt male broiler breeders. *Animal Reproduction Science*. 2012; 135(1–4): 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.09.005>
30. Sikka S.C. Relative Impact of Oxidative Stress on Male Reproductive Function. *Current Medicinal Chemistry*. 2001; 8(7): 851–862. <https://doi.org/10.2174/0929867013373039>
31. Salehi M., Mahdavi A.H., Sharafi M., Shahverdi A. Cryopreservation of rooster semen: Evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm. *Theriogenology*. 2019; 142: 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.030>
32. Rui B.R. *et al.* Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. *Theriogenology*. 2017; 90: 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.001>
33. Amini M.R., Kohram H., Zare-Shahaneh A., Zhandi M., Sharideh H., Nabi M.M. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology*. 2015; 70(3): 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.001>
34. Burrows W.H., Quinn J.P. The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poultry Science*. 1937; 16(1): 19–24. <https://doi.org/10.3382/ps.0160019>
35. Dikalov S.I., Harrison D.G. Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014; 20(2): 372–382. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4886>
36. Partyka A., Nizański W., Łukaszewicz E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*. 2010; 74(6): 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.032>
37. Bernal B. *et al.* Birchen and Blue Leonesa sperm cryopreservation: a new technique for evaluating the integrity of cockerel sperm membranes. *British Poultry Science*. 2022; 63(2): 244–251. <https://doi.org/10.1080/00071668.2021.1955333>
38. Richter C., Park J.W., Ames B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988; 85(17): 6465–6467. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>
39. Liang Q., Dedon P.C. Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced DNA Damage Is Enhanced by Packaging of DNA as a Nucleosome. *Chemical Research in Toxicology*. 2001; 14(4): 416–422. <https://doi.org/10.1021/tx0002278>
40. Núñez M.E., Noyes K.T., Barton J.K. Oxidative Charge Transport through DNA in Nucleosome Core Particles. *Cell Chemical Biology*. 2002; 9(4): 403–415. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(02\)00121-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(02)00121-7)
41. Córdova Izquierdo A. *et al.* Effect of Oxidative Stress on Sperm Cells. Bagatini M.D. (ed.). *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease*. *IntechOpen*. 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88499>
42. Amaral A., Lourenço B., Marques M., Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 2013; 146(5): R163–R174. <https://doi.org/10.1530/rep-13-0178>

#### ОБ АВТОРАХ

##### Антон Алексеевич Курочкин

младший научный сотрудник  
kurochkin.anton.66@gmail.com

##### Татьяна Ивановна Кузьмина

главный научный сотрудник, профессор,  
доктор биологических наук  
prof.kouzmina@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4218-6080>

##### Ольга Игоревна Станишевская

главный научный сотрудник, доктор биологических наук  
olgastan@list.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-9504-3916>

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального исследовательского центра животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московское шоссе, 55А, пос. Тярлево, Пушкин, Санкт-Петербург, 196625, Россия

#### ABOUT THE AUTHORS

##### Anton Alekseevich Kurochkin

Junior Research Assistant  
kurochkin.anton.66@gmail.com

##### Tatyana Ivanovna Kuzmina

Chief Researcher, Professor, Doctor of Biological Sciences  
prof.kouzmina@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4218-6080>

##### Olga Igorevna Stanishevskaya

Chief Researcher, Doctor of Biological Sciences  
olgastan@list.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-9504-3916>

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 55A Moskovskoe shosse, Tyarlevo village, Pushkin, St. Petersburg, 196625, Russia