

УДК 636.082.12

Научная статья



Открытый доступ

DOI: 10.32634/0869-8155-2025-395-06-81-86

**О.Ю. Баркова** ✉  
**Д.А. Старикова**  
**И.В. Чистякова**  
**Н.В. Плешанов**  
**А.В. Габова**

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

✉ [barkoffws@list.ru](mailto:barkoffws@list.ru)

Поступила в редакцию: 20.02.2024  
 Одобрена после рецензирования: 08.05.2025  
 Принята к публикации: 22.05.2025

© Баркова О.Ю., Старикова Д.А., Чистякова И.В., Плешанов Н.В., Габова А.В.

Research article



Open access

DOI: 10.32634/0869-8155-2025-395-06-81-86

**Olga Yu. Barkova** ✉  
**Daria A. Starikova**  
**Irena V. Chistyakova**  
**Nikolay V. Pleshanov**  
**Alina V. Gabova**

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

✉ [barkoffws@list.ru](mailto:barkoffws@list.ru)

Received by the editorial office: 20.02.2024  
 Accepted in revised: 08.05.2025  
 Accepted for publication: 22.05.2025

© Barkova O.Yu., Starikova D.A., Chistyakova I.V., Pleshanov N.V., Gabova A.V.

## Транскрипты генов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* как потенциальные биомаркеры качества спермы быков

### РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Цель исследований данной работы заключается в валидации транскриптов генов-кандидатов сперматозоидов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12*, полученных с помощью РНК-Seq и корреляционного анализа их уровня экспрессии с высокими и низкими показателями качества сперматозоидов быков голштинской породы.

**Методы.** Исследованы 18 проб эякулята криоконсервированной спермы. Проведены анализ относительной экспрессии генов-кандидатов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* и анализ ранговой корреляции при помощи критерия Спирмена.

**Результаты.** Результаты исследования показали, что относительная экспрессия исследуемых генов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* была преимущественно ниже в сперматозоидах, имеющих низкую продуктивность, что подтверждают результаты полного транскриптомного анализа, где также пониженная дифференциальная экспрессия наблюдалась в группе быков с плохой продуктивностью. Статистически достоверные различия уровней экспрессии тотальной РНК сперматозоидов изучаемых генов были получены для всех генов в обеих группах быков. Анализ корреляции выявил высокую зависимость между уровнем экспрессии исследуемых генов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* и значимыми показателями качества спермы. Транскрипты генов *COL4A2*, *IRG1* показали высокую достоверную отрицательную корреляцию с подвижностью сперматозоидов, содержанием живых и нормальных клеток и средним содержанием  $Ca_2^+$ . Достоверная положительная корреляция наблюдалась для нежелательных признаков, таких как содержание мертвых и дефектных клеток. Транскрипт гена *MMP12* имел противоположный эффект в сравнении с генами *IRG1* и *COL4A2*. Уровень экспрессии гена *MMP12* показал достоверно высокую корреляцию с подвижностью сперматозоидов и отрицательную — с содержанием мертвых и дефектных клеток.

**Ключевые слова:** быки, сперматозоиды, криоконсервация, РНК-Seq, экспрессия генов, биомаркеры

**Для цитирования:** Баркова О.Ю., Старикова Д.А., Чистякова И.В., Плешанов Н.В., Габова А.В. Транскрипты генов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* как потенциальные биомаркеры качества спермы быков. *Аграрная наука*. 2025; 395(06): 81–86.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-395-06-81-86>

## Transcripts of *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* genes as potential biomarkers of bull sperm quality

### ABSTRACT

**Relevance.** The aim of this work is to validate three sperm transcripts of candidate genes *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* obtained using RNA-Seq and correlation analysis of their expression levels with high and low sperm quality indicators of Holstein bulls.

**Methods.** Eighteen samples of cryopreserved sperm ejaculate were studied. The relative expression of candidate genes *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* was analyzed, and rank correlation was analyzed using Spearman's test.

**Results.** The results of the study showed that the relative expression of the studied genes *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* was predominantly lower in spermatozoa with low productivity, which confirms the results of a complete transcriptome analysis, where reduced differential expression was also observed in the group of bulls with poor productivity. Statistically significant differences in the levels of expression of total sperm RNA of the studied genes were obtained for all genes in both groups of bulls. Correlation analysis revealed a high dependence between the expression level of the studied genes *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* and significant indicators of sperm quality. Transcripts of the genes *COL4A2*, *IRG1* showed a high significant negative correlation with sperm motility, the content of live and normal cells and the average  $Ca_2^+$  content. A significant positive correlation was observed for undesirable traits, such as the content of dead and defective cells. The gene *MMP12* transcript had the opposite effect in comparison with the genes *IRG1* and *COL4A2*. The expression level of the *MMP12* gene showed a significantly high correlation with motility.

**Key words:** bulls, spermatozoa, cryopreservation, RNA-Seq, gene expression, biomarkers

**For citation:** Barkova O.Yu., Starikova D.A., Chistyakova I.V., Pleshanov N.V., Gabova A.V. Transcripts of *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* genes as potential biomarkers of bull sperm quality. *Agrarian science*. 2025; 395(06): 81–86 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-395-06-81-86>

## Введение/Introduction

У крупного рогатого скота в результате криоконсервации наблюдаются повышенные риски повреждения ДНК мужских гамет и снижение подвижности и жизнеспособности сперматозоидов после размораживания на целых 50% [1, 2]. В последние годы использование различных омиксных технологий в области криобиологии спермы и разработка высокопроизводительных методов, таких как секвенирование транскриптома, позволили провести анализ экспрессии специфических генов и генетических вариаций сперматозоидов, что привело к более глубокому пониманию структурных и функциональных изменений, которые испытывает сперма во время процесса замораживания-оттаивания, а также к выявлению соответствующих биомаркеров криорезистентности [3, 4]. Таким образом, изменения транскриптома в сперматозоидах считаются одним из основных факторов, влияющих на криотолерантность спермы сельскохозяйственных животных [5].

Полногеномное РНК-секвенирование было проведено для сравнения профилей транскриптов сперматозоидов двух групп быков с высокими и низкими продуктивными характеристиками и разной криорезистентностью. Общая РНК была выделена из декриоконсервированных сперматозоидов быков двух групп и подвергнута РНК-секвенированию (платформа Illumina NextSeq 500). Массив транскриптов оценивали с помощью пакетов DESeq2, DESeq в сперматозоидах каждого быка. Идентифицировано несколько дифференциально экспрессируемых генов (DEG), связанных с воспалением (*IRG1*, *MMP12*), сперматогенезом (*Col4A2*), которые преимущественно активировались в эякулятах с плохой криорезистентностью [6].

Цель исследований заключается в валидации трех транскриптов спермы генов-кандидатов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12*, полученных с помощью РНК-Seq и корреляционного анализа их уровня экспрессии с высокими и низкими показателями качества сперматозоидов быков голштинской породы.

## Материалы и методы исследования / Materials and methods

Для исследования в 2024 году были выбраны 6 быков от 1 года до 3 лет на АО «Невское» (г. Санкт-Петербург, Россия): 3 — со стабильно высокими показателями качества спермы после заморозки-оттаивания и 3 — регулярно производящие криочувствительное семя.

Всего исследованы 18 проб эякулята криоконсервированной спермы по 3 пайеты от каждого быка. Пробы свежего эякулята отбирали в утренние часы во время плановых заборов<sup>1</sup> в

соответствии с межгосударственным стандартом отбора неразбавленной спермы быков<sup>2</sup>.

Процедура обработки спермы: объем каждой пробы нативной спермы составлял 1000–1500 мкл, концентрация варьировалась от 0,7 до 1,65 млрд клеток/мл. Криоконсервацию спермы проводили по следующей технологии: смешанный с разбавителем OptiXcell (IMV Technologies, Франция) в соотношении 1:1 эякулят быков (27 °С) охлаждали до 18–22 °С, после чего проводили итоговое разбавление, фасовку и эквilibрацию (экспозиция при 4 °С в течение 3–4 часов). Замораживание сперматозоидов производили при 145 °С в течение 7,5 минут и хранили при -196 °С в жидком азоте (IMV Technologies, Франция). Концентрация клеток в пайете достигала 4–9 × 10<sup>6</sup> клеток/мл. Очистку образцов спермы от соматических и мертвых клеток проводили путем градиентного центрифугирования с помощью раствора Фиколла [7].

Подвижность и концентрация половых клеток свежего эякулята были оценены на АО «Невское» с использованием камеры Маклера (Sefi Medical Instrument, Италия).

Анализ морфологии сперматозоидов проводили под иммерсией на световом микроскопе Olympus Vanox-t (Япония) (объектив x100) после окрашивания мазка эякулята с помощью тест-набора «Дифф-Квик» (ООО «НПФ «АБРИС-+»», Россия) согласно рекомендациям производителя.

Анализ целостности мембран, жизнеспособности, мембранного потенциала митохондрий производили с помощью проточного цитометра CytoFLEX, BeckmanCoulter (США). Полученные данные анализировали с помощью программы CytExpert 2.4, BeckmanCoulter (США).

Для оценки мембранного потенциала митохондрий клетки сперматозоидов окрашивали флуоресцентным липофильным карбоцианиновым красителем JC-1 (Servicebio, Китай) [8].

Оценку жизнеспособности и целостности клеточных мембран деконсервированных сперматозоидов проводили с помощью окрашивания интеркалирующими красителями: пропидиумом йодидом (Servicebio, Китай), контрастным красителем для ядер и хромосом, окрашивающим мертвые клетки и SYBR Green I («Евроген», Россия), специфичным к двухцепочечной ДНК для живых клеток [9].

Оценку внутриклеточного уровня кальция нативных и деконсервированных сперматозоидов проводили с помощью окраски Fluo-3 (Servicebio, Китай) живых и мертвых клеток, ранжированных окраской пропидиум йод [10].

Выделение РНК для ОТ-ПЦР проводили набором RNA solo («Евроген», Россия), в который уже включена обработка ДНКазой, в соответствии с

<sup>1</sup> Все эксперименты с животными проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 2013 года и были одобрены Комиссией по этике Российского научно-исследовательского института генетики и селекции сельскохозяйственных животных — филиала ФГБНУ «ФНЦ животноводства им. Л.К. Эрнста» (протокол от 03.03.2020 № 2020-4).

<sup>2</sup> ГОСТ 23745-2014 Средства воспроизводства. Сперма быков неразбавленная свежеполученная. Технические условия. М.: Стандартинформ. 2015; 7.

рекомендацией производителя. По спектрофотометрическим показателям 260/280 образцы соответствовали диапазону 2–2,2 и 260/230 диапазону 1,8–2,2.

Дизайн олигонуклеотидов-праймеров для анализа экспрессии последовательности генов-кандидатов, влияющих на качество спермы, проводили на основании информации баз данных сети Интернет<sup>3</sup> и при помощи компьютерной программы PRIMER\_3<sup>4</sup>.

Синтез односторонней кДНК проводили при помощи обратной транскриптазы Mint («Евроген», Россия), следуя указаниям производителя. Реакция — в объеме 20 мкл.

Анализ экспрессии РНК, полученных из замороженно-оттаянной спермы быков, проводили с помощью олигонуклеотидов-праймеров (табл. 1).

Полученную смесь односторонней кДНК использовали для амплификации с использованием 5x реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR («Евроген»), предназначенной для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I в соответствии с рекомендациями производителя в следующем режиме: амплификация кДНК и детекция сигнала (40 циклов): 95 °C — 5 мин.; 95 °C — 15 сек.; 59 °C — 15 сек.; 72 °C — 20 сек. (этап сбора данных). Реакции ПЦР в реальном времени для каждого образца проводили в трех повторностях. Для последующих расчетов использовали среднее арифметическое значение. Расчет изменений экспрессии отдельных молекул РНК выполняли методом -2dCt (delta Cycle threshold) [11].

Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 14 (Grafiti LLC) с применением

ANOVA, однофакторного дисперсионного анализа Крускала — Уоллиса (англ. Kruskal — Wallis one-way analysis of variance), который предназначен для проверки равенства медиан нескольких выборок, при ненормальном распределении показателей признака. Нормальность распределения данных была проанализирована с помощью предположения ANOVA (тест Шапиро — Уилка). Представленные данные являются средними значениями трех экспериментальных повторов с тремя образцами на повтор. Данные представлены как среднее ± SEM (p < 0,05, рассчитано с использованием Дан метода и тест Tukey). Анализ ранговой корреляции был проведен по критерию Спирмена с помощью программы SigmaPlot 14 (Grafiti LLC, США).

**Результаты и обсуждение / Results and discussion**

Анализ экспрессии генов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* в группах быков с низкими и высокими продуктивными признаками с помощью ОТ-ПЦР выявил, что относительная экспрессия была преимущественно выше в сперматозоидах быков, имеющих высокую продуктивность. Статистически достоверные различия уровней экспрессии сперматозоидов изучаемых генов были получены для всех генов в обеих группах быков (табл. 2).

Анализ корреляционных связей по критерию Спирмена выявил высокую зависимость между уровнем экспрессии исследуемых генов и значимыми показателями качества спермы.

Транскрипт гена *COL4A2* показал высокую достоверную отрицательную корреляцию с благоприятными признаками для сперматозоидов,

Таблица 1. Последовательность праймеров, использованных в исследовании

Table 1. Primers sequence used in the study

Название гена	Последовательность прямого праймера и температура отжига (°C)	Последовательность обратного праймера и температура отжига (°C)	Размер продукта п. н.
<i>GAPDH</i> (референсный)	CCGCAAGGAGAACTCAAGGT 59.96	CGGCCCAAGCAAAAATTGGA 59.97	163
<i>COL4A2</i>	GACAGAGGAGCCCTAAGGA 59.82	GATGGGGCACACTTTCTCCA 59.90	137
<i>IRG1</i>	GTCTTCTGTCTCATGGC 59.74	GTTCTTCCCAGCCACTC 60.00	172
<i>MMP12</i>	AACGGAATTGTTGGGCTTGC 59.23	ATGCCTTTACCCCTGCTCC 60.16	151

Таблица 2. Относительная экспрессия исследованных генов в сперматозоидах с низкими и высокими продуктивными признаками

Table 2. Relative expression of the studied genes in spermatozoa with low and high productivity traits

Сперматозоиды <sup>а</sup>	Название	Относительная экспрессия	Ген		
			Статистические параметры <sup>б</sup>		
			М	SD	P
Высокое качество	<i>COL4A2</i>	0,236 ± 0,0119	0,243	0,0357	0,005
Низкое качество		0,0831 ± 0,0216	0,0400	0,0647	
Высокое качество	<i>MMP12</i>	0,272 ± 0,0258	0,324	0,0775	0,005
Низкое качество		0,150 ± 0,0124	0,143	0,0373	
Высокое качество	<i>IRG1</i>	0,396 ± 0,0622	0,321	0,187	<0,001
Низкое качество		0,0329 ± 0,0001	0,321	0,0003	

Примечание: а — каждый образец сперматозоидов получен от 6 быков голштинской породы по 3 эякулята от каждого из быка с высокими и низкими показателями продуктивности спермы; б — приведены медианные значения (М), стандартное отклонение (SD) и p-value (P), рассчитанные методом непараметрического однофакторного анализа ANOVA.

Note: <sup>a</sup> each sperm sample was obtained from 6 Holstein bulls, with 3 ejaculates each from a bull with high and low sperm productivity; <sup>b</sup> median (M), standard deviation (SD) and p-value (P) calculated by nonparametric one-factor ANOVA analysis are given.

<sup>3</sup> National Center for Biotechnology Information (NCBI). — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Ensembl. — URL: <https://www.ensembl.org/index.html>

<sup>4</sup> PRIMER\_3. — URL: <https://primer3.org/>

такими как подвижность (-0,926, p = 0,008), содержание живых клеток (-0,938, p = 0,005). Достоверную положительную корреляцию наблюдали для неблагоприятных признаков, таких как содержание мертвых (0,861, p = 0,027) и дефектные клетки (0,706, p = 0,013) (табл. 3).

Ген *COL4A2* кодирует наиболее распространенный коллаген типа IV1, который является белком базальной мембраны и экспрессируется во всех тканях, включая стенки сосудов [12]. В яичках самцов коллагеновые цепи типа IV и ламинины являются основными строительными блоками базальной мембраны [13]. Первый отчет, иллюстрирующий важность коллагенов, поддерживающих сперматогенез, появился в 2003 году, когда было обнаружено, что использование антитела против цепей человеческого коллагена IV нарушает барьерную функцию проницаемости плотных межклеточных контактов клеток Сертоли [14].

Исследования показали, что пептидный фрагмент NC1 локально вырабатывается в яичках из цепи коллагена α3 (IV) посредством протеолитического расщепления матриксными металлопротеиназами (ММР) и является важнейшим регулятором множественных клеточных событий [15]. Отмечено, что сверхэкспрессия пептида NC1 была способна вызывать обратимое нарушение гемато-тестикулярного барьера (ГТБ) как *in vitro*, так и *in vivo*, что сопровождалось повреждением эпителия, отшелушиванием зародышевых клеток и дефектами сперматогенеза [14].

Транскрипт гена *IRG1*, как и транскрипт гена *COL4A2*, показал высокую достоверную отрицательную корреляцию с такими признаками сперматозоидов, как подвижность сперматозоидов (-0,727, p = 0,01), содержание нормальных (-0,794, p = 0,05) и живых (-0,794, p = 0,05) клеток и средним содержанием Ca<sup>2+</sup> (-0,883, p = 0,033). Положительная корреляция выявлена с содержанием мертвых (0,883, p = 0,033) и дефектных (0,0659, p = 0,015) клеток, а также с дефектом акросомы (0,647, p = 0,017).

Иммунореактивный белок 1, кодируемый геном *IRG1*, преимущественно локализуется в мито-

хондриях и высоко экспрессируется в макрофагах млекопитающих во время воспалительной реакции, обеспечивает активность аконитатдекарбоксилазы и участвует в нескольких процессах, включая клеточный ответ на стимул цитокина, отрицательную регуляцию защитного ответа и отрицательную регуляцию передачи сигнала [16]. *IRG1* является одним из генов, стимулируемых интерфероном (ISG), и связан с опосредованным IFN типа I уничтожением бактерий и вирусов путем катализа продукции итаконовой кислоты, также известную как метилен янтарная кислота [17].

Используя подход «приобретение и потеря функции» в иммунных клетках, как мышей, так и человека, авторы обнаружили, что уровни экспрессии *IRG1* коррелируют с содержанием итаконовой кислоты, метаболита, который, как ранее уточнялось, обладает антимикробным эффектом и подавляет рост бактерий, экспрессирующих изоцитратлиазу, таких как *Salmonella enterica* [18].

Аналогичные наблюдения были проведены в микроглиальных клетках, где противовоспалительные состояния были вызваны различными цитокинами или бактериальными компонентами, и в исследовании профиля экспрессии генов мышечных макрофагов и микроглиальных клеток был выявлен ген *IRG1* как один из наиболее высокорегулируемых генов при воспалительных состояниях, таких как бактериальные инфекции [19].

Повышенные уровни экспрессии *IRG1* были обнаружены в макрофагах селезенки цыплят после заражения *Salmonella enterica* [20] и могут играть решающую роль в чувствительности к вирусу болезни Марека [21]. *IRG1* высоко экспрессируется на начальных стадиях в клетках эндометрия, что приводит к имплантации зародыша в матку [22].

Транскрипт гена *MMP12* имел противоположный эффект в сравнении с генами *IRG1* и *COL4A2*. Достоверная высокая корреляция уровня экспрессии транскрипта *MMP12* выявлена с подвижностью сперматозоидов (0,840, p = 0,036), и отрицательная корреляция с содержанием дефектных (-0,647, p = 0,017) и клеток (-0,750, p = 0,001) мертвых (табл. 3).

Таблица 3. Корреляционный анализ показателей качества спермы быков и уровня относительной экспрессии исследуемых генов

Table 3. Correlation analysis of bovine sperm quality and the level of relative expression of the studied genes

Показатель	COL4A2		IRG1		MMP12	
	R, Spearman	p-value	R, Spearman	p-value	R, Spearman	p-value
Подвижность сперматозоидов (баллы)	-0,926	0,008	-0,727	0,010	0,840	0,036
Общее кол-во клеток (клеток/мкл)	-0,925	0,008	-0,794	0,05	0,639	0,172
Содержание нормальных клеток (клеток/мкл)	-0,461	0,357	-0,353	0,497	0,009	0,864
Содержание дефектных клеток (клеток/мкл)	0,706	0,013	0,659	0,015	-0,647	0,017
Дефектные акросомы (клеток/мкл)	0,309	0,551	0,647	0,017	-0,04	0,929
Содержание мертвых клеток (клеток/мкл)	0,861	0,027	0,883	0,033	-0,750	0,001
Содержание живых клеток (клеток/мкл)	-0,938	0,005	-0,794	0,05	0,744	0,09
Низкая степень поляризации митохондриальных мембран (%)	-0,056	0,915	-0,235	0,658	-0,164	0,756
Средняя степень поляризации митохондриальных мембран (%)	0,438	0,385	0,206	0,658	-0,696	0,124
Высокая степень поляризации митохондриальных мембран (%)	-0,470	0,347	-0,118	0,803	0,771	0,07
Низкое содержание Ca <sup>2+</sup> (%)	0,114	0,829	0,383	0,419	-0,316	0,541
Среднее содержание Ca <sup>2+</sup> (%)	-0,799	0,056	-0,883	0,033	0,657	0,156
Высокое содержание Ca <sup>2+</sup> (%)	-0,011	0,983	-0,118	0,803	-0,322	0,534

В предыдущем исследовании [6] наблюдали, что два из ключевых генов *IRG1*, *MMP12* с пониженной регуляцией, идентифицированные с помощью RNA-Seq анализа в эякулятах с плохой криорезистентностью, были преимущественно связаны с воспалением и иммунным ответом.

Матриксная металлопептидаза 12 (MMP12), также известная как макрофагальная металлоэластаза, вырабатывается в основном макрофагами и является членом семейства матриксных металлопротеиназ, участвует в различных физиологических функциях, включая катаболизм внеклеточного матрикса и деградацию эластина [23]. MMP12 был идентифицирован как транскрипционно-репрессированный кандидат во время раннего воспаления, который восстанавливался во время фазы разрешения [23]. Ген *MMP12* был выявлен в исследовании M. Atikuzzaman и соавт. как участвующий в иммуномодуляции и имеющий дифференциальную экспрессию в резервуарах спермы у птиц и млекопитающих в ответ на спаривание [24].

### Выводы/Conclusions

Результаты валидации полногеномного секвенирования РНК сперматозоидов из двух групп бы-

ков с помощью ОТ-ПЦР показали, что относительная экспрессия исследуемых генов *COL4A2*, *IRG1*, *MMP12* была достоверно ниже в сперматозоидах, имеющих низкую продуктивность, что подтверждает результаты полного транскриптомного анализа, где пониженная дифференциальная экспрессия наблюдалась в группе быков с плохой продуктивностью.

Транскрипт гена *MMP12* показал достоверную высокую положительную корреляцию с подвижностью сперматозоидов и отрицательную с содержанием дефектных и мертвых клеток. Транскрипты генов *IRG1* и *COL4A2* показали высокую достоверную отрицательную корреляцию с некоторыми благоприятными признаками сперматозоидов, такими как подвижность сперматозоидов, содержание живых и нормальных клеток, среднее содержание  $Ca^{2+}$ , и положительную корреляцию с несколькими нежелательными признаками, такими как содержание дефектных и мертвых клеток, а также с дефектом акросомы.

Результаты исследования могут быть использованы для разработки транскрипционных маркеров, позволяющих отбирать сперму от быков-производителей с более высоким оплодотворяющим и криорезистентным потенциалом.

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

Работа выполнена в рамках работ по гранту Российского научного фонда (РНФ) № 22-76-10041.

### FUNDING

The research was carried out within the framework of the Russian Science Foundation grant No. 22-76-10041.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Yáñez-Ortiz I., Catalán J., Rodríguez-Gil J.E., Miró J., Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*. 2022; 246: 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
- Lemma A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. Manafi M. (ed.). Artificial Insemination in Farm Animals. *InTech*. 2011; 191–216. <https://doi.org/10.5772/16563>
- Fraser L., Brym P., Mogielnicka-Brzozowska M., Wasilewska K. Total RNA quality in boar spermatozoa with different freezability. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2019; 22(1): 181–185. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.127085>
- Khan I.M. et al. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021; 8: 609180. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>
- Đuračka M., Benko F., Tvrđá E. Molecular Markers: A New Paradigm in the Prediction of Sperm Freezability. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(4): 3379. <https://doi.org/10.3390/ijms24043379>
- Barkova O.Yu., Starikova D.A., Chistyakova I.V., Pleshanov N.V. Whole Genome RNA Sequencing in Holstein Bull Spermatozoa with Different Cryoresistance. *Russian Journal of Genetics*. 2025; 61(4): 395–404. <https://doi.org/10.1134/S1022795424701795>
- Highland H.N., Rishika A.S., Almira S.S., Kanthi P.B. Ficoll-400 density gradient method as an effective sperm preparation technique for assisted reproductive techniques. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2016; 9(3): 194–199. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.192070>
- Garner D.L., Thomas C.A. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 1999; 53(2): 222–229. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199906\)53:2<222::AID-MRD11>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<222::AID-MRD11>3.0.CO;2-L)
- Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L., Haugland R.P. Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Journal of Andrology*. 1994; 15(6): 620–629. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1994.tb00510.x>
- Harrison R.A.P., Mairet B., Miller N.G.A. Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated  $Ca^{2+}$  influx in boar sperm populations. *Molecular Reproduction and Development*. 1993; 35(2): 197–208. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080350214>
- Harshitha R., Arunraj D.R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2021; 49(5): 800–812. <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>
- Kühn K. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biology*. 1995; 14(6): 439–445. [https://doi.org/10.1016/0945-053x\(95\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0945-053x(95)90001-2)
- Li L. et al. A local regulatory network in the testis mediated by laminin and collagen fragments that supports spermatogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2021; 56(3): 236–254. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1901255>
- Liu S.-W., Li H.-T., Ge R.-S., Cheng C.Y. NC1-peptide derived from collagen  $\alpha 3$  (IV) chain is a blood-tissue barrier regulator: lesson from the testis. *Asian Journal of Andrology*. 2021; 23(2): 123–128. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_44\\_20](https://doi.org/10.4103/aja.aja_44_20)

15. Kisling A., Lust R.M., Katwa L.C. What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease?. *Life Sciences*. 2019; 228: 30–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.042>
16. Tallam A. *et al.* Gene Regulatory Network Inference of Immunoresponsive Gene 1 (*IRG1*) Identifies Interferon Regulatory Factor 1 (*IRF1*) as Its Transcriptional Regulator in Mammalian Macrophages. *PLoS ONE*. 2016; 11(2): e0149050.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149050>
17. Naujoks J. *et al.* IFNs Modify the Proteome of *Legionella*-Containing Vacuoles and Restrict Infection Via IRG1-Derived Itaconic Acid. *PLoS Pathogens*. 2016; 12(2): e1005408.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005408>
18. Chen M. *et al.* Itaconate is an effector of a Rab GTPase cell-autonomous host defense pathway against *Salmonella*. *Science*. 2020; 369(6502): 450–455.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaz1333>
19. Jaiswal A.K. *et al.* *Irg1*/itaconate metabolic pathway is a crucial determinant of dendritic cells immune-priming function and contributes to resolute allergen-induced airway inflammation. *Mucosal Immunology*. 2022; 15(2): 301–313.  
<https://doi.org/10.1038/s41385-021-00462-y>

20. Matulova M. *et al.* Characterization of Chicken Spleen Transcriptome after Infection with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *PLoS ONE*. 2012; 7(10): e48101.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048101>
21. Smith J. *et al.* Systems Analysis of Immune Responses in Marek's Disease Virus-Infected Chickens Identifies a Gene Involved in Susceptibility and Highlights a Possible Novel Pathogenicity Mechanism. *Journal of Virology*. 2011; 85(21): 11146–11158.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.05499-11>
22. Ji J. *et al.* IRG1/ACOD1 promotes neutrophil reverse migration and alleviates local inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2024; 116(4): 854–863.  
<https://doi.org/10.1093/jleuko/qiae110>
23. Kuntschar S. *et al.* Mmp12 Is Translationally Regulated in Macrophages during the Course of Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(23): 16981.  
<https://doi.org/10.3390/ijms242316981>
24. Atikuzzaman M., Alvarez-Rodriguez M., Vicente-Carrillo A., Johnsson M., Wright D., Rodriguez-Martinez H. Conserved gene expression in sperm reservoirs between birds and mammals in response to mating. *BMC Genomics*. 2017; 18: 98.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-3488-x>

**ОБ АВТОРАХ****Ольга Юрьевна Баркова**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник  
barkoffws@list.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0963-905X>

**Дарья Андреевна Старикова**

кандидат биологических наук, научный сотрудник  
live8avis@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-5324-4090>

**Ирэна Валерьевна Чистякова**

кандидат биологических наук, научный сотрудник  
itjeren7@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-7229-5766>

**Николай Вячеславович Плешанов**

научный сотрудник  
Klaus-90@list.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4634-7515>

**Алина Валерьевна Габова**

лаборант  
<https://orcid.org/0009-0007-6039-6958>

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального исследовательского центра животноводства «ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста», Московское шоссе, 55А, Пушкин, Санкт-Петербург, 196601, Россия

**ABOUT THE AUTHORS****Olga Yurievna Barkova**

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher  
barkoffws@list.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0963-905X>

**Daria Andreevna Starikova**

Candidate of Biological Sciences, Researcher  
live8avis@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-5324-4090>

**Irena Valerievna Chistyakova**

Candidate of Biological Sciences, Researcher  
itjeren7@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-7229-5766>

**Nikolay Vyacheslavovich Pleshanov**

Researcher  
Klaus-90@list.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4634-7515>

**Alina Valerievna Gabova**

Laboratory Assistant  
<https://orcid.org/0009-0007-6039-6958>

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

55A Moscow highway, Pushkin, St. Petersburg, 196601, Russia