

Ю. Л. Силукова, О. И. Станишевская

Проблемы криоконсервации мужских гамет *Gallus gallus domesticus* – роль мембранных липидов (обзор)

Аннотация.

Обзор дает представление о степени изученности молекулярного состава плазматических мембран сперматозоидов петухов и его роли в сохранении морфо-функциональной целостности клеток в условиях низкотемпературного стресса. Использование метода криоконсервации семени сельскохозяйственных птиц до сих пор лежит в области научных разработок, так как уровень оплодотворяющей способности заморожено-оттаянного семени не достаточно высок для использования в промышленном секторе птицеводства. При решении задач по повышению качества оттаянного семени сельскохозяйственных птиц необходимо опираться не только на эффективность криозащитных сред, но и определить наиболее «уязвимые места» в строении аппарата сперматозоидов, связанные с возникновением криоповреждений клеток в процессе замораживания. Сперматозоиды как петухов, так и других видов животных окружены уникальной плазматической мембраной, включающей в себя высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), стеролы, ряд фосфолипидов, гликолипиды, которые играют важную функциональную роль во взаимодействиях сперматозоидов и ооцитов и влияют на их способность к оплодотворению. Изучение липидного состава плазматической мембраны клетки и его динамического состояния необходимо для выявления ключевых факторов криоустойчивости клетки; проявления их количественных и качественных изменений могут указывать на возможную деградацию, происходящую внутри клеток в условиях низкотемпературного стресса. В настоящем обзоре представлены результаты исследований, доказывающие исключительную роль липидного состава мембран сперматозоидов в механизмах криоустойчивости клеток и сохранении их морфофункциональной полноценности в условиях термического стресса.

Ключевые слова: криоконсервация, сперматозоиды, плазматические мембраны, липиды, петухи.

Авторы:

Силукова Ю. Л. – e-mail: svadim33@mail.ru

Станишевская О. И. – доктор биологических наук; e-mail: olgastan@list.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское ш., д. 55а.

Использование метода криоконсервации семени сельскохозяйственных птиц до сих пор лежит в области научных разработок, так как уровень оплодотворяющей способности заморожено-оттаянного семени недостаточно высок для использования в промышленном секторе птицеводства. Репродуктивные клетки самцов птиц весьма чувствительны к различного рода манипуляциям, особенно при низкотемпературном воздействии. Исследователи по настоящее время ведут работу на повышение фертильности сперматозоидов представителей класса Aves. Стабильные повторяющиеся результаты по оплодотворенности яиц при использовании заморожено/оттаянного семени петухов, приближенные к производственным нормам (70-80 %), получены и воспроизведены лишь у отдельных групп исследователей [1,2]. Нужно отметить, что данные технологии криоконсервации семени уже сейчас используются в программах по сохранению генетических ре-

сурсов сельскохозяйственных птиц во многих странах, но качество сохраняемого в криобанках репродуктивного материала имеет большую изменчивость, и он не всегда может быть успешно использован по практическому назначению [3-7].

При решении задач по повышению качества оттаянного семени сельскохозяйственных птиц необходимо опираться не только на эффективность криозащитных сред, но и определить наиболее «уязвимые места», наиболее слабые точки в строении аппарата сперматозоидов, связанные с возникновением криоповреждений клеток в процессе замораживания. В процессе криоконсервации и оттаивания семени возникают каскадные процессы, дестабилизирующие молекулярные связи в плазматических мембранах сперматозоидов и нарушающие функциональные качества клетки функциональность клетки. Возникает осмотический дисбаланс за счет изменения состава цитозоля, усиливается перекисное

окисление липидов, изменяется состояние хроматина. Возникающий комплекс отрицательных факторов снижает оплодотворяющую способность сперматозоидов [3, 5, 8].

Полное понимание физико-химических процессов, происходящих в семени во время криоконсервации, является обязательным для обеспечения максимального успеха. Ключевым фактором при криоконсервации сперматозоидов являются особенности морфологического строения и биохимического строения этих клеток, они представляют клетки малого размера с большой поверхностной площадью и весьма небольшим объемом цитозоля. Сперматозоиды как петухов, так и других видов животных окружены уникальной плазматической мембраной, включающей в себя высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), стеролы, ряд фосфолипидов, гликолипиды, которые играют

важную функциональную роль во взаимодействиях сперматозоидов и ооцитов и способности их к оплодотворению [8]. Несмотря на простую двухслойную природу мембраны, липидомные исследования выявили огромное разнообразие видов липидов, участвующих в ее строении. Типичные плазматические мембраны содержат сотни различных липидов [9]. Плазматическая мембрана не просто структурная часть клетки, являющаяся полупроницаемым барьером от внешней среды, но и диспетчер транспорта различных ионов и молекул внутрь клетки.

Обширный список повреждающих событий для клеточных структур, происходящих в ходе протокола замораживания/оттаивания клеток помимо механических повреждений кристаллами образующего льда, осмотического стресса, включает в себя повышение уровня АФК (активных форм кислорода), перекисное окисление липидов

Таблица 1. Экспрессия отдельных иммунобиологических маркеров, характеризующих естественную резистентность при ЭСО

Название вида	Идентифицированные липиды	Источник
Козел (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Фосфатидилхолин	Xu B. et al., 2022 [11]
	Фосфатидилэтаноламин	
	Триглицериды	
	Церамиды	
	Сфингомиелин	
Бык (<i>Bos taurus taurus</i>)	Сфингомиелин	Evans H.C. et al., 2020 [12] Le Guillou J. et al., 2013 [13]
	Холестерин	
	1-пальмитоил-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПК)	
	Плазмалоген 1-(1Z-октадеценил)-2-докозагексаеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (P-PC)	
Кабан (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	Холестерин	Cerolini S. et al., 2001 [14] Maldjian A. et al., 2005 [15]
	Триглицериды	
	Фосфолипиды	
Петух (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Фосфатидилэтаноламин (ФЭ)	Stanishevskaya O. I. et al. 2023 [16]
	Фосфатидилхолин (ФК),	
	Фосфатидилсерин (ФС)	
	Гликолипиды (ГЛ),	
	Сульфогликолипиды (СГЛ)	
	Сфингомиелин (СМ)	
	Кардиолипин (КЛ)	
Кролик (<i>Oryctolagus cuniculus domesticus</i>)	Фосфатидилэтаноламин (ФЭ)	Juan G et al., 2001 [17]
	Фосфатидилхолин (ФК)	
	Фазмалогены	
	Сфингомиелин (СП),	
	Кардиолипин (КЛ)	
	Фосфатидилглицерин (ПГ)	

мембран, снижение уровня выработки АТФ и т. д. АФК-индуцированное повреждение сперматозоидов в протоколе замораживания/оттаивания обусловлено окислительной атакой АФК на полиненасыщенные жирные кислоты, которые входят в состав фосфолипидов клеточных мембран. Изучение липидного состава плазматической мембраны клетки и ее динамического состояния в процессе замораживания/оттаивания может являться ключевым фактором для понимания механизмов криоустойчивости клетки. Очевидно, что наиболее острое негативное воздействие всего спектра цитологических событий в цикле замораживания/оттаивания сперматозоидов обрушивается на липидный комплекс плазматических мембран.

Достаточно большой исследовательский вклад представлен в опубликованных работах по изучению липидного профиля плазматических мембран сперматозоидов млекопитающих. Тщательно изучены на сперматозоидах животных: кабана, крупного рогатого скота, сумчатых, коз, баранов и т. д. [10]. Выделены основные группы липидов: фосфолипиды как самая представительная липидная фракция мембран сперматозоидов, основными компонентами которых являются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин (табл. 1).

Отдельно рассмотрено соотношение фосфолипидов и холестерина в составе плазматических мембран. Одним из ключевых регуляторов целостности клеточных мембран считается соотношение фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, при этом снижение этого соотношения приводит к потере целостности мембраны [18]. Изучен специфический липидный комплекс мембраны головки сперматозоидов. Соотношение мембранных липидов сперматозоидов имеет большую изменчивость в зависимости и от клеточного цикла сперматозоидов, и от вида животного. Представлены данные о липидном составе плазматической мембраны сперматозоидов и их функциональной роли.

В доступных литературных данных представлен весьма скудный объем информации об изучении липидного профиля сперматозоидов петухов. В период 1963-1977 гг. опубликованы работы [19-21] по изучению фосфолипидов в составе плазматических мембран сперматозоидов петухов, их количественных и качественных изменений, которые могут указывать на возможную деградацию, происходящую внутри клеток в различных условиях. Например, в 1981 году Howarth Jr. B. [22] представлены результаты исследования динамического состояния липидного

профиля сперматозоидов петухов в результате суточной инкубации при температуре 41°C. В 1992 с помощью тонкослойного хроматографического анализа Parks и Lynch [23] показали, что основной липидный компонент спермы петуха отличается от такового в сперме млекопитающих, отмечено отсутствие гликолипидного компонента с высокой температурой плавления в плазматических мембранах петухов. В недавних исследованиях Станишевской О. с соавт. [16,24] были установлены различия в соотношении липидов плазматических мембран сперматозоидов петухов в зависимости от породной принадлежности и/или направления продуктивности пород кур. В опубликованном материале представлены данные по процентному содержанию основных фосфолипидов от общей липидной фракции, присущих внутреннему слою плазматических мембран сперматозоидов (фосфатидилэтаноламин — 22,7-23,9 %; фосфатидилсерин — 18,6 %-17,6 %) и наружному слою (фосфатидилхолин — 31,4-37,1 %; сфингомиелин — 12,9-10,9 %). В отличие от предыдущих исследований определено наличие гликолипидов в составе плазматических мембран сперматозоидов петухов, хотя и в минорном состоянии до 0,2% от общей липидной массы. Состав криозащитного разбавителя, по данным исследователей, не влиял на липидный состав плазматических мембран сперматозоидов нативной и замороженной/размороженной спермы петуха, но в то же время изменял процентное соотношение этих липидов в протоколе замораживания/оттаивания. Также было показано, что изменение соотношения общей фракции фосфолипидов к содержанию стерина в оболочках сперматозоидов под влиянием протокола замораживания оттаивания спермы петухов в зависимости от породы и состава криозащитного разбавителя напрямую отражалось на показателях сохранности прогрессивной подвижности и жизнеспособности сперматозоидов на уровне до 35,0%. Соотношение фосфолипидов наружного и внутреннего слоев плазматической мембраны сперматозоидов изменялось при использовании различных составов криозащитных сред и смещалось в сторону фосфолипидов наружного слоя. Другие сообщения показали, что количественное содержание фосфолипидов, таких как фосфатидилсерин и фосфатидилхолин, влияет на подвижность и выживаемость сперматозоидов после оттаивания [25].

Есть данные, что увеличение доли ненасыщенного фосфатидилхолина снижает липидный фазовый переход в мембране сперматозоидов, что может повышать их криотолерантность [25].

Изучение процесса перекисного окисления липидов плазматических мембран сперматозоидов является важным индикатором в проекции выживаемости клеток в ходе криоконсервации. Для сперматозоидов перекисное окисление липидов имеет критические последствия.

Реакции окисления в биомембранах приводят к усилению активных форм кислорода (АФК), изменению текучести мембран, потере компартиментализации и целостности плазматических мембран, нарушению ионных градиентов, нарушению липид-белковых взаимодействий, модификации ДНК и белков [26]. Комплекс полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) мембран сперматозоидов петухов особенно чувствителен к окислительному стрессу из-за их высокого содержания в фосфолипидах мембран. Перекисное окисление липидов мембран сперматозоидов затрагивает основные ПНЖК: арахидоновую, докозатетраеновую и докозагексаеновую кислоты [26], которые определяют многие морфофункциональные показатели семени. Так, снижение концентрации арахидоновой и докозатетраеновой кислот весомо снижает подвижность сперматозоидов.

Таким образом, ответом на стресс, вызванный протоколом замораживания/оттаивания, является перестройка мембранных липидов сперматозоидов за счет изменения соотношения не только основных липидов (фосфотидилэталомини, фосфатидилсерини, фосфатидилхолины, сфингомиелины), но и изменения соотношения минорных липидов (кардиолипиды, гликолипиды, сульфогликолипиды).

Аннулярные липиды плазматической мембраны сперматозоидов, как упорядоченная и наименее подвижная структура претерпевает основную

стрессовую нагрузку под влиянием ультранизких температур. У мембранных липидов (в частности, фосфатидилсерини) изменяется нагрузка функции регулятора активности ряда мембраносвязанных ферментов. Нарушение структурной целостности органоидов при криоконсервации запускает процесс преждевременного высвобождения ферментов, что приводит к деструкции молекул глико- и фосфолипидов с высвобождением их составляющих (глицерола и жирных кислот); известно о различной локализации цитозольных фосфолипаз в сперматозоидах (головки, средние части и хвосты) [27]. Криоконсервация индуцирует изменение соотношения холестерин-фосфолипиды плазматических мембран сперматозоидов, что отчасти является причиной криокапацитации и преждевременной акросомной реакции в размороженных сперматозоидах [28]. По этой причине гидролитические ферменты акросомы, которые в норме высвобождаются при акросомальной реакции и оплодотворении яйцеклетки вследствие разрушения акросомы, при криоконсервации могут высвобождаться спонтанно и вызывать гидролиз липидов плазматических мембран сперматозоидов [29, 30].

Таким образом, дальнейшее изучение состава и статуса липидного профиля мембран сперматозоидов *Gallus gallus domesticus* в качестве ключевого прогностического критерия оценки их морфофункциональной целостности после размораживания позволит не только расширить понимание тонких механизмов функционирования клеточных мембран в условиях низкотемпературного стресса, но и будет способствовать повышению качества репродуктивного материала сельскохозяйственных птиц в условиях *in vitro*.

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по Государственному заданию 121052600357-8

Литература

1. FAO. 2015. The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. <http://www.fao.org/3/ai4787e/index.html>.].
2. Iaffaldano N. Italian semen cryobank of autochthonous chicken and turkey breeds: a tool for preserving genetic biodiversity / M. Di Iorio, G. Rusco et al. // Italian Journal Animal Science. — 2021. — Vol. 20(1). — P. 2022-2033.
3. Thelie A. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources / A. Thelie, A. Bailliard et al. // Poultry Science. — 2019. — Vol. 98(1). — P. 447-455.
4. Partyka A. Advances in storage of poultry semen / A. Partyka, W. Niżański // Animal Reproduction Science. — 2022. — Vol. 246. — P. 106921.
5. Janosikova M. New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa / M. Janosikova, K. Petricakova, M. Ptacek, F.G. Savvulidi, J. Rychtarova, J. Fulka // Poultry Science. — 2023. — Vol. 102(2). — P. 102386.
6. Fulton J. E. Avian genetic stock preservation: An industry perspective / J. E. Fulton // Poultry Science. — 2006. — Vol. 85. — P. 227-231.

7. Zong Y. Chicken Sperm Cryopreservation: Review of Techniques, Freezing Damage, and Freezability Mechanisms / Y. Zong, Y. Li, Y. Sun, G.M.K. Mehaisen, T. Ma, J. Chen, // Agriculture. – 2023. – Vol. 13. – P. 445.
8. Esmaeili V. Dietary fatty acids affect semen quality: a review. / V. Esmaeili, A.H. Shahverdi, M.H. Moghadasian, A.R. Alizadeh // Andrology. – 2015. – Vol. 3(3). – P. 450-461.
9. Ingylfsson H. I. Lipid organization of the plasma membrane / H. I. Ingylfsson, M. N. Melo et al. // J Am Chem Soc. – 2014. – Vol. 136(41). – 14554-9. DOI: 10.1021/ja507832e.
10. Mandal R. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation / R. Mandal, D. Badyakar, J. Chakrabarty // Advances in Andrology. – 2014. – Vol. 2014.
11. Xu B. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation / B. Xu, R. Wang et al. // Front Vet Sci. – 2022. – Vol. 20(9). – P. 1004683. DOI: 10.3389/fvets.2022.1004683.
12. Evans H. C. Lipidomic markers of sperm cryotolerance in cattle / H. C. Evans, T. T. N. Dinh et al. // Science Report. – 2020. – Vol. 10(1). – P. 20192. DOI: 10.1038/s41598-020-77089-9.
13. Le Guillou J. Organization of lipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air-water interface / J. Le Guillou, M. H. Ropers et al. // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2013. – Vol. 108. – P. 246-54. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.040.
14. Cerolini S. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen / S. Cerolini, A. Maldjian, F. Pizzi, T. M. Gliozzi // Reproduction. – 2001. – Vol. 121(3). – P. 395-401.
15. Maldjian A. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen / A. Maldjian, F. Pizzi et al. // Theriogenology. – 2005. – Vol. 63(2). – P. 411-421.
16. Alvarez J. G. Thin Layer Chromatography of Phospholipid Composition in Mouse and Rabbit Spermatozoa / J. G. Alvarez, I. Lopez et al. // Journal of Liquid Chromatography. – 1987. – № 10:16. – P. 3557-3573.
17. Li Z. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis / Z. Li, L. B. Agellon et al. // Cell Metab. – 2006. – Vol. 3(5). – P. 321-331.
18. Scott T. W. Lipid metabolism of spermatozoa / T.W. Scott // Journal of reproduction and fertility. Supplement. – 1973. – Vol. 18. – P. 65-76.
19. Tingari M. D. Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm-host glands of the domestic hen, Gallus domesticus / M. D. Tingari, P. E. Lake // Reproduction. – 1973. – Vol. 34. – №. 3. – P. 423-431.
20. Howarth Jr. B. The phospholipid content of ejaculated fowl and turkey spermatozoa / B. Jr. Howarth, D. Torregrossa, W.D. Britton // Poultry Science. – 1977. – Vol. 56. – №. 4. – P. 1265-1268.
21. Howarth Jr B. The phospholipid profile of cock spermatozoa before and after in vitro incubation for twenty-four hours at 41°C / B. Jr. Howarth // Poultry Science. – 1981. – Vol. 60. – №. 7. – P. 1516-1519.
22. Parks J. E. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes / J. E. Parks, D.V. Lynch // Cryobiology. – 1992. – Vol. 29. – №. 2. – P. 255-266.
23. Stanishevskaya O. Trehalose as a Stabilizer of the Lipid Composition of Membranes and the Composition of the Cytosol of Frozen / Thawed Rooster Spermatozoa / O. I. Stanishevskaya, Y. Silyukova, V. M. Tereshina, E. Ianutsevich, N. Pleshanov, A. Kurochkin, E. Fedorova // Agriculture. – 2023. – Vol. 13. – P. 1387.
24. Vireque A. A. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm / A.A. Vireque, A. Tata et al. // Fertility and sterility. – 2016. – Vol. 106. – №. 2. – P. 273-283.
25. Partyka A. et al. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C11-BOD-IPY581/591 // Theriogenology. – 2011. – Vol. 75. – №. 9. – P. 1623-1629.
26. Sola-Penna M. Stabilization against Thermal Inactivation Promoted by Sugars on Enzyme Structure and Function: Why Is Trehalose More Effective Than Other Sugars / M. Sola-Penna, J.R. Meyer-Fernandes // Archives of biochemistry and biophysics. – 1998. – Vol. 360. – №. 1. – P. 10-14.
27. Longobardi V. Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (Bubalus bubalis) cryopreserved sperm / V. Longobardi, G. Alberio, et al. // Theriogenology. – 2017. – Vol. 89. – P. 359-364.
28. Gholami D. Beneficial effects of trehalose and gentiobiose on human sperm cryopreservation. / D. Gholami, M. Sharafi et al. // Plos one. – 2023. – Vol. 18. – №. 4. – P. e0271210.
29. Miyazaki M. Characterisation of the carboxylesterase enzyme cauxin in the seminal fluid of the cat / M. Miyazaki, T. Miyazaki, M. Toyonaga, T. Tsutsui, H. Taira, T. Yamashita, A. Suzuki // The Veterinary Journal. – 2011. – Vol. 190. – №. 3. – P. 378-382.

Silyukova Y., Stanishevskaya O.

Problems of cryopreservation of male gametes of *Gallus gallus domesticus* – the role of membrane lipids (review)

Abstract.

The review reveals the current state of knowledge of the plasma membranes molecular composition of rooster spermatozoa and its role in maintaining the morphofunctional integrity of cells under low-temperature stress. The use of the method of cryopreservation of the semen in poultry breeding is still in the field of scientific development, since the level of fertility of the frozen-thawed semen is not high enough to be used for application in the commercial poultry flocks. When solving the problems of improving the quality of thawed roosters semen it is necessary to rely on the effectiveness of cryoprotective media, as well as to determine the most vulnerable organells of structure of the spermatozoa apparatus during freezing. Rooster spermatozoa are surrounded by a unique plasma membrane, which includes a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), sterols, a number of phospholipids, glycolipids, which play an important functional role in the interactions between spermatozoa and oocytes and affect their ability to fertilize. The study of the lipid composition of the cell plasma membranel and its dynamic state is necessary to identify the key factors of cell cryoresistance; the manifestation of their quantitative and qualitative changes may indicate a possible degradation occurring inside the cells under conditions of low-temperature stress. This review presents the results of studies proving the exceptional role of the lipid composition of spermatozoa membranes in the mechanisms of cell cryoresistance and the preservation of their morphofunctional usefulness under thermal stress.

Key words: cryopreservation, spermatozoa, plasma membranes, lipids, roosters.

Authors:

Silyukova Y. – e-mail: svadim33@mail.ru;

Stanishevskaya O. – Dr. Habil (Biol. Sci.); e-mail: olgastan@list.ru.

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

References

1. FAO. 2015. The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. <http://www.fao.org/3/ai4787e/index.html>.].
2. Iaffaldano N. Italian semen cryobank of autochthonous chicken and turkey breeds: a tool for preserving genetic biodiversity / M. Di Iorio, G. Rusco et al. // Italian Journal Animal Science. — 2021. — Vol. 20(1). — P. 2022-2033.
3. Thelie A. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources / A. Thelie, A. Bailliard et al. // Poultry Science. — 2019. — Vol. 98(1). — P. 447-455.
4. Partyka A. Advances in storage of poultry semen / A. Partyka, W. Niżański // Animal Reproduction Science. — 2022. — Vol. 246. — P. 106921.
5. Janosikova M. New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa / M. Janosikova, K. Petricakova, M. Ptacek, F.G. Savvulidi, J. Rychtarova, J. Fulka // Poultry Science. — 2023. — Vol. 102(2). — P. 102386.
6. Fulton J. E. Avian genetic stock preservation: An industry perspective / J. E. Fulton // Poultry Science. — 2006. — Vol. 85. — P. 227-231.
7. Zong Y. Chicken Sperm Cryopreservation: Review of Techniques, Freezing Damage, and Freezability Mechanisms / Y. Zong, Y. Li, Y. Sun, G. M. K. Mehaisen, T. Ma, J. Chen, // Agriculture. — 2023. — Vol. 13. — P. 445.
8. Esmaeili V. Dietary fatty acids affect semen quality: a review. / V. Esmaeili, A.H. Shahverdi, M.H. Moghadasian, A.R. Alizadeh // Andrology. — 2015. — Vol. 3(3). — P. 450-461.
9. Ingylfsson H. I. Lipid organization of the plasma membrane / H. I. Ingylfsson, M. N. Melo et al. // J Am Chem Soc. — 2014. — Vol. 136(41). — 14554-9. DOI: 10.1021/ja507832e.
10. Mandal R. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation / R. Mandal, D. Badyakar, J. Chakrabarty //Advances in Andrology. — 2014. — Vol. 2014.

11. Xu B. Evaluation of lipidomic change in goat sperm after cryopreservation / B. Xu, R. Wang et al. // *Front Vet Sci.* – 2022. – Vol. 20(9). – P. 1004683. DOI: 10.3389/fvets.2022.1004683.
12. Evans H. C. Lipidomic markers of sperm cryotolerance in cattle / H. C. Evans, T. T. N. Dinh et al. // *Science Report.* – 2020. – Vol. 10(1). – P. 20192. DOI: 10.1038/s41598-020-77089-9.
13. Le Guillou J. Organization of lipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air-water interface / J. Le Guillou, M. H. Ropers et al. // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2013. – Vol. 108. – P. 246-54. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.02.040.
14. Cerolini S. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen / S. Cerolini, A. Maldjian, F. Pizzi, T. M. Gliozzi // *Reproduction.* – 2001. – Vol. 121(3). – P. 395-401.
15. Maldjian A. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen / A. Maldjian, F. Pizzi et al. // *Theriogenology.* – 2005. – Vol. 63(2). – P. 411-421.
16. Alvarez J. G. Thin Layer Chromatography of Phospholipid Composition in Mouse and Rabbit Spermatozoa / J. G. Alvarez, I. Lopez et al. // *Journal of Liquid Chromatography.* – 1987. – № 10:16. – P. 3557-3573.
17. Li Z. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis / Z. Li, L. B. Agellon et al. // *Cell Metab.* – 2006. – Vol. 3(5). – P. 321-331.
18. Scott T. W. Lipid metabolism of spermatozoa / T. W. Scott // *Journal of reproduction and fertility. Supplement.* – 1973. – Vol. 18. – P. 65-76.
19. Tingari M. D. Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm-host glands of the domestic hen, *Gallus domesticus* / M. D. Tingari, P. E. Lake // *Reproduction.* – 1973. – Vol. 34. – №. 3. – P. 423-431.
20. Howarth Jr. B. The phospholipid content of ejaculated fowl and turkey spermatozoa / B. Jr. Howarth, D. Torregrossa, W.D. Britton // *Poultry Science.* – 1977. – Vol. 56. – №. 4. – P. 1265-1268.
21. Howarth Jr B. The phospholipid profile of cock spermatozoa before and after in vitro incubation for twenty-four hours at 41°C / B. Jr. Howarth // *Poultry Science.* – 1981. – Vol. 60. – №. 7. – P. 1516-1519.
22. Parks J. E. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes / J. E. Parks, D.V. Lynch // *Cryobiology.* – 1992. – Vol. 29. – №. 2. – P. 255-266.
23. Stanishevskaya O. Trehalose as a Stabilizer of the Lipid Composition of Membranes and the Composition of the Cytosol of Frozen / Thawed Rooster Spermatozoa / O. I. Stanishevskaya, Y. Silyukova, V. M. Tereshina, E. Ianutsevich, N. Pleshanov, A. Kurochkin, E. Fedorova // *Agriculture.* – 2023. – Vol. 13. – P. 1387.
24. Vireque A. A. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm / A.A. Vireque, A. Tata et al. // *Fertility and sterility.* – 2016. – Vol. 106. – №. 2. – P. 273-283.
25. Partyka A. et al. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C11-BOD-IPY581/591 // *Theriogenology.* – 2011. – Vol. 75. – №. 9. – P. 1623-1629.
26. Sola-Penna M. Stabilization against Thermal Inactivation Promoted by Sugars on Enzyme Structure and Function: Why Is Trehalose More Effective Than Other Sugars / M. Sola-Penna, J.R. Meyer-Fernandes // *Archives of biochemistry and biophysics.* – 1998. – Vol. 360. – №. 1. – P. 10-14.
27. Longobardi V. Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm / V. Longobardi, G. Alberio, et al. // *Theriogenology.* – 2017. – Vol. 89. – P. 359-364.
28. Gholami D. Beneficial effects of trehalose and gentiobiose on human sperm cryopreservation. / D. Gholami, M. Sharafi et al. // *Plos one.* – 2023. – Vol. 18. – №. 4. – P. e0271210.
29. Miyazaki M. Characterisation of the carboxylesterase enzyme cauxin in the seminal fluid of the cat / M. Miyazaki, T. Miyazaki, M. Toyonaga, T. Tsutsui, H. Taira, T. Yamashita, A. Suzuki // *The Veterinary Journal.* – 2011. – Vol. 190. – №. 3. – P. 378-382.